



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

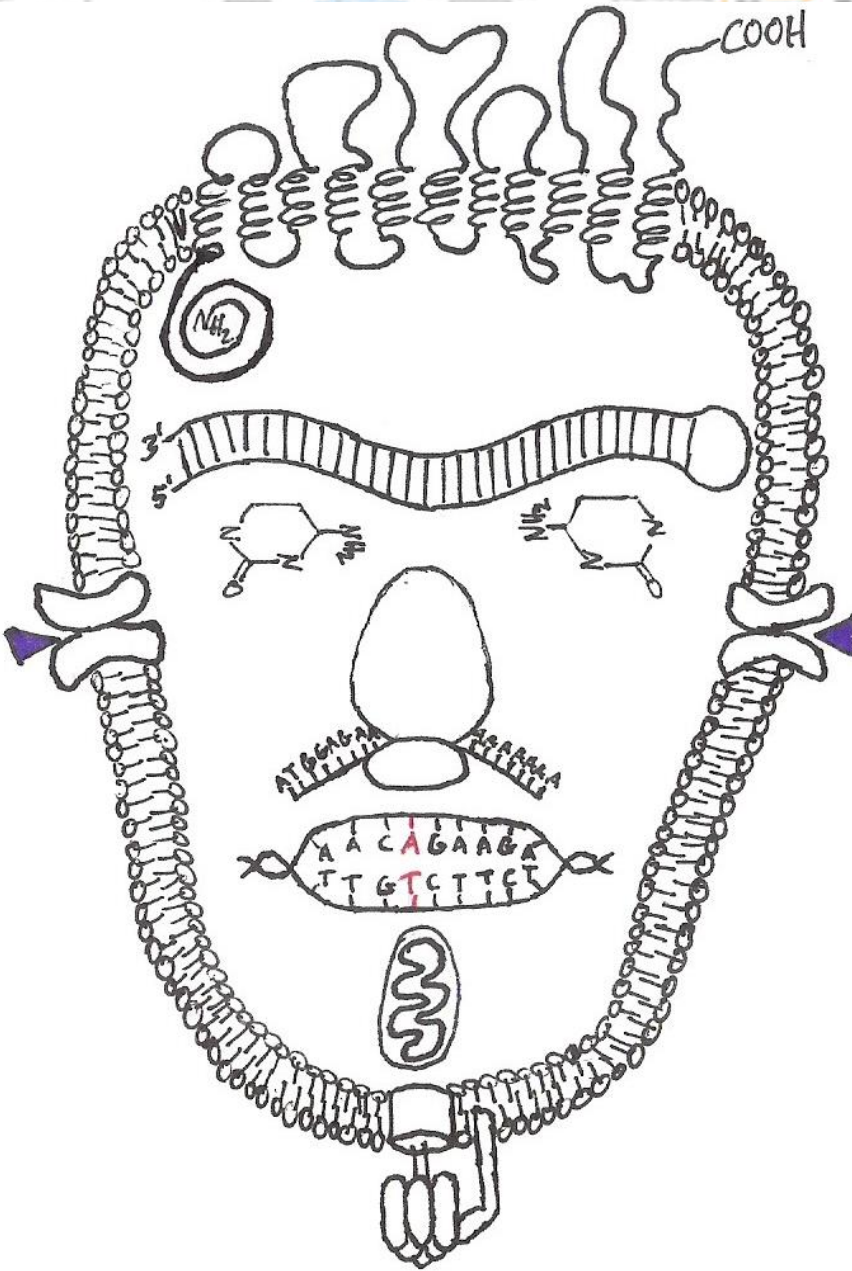
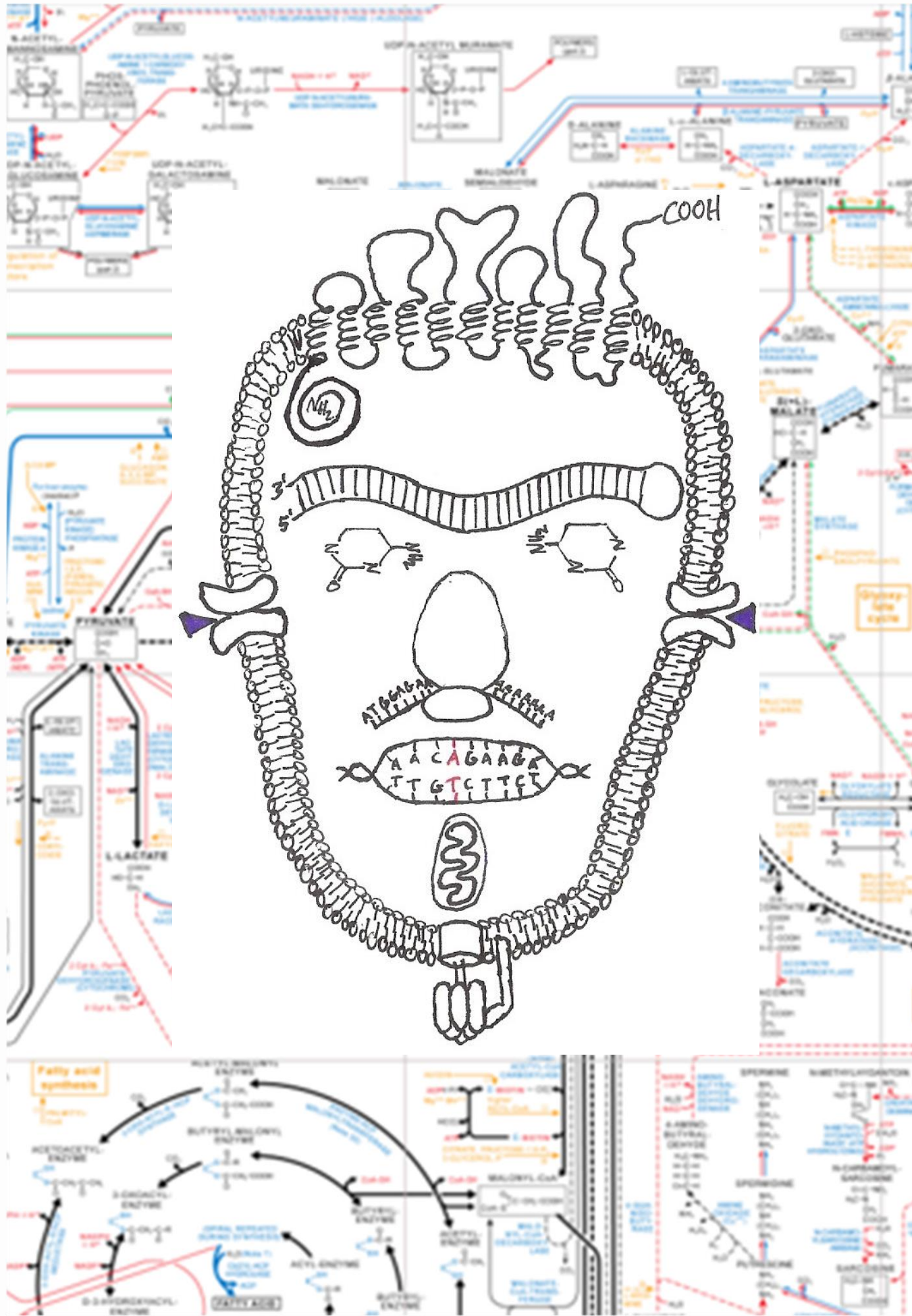
Determinants estructurals i implicacions funcionals de l'interactoma proteic d'hCNT1

Albert Viel Oliva

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

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

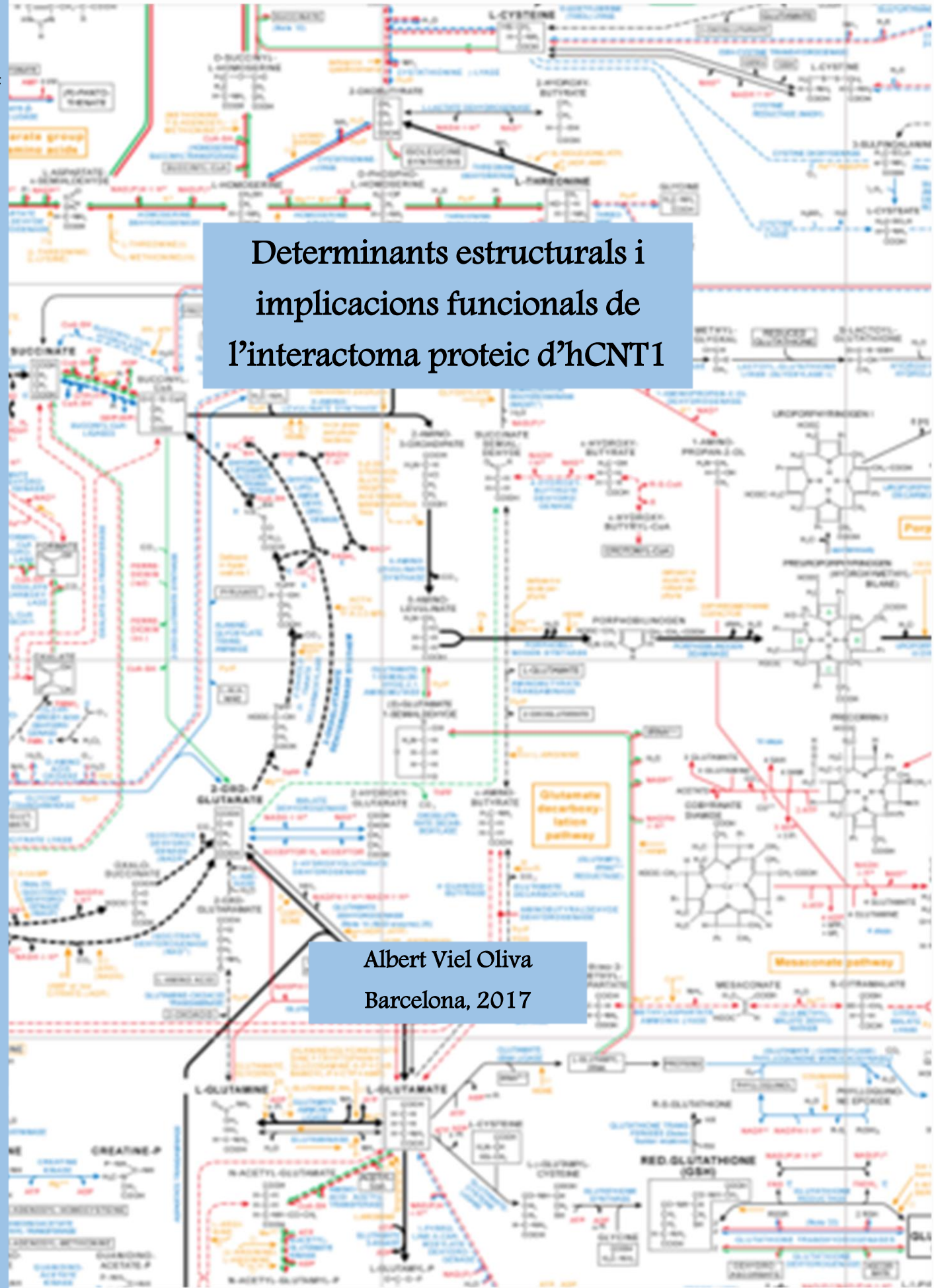
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation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



Albert Viel Oliva

Determinants estructurals i implicacions funcionals de l'interactoma proteic d'hCNT1

2017



Determinants estructurals i implicacions funcionals de l'interactoma proteic d'hCNT1

Albert Viel Oliva
Barcelona, 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa Doctorat en Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

**Determinants estructurals i implicacions funcionals
de l'interactoma proteic d'hCNT1**

Albert Viel Oliva

Barcelona, 2017

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

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR

FACULTAT DE BIOLOGIA

“Determinants estructurals i implicacions funcionals de l’interactoma proteic d’hCNT1”

Memòria presentada per:

Albert Viel Oliva

L’interessat,

Vistiplau dels directors,

Dr. Marçal Pastor Anglada

Catedràtic de Bioquímica i Biologia
Molecular

Departament de Bioquímica i
Biomedicina Molecular

Universitat de Barcelona

Dra. Sandra Pérez Torras

Investigadora CIBERehd

Professora Associada

Departament de Bioquímica i
Biomedicina Molecular

Universitat de Barcelona

A mon père,

A mi madre.

Llistat d'acrònims

Ad: Adenovirus

CNT: Concentrative Nucleoside Transporter

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Di-metilsulfòxid

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

dpm: desintegracions per minut

EDTA: Àcid etilendiamintetraacètic

ENT: Equilibrative Nucleoside Transporter

FBS: Fetal Bovine Serum

FDA: Food and Drug Administration

GFP: Green Fluorescent Protein

HA: HemAgglutinin

HEK: Human Embryonic Kidney

ITC: International Transporter Consortium

K_M: Constant Michaelis-Menten

MPP⁺: 1-methyl-4-phenylpyridinium

MYTH: Membrane Yeast Two-Hybrid

NBTI: NitroBenzilTioInosina

OCT: Organic Cation Transporter

PCR: Polymerase Chain Reaction

RNA: RiboNucleic Acid

RT-PCR: Real Time- PCR

SDS: Sodium Dodecil Sulfate

SLC: Solute Carrier

TMD: TransMembrane Domain

YFP: Yellow Fluorescent Protein

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
1. Importància dels nucleòt(s)ids	3
2. Transportadors de nucleòsids	10
Transportadors de nucleòsids concentratius (CNTs)	10
Transportadors de nucleòsids equilibratius (ENTs).....	11
Estructura dels transportadors de nucleòsids.....	12
Variabilitat genètica dels transportadors de nucleòsids.....	15
Distribució tissular dels transportadors de nucleòsids	16
Regulació dels transportadors de nucleòsids.....	18
Paper farmacològic del transportadors de nucleòsids.....	22
3. Altres funcions dels transportadors de nucleòsids	27
Biomarcadors	27
Membres del purinoma.....	28
Transceptors.....	29
4. Regulació dels transportadors per interaccions proteiques	31
OBJECTIUS	35
RESULTATS I DISCUSSIÓ	39
1. Estudi de l'impacte funcional de la primera mutació del gen <i>SLC28A1</i> detectada en una patologia humana	41
2. Estudi de la funció del domini N-terminal d'hCNT1 i la possible implicació en la biologia tumoral.....	55
3. Identificació de l'interactoma proteic d'hCNT1 i estudi de la funció biològica del mateix. 64	
3.1 Interacció hCNT1-prosaposina	64
3.2 Determinació de l'interactoma d'hCNT1 per la tècnica MYTH i estudi funcional de la interacció amb RNF41.	72
DISCUSSIÓ GENERAL	97
CONCLUSIONS	103
MATERIALS I MÈTODES	107
1. Cultius cel·lulars	109
1.1 Introducció	109
1.2 Condicions i material per al treball amb cultius cel·lulars	110
1.3 Manteniment dels cultius cel·lulars	111

1.4 Línies cel·lulars utilitzades	113
1.5 Control de micoplasma	115
2. Tècniques de manipulació de l'expressió de proteïnes	115
2.1 Sobreexpressió	116
2.2 Silenciament	118
3. Anàlisi d'expressió de proteïnes.....	119
3.1 Obtenció d'extractes proteics	119
3.2 Electroforesi en SDS-PAGE	120
3.3 Western Blot	122
3.4 Immunocitoquímica	125
3.5 Biotinilització	127
4. Tècniques relacionades amb la manipulació de DNA.	127
4.1 Anàlisi de DNA en gels d'agarosa	127
4.2 PCR	128
4.3 Digestió enzimàtica de DNA	133
4.4 Purificació de DNA.....	134
4.5 Lligació de fragments de DNA	135
4.6 Tècniques de manipulació de bacteris	136
4.7 Tècniques per a la generació d'adenovirus recombinants.....	137
5. Tècniques relacionades amb la manipulació d'RNA	141
5.1 Extracció d'RNA total.....	141
5.2 Quantificació d'RNA per espectrofotometria	141
5.3 Síntesi de cDNA: Retrotranscripció.	142
5.4 Real-Time PCR (RT-PCR)	142
6. Tècniques de cerca i de validació d'interaccions proteiques.....	144
6.1 MYTH (Membrane Yeast Two-Hybrid).	144
6.2 Immunoprecipitació	148
6.3 Immunocol·localització	150
7. Transport de nucleòsids	150
7.1 Medis de Transport	151
7.2 Assaig de transport en cèl·lules en monocapa.....	151
7.3 Càlculs.....	152
8. Estadística i representació de dades	152
BIBLIOGRAFIA.....	153

INTRODUCCIÓ

1. Importància dels nucleòt(s)ids

La cèl·lula és l'entitat independent més petita en la qual es pot organitzar un ésser viu. Dintre de la cèl·lula esdevenen un incalculable nombre de processos interns dels quals només coneixem "la punta del iceberg". Aquests processos interns els podríem resumir com un continu intercanvi de matèria i energia en forma d'enllaços químics o en forma de llum. Aquests processos són imprescindibles per al funcionament de la vida cel·lular tal i com la coneixem. La cèl·lula, com un ens independent, intentarà proveir-se de les biomolècules que necessita per tal de dur a terme la seva funció. Entre la multitud de biomolècules existents, el grup dels nucleòtids és de gran importància ja que intervenen en un ampli nombre de processos: són els precursors del DNA i RNA, són transportadors d'energia en forma d'enllaç químic (ATP i GTP), són components de múltiples cofactors (NAD, FAD, S-adenosilmetionina, coenzim A), així com d'intermediaris biosintètics activats (UDP-Glucosa, CDP-diacilglicerol) i de segons missatgers implicats en senyalització (cAMP, cGMP) (Nelson, Cox, & Lehninger, 2015). L'estructura d'un nucleòtid es compon per una base nitrogenada unida a l'extrem 1' d'una pentosa (aquesta estructura seria un nucleòsid) i entre un i tres grups fosfat units a l'extrem 5' de la pentosa (Fig. 1). Segons la base nitrogenada que contingui, diferenciarem entre els nucleòtids purínics i els pirimidínics.

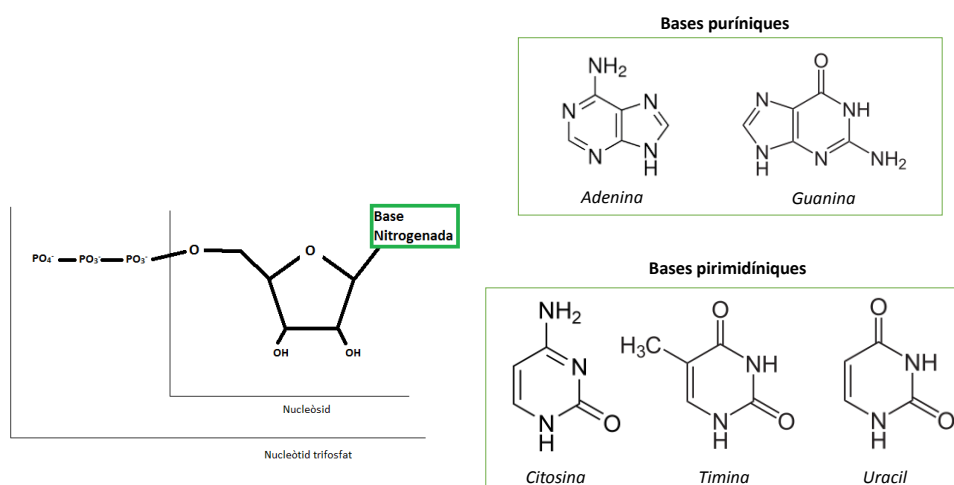


Figura 1. Esquema de l'estructura molecular dels nucleòt(s)ids.

Una evidència que recolza la importància biològica dels nucleòt(s)ids és que existeixen alguns defectes en el metabolisme de purines i pirimidines que comporten malalties severes. S'han identificat fins a 17 mutacions en enzims relacionats amb el metabolisme de nucleòtids que comporten una malaltia severa. Una de les més comunes (dintre de les malalties rares) és la deficiència de l'enzim hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT), que és l'encarregada d'introduir la hipoxantina en la via de recuperació. Aquest dèficit provoca la malaltia de Lesch-Nyhan, que dona un fenotip sever d'hiper-uricèmia (elevats nivells d'àcid úric en sang), fallida renal, retard mental i automutilacions en els afectats. També mutacions en enzims involucrats en la biosíntesi de purines com l'adenosuccinat liasa (ADSL) poden portar a retards mentals i de creixement (Jurecka, 2009; Zhao et al., 2013).

Existeixen dues vies per a la síntesi de nucleòt(s)ids: la síntesi *de novo* i les vies de recuperació (*salvage pathway*) (Fig. 5). La síntesi *de novo* es realitza a partir dels precursors metabòlics més senzills (aminoàcids, Ribosa-5-P, CO₂ i NH₃) i es du a terme a partir de múltiples reaccions enzimàtiques que es troben en un complex multienzimàtic i requereixen despesa d'energia en forma d'ATP i/o GTP. Els precursors i els enzims necessaris per a la síntesi *de novo* difereixen en funció dels nucleòtids que s'estiguin generant, així podem diferenciar entre les vies per a la síntesi *de novo* de pirimidines (Fig. 2) i de purines (Fig. 3). Aquestes vies són metabòlicament i energèticament molt costoses, per tant, sembla lògic que es necessitin vies de recuperació per a una millor eficiència metabòlica.

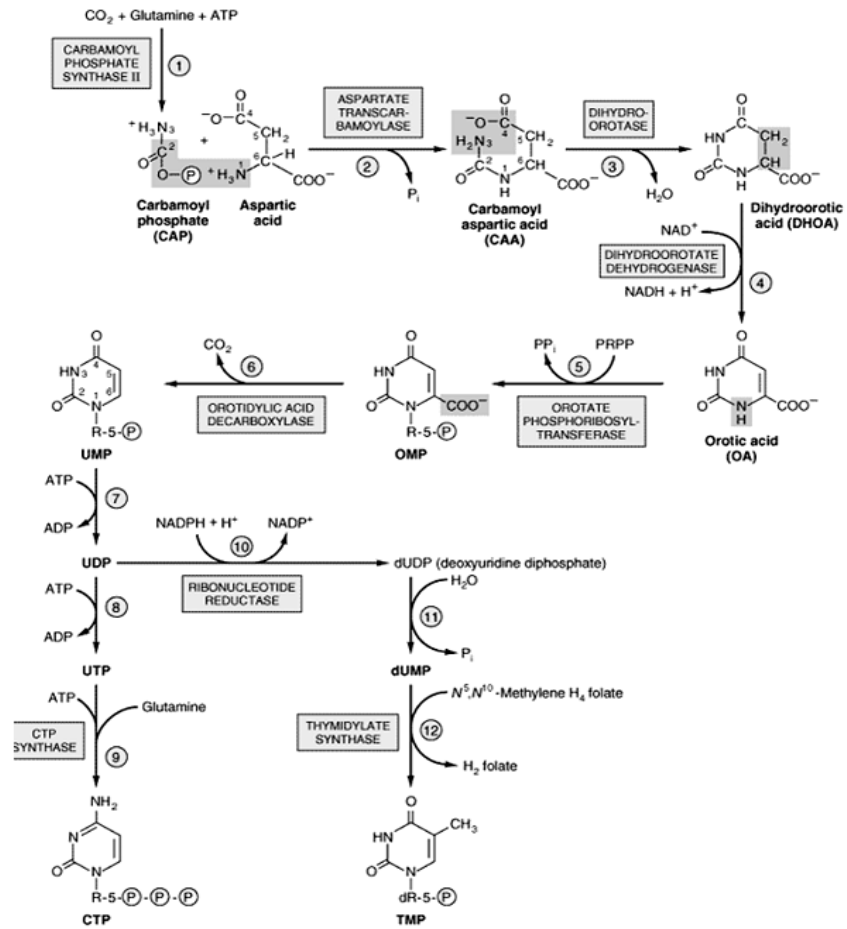


Figura 2. Síntesi *de novo* de nucleòtids pirimidínics. Extret de: www.columbia.edu

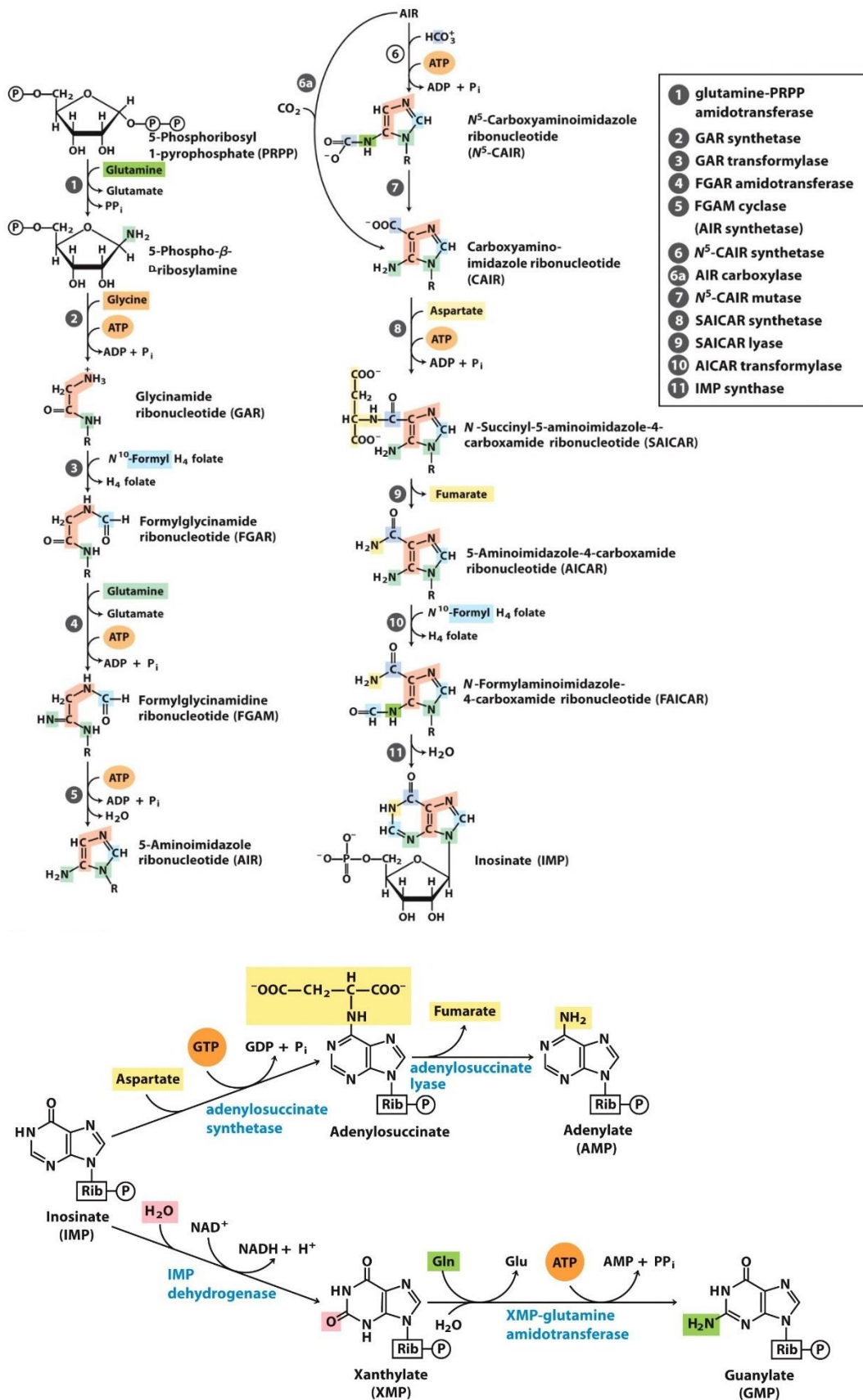


Figura 3. Síntesi *de novo* de nucleòtids purínics. Extret de Nelson et al., 2015

Per al cas de la síntesi *de novo* dels nucleòtids purínics, recentment s'ha descrit el purinosoma com el conjunt d'enzims que participen en la síntesi de purines. Aquest conjunt d'enzims, en funció de les necessitats cel·lulars, pot formar complexes multienzimàtics o metabolons, i molts dels enzims regulen la seva activitat catalítica en funció de l'estat oligomèric (Figura 4). La formació d'aquestes estructures millora el flux metabòlic de la via ja que segresta i estableix productes intermediaris molt reactius i, a més, impedeix que hi hagin interferències amb altres components cel·lulars. A diferència d'altres metabolons, la formació del purinosoma sembla ser un procés reversible en funció del cicle cel·lular o

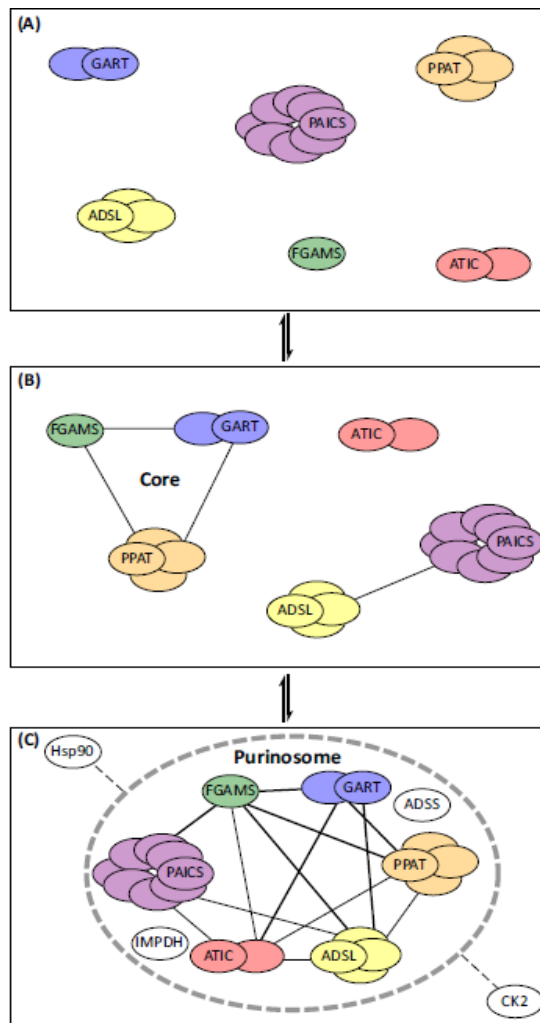


Figura 4. Formació del purinosoma. Adaptat de Pedley & Benkovic, 2016

les condicions extracel·lulars com la concentració de purines, ja que en absència de purines el purinosoma es forma per proporcionar aquests metabòlits primaris. També s'ha obert la possibilitat de dirigir estratègies terapèutiques per inhibir aquest complex multienzimàtic en malalties que tenen el metabolisme de purines alterat, com és el cas del càncer (Pedley & Benkovic, 2016).

Quant a la síntesi *de novo* de pirimidines, l'enzim CAD (Carbamoil-fosfat sintetasa 2/ Aspartat transcarbamoilasa/ Dihidrorotasa) realitza les tres primeres reaccions de la via en eucariotes, per al cas dels procarïotes aquestes tres reaccions les realitzen tres proteïnes diferents. Aquest complex multienzimàtic està regulat mitjançant la fosforilació a través de la via d'mTOR, aquesta fosforilació provoca que oligomeritzi i el flux biosintètic augmenti davant d'estímuls proliferatius (Buel et al., 2013).

Les vies de recuperació (*salvage pathway*) (Figura 5) utilitzen les bases nitrogenades i nucleòsids que han estat generats per la degradació del DNA i RNA, per processos biosintètics al fetge o per la ingesta d'aliments (Austin et al., 2012).

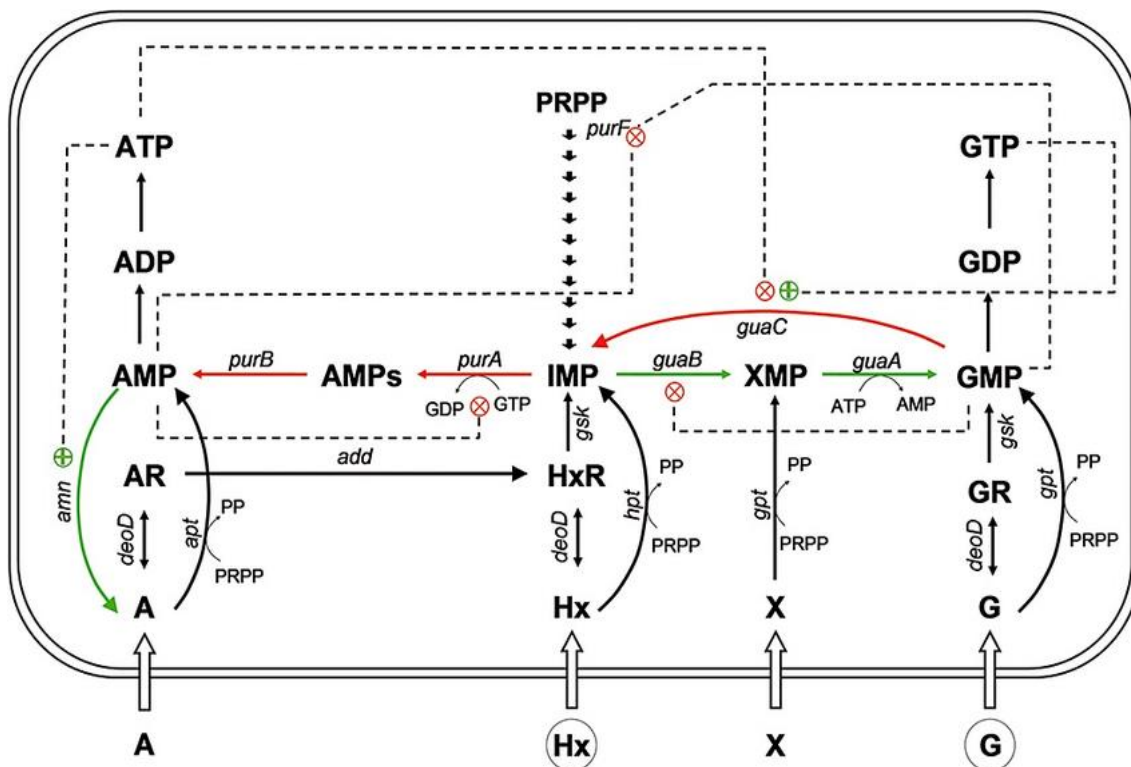


Figura 5. Síntesi de nucleòtids purínics per la via de recuperació (*salvage pathway*) i la via *de novo*. Adaptat de: (Pimkin & Markham, 2008). **A:** Adenina, **Hx:** Hipoxantina, **X:** Xantina, **G:** Guanina, **AR:** Adenosina, **HxR:** Inosina, **GR:** guanosina, **AMPs:** adenilosuccinat, **purA:** Adenilosuccinatiliasa, **purB:** adenosuccinatiliasa, **guaA:** GMP sintetasa, **deoD:** purin-nucleòsid fosforilasa, **hpt:** guanina/hipoxantina fosforibosil transferasa, **gpt:** guanina fosforibosil transferasa, **add:** adenosina desaminasa, **guaC:** GMP reductasa, **purF:** amidofosforibosil transferasa, **amn:** AMP nucleosidasa.

Les vies de recuperació són menys costoses a nivell energètic que la síntesi *de novo*. Per exemple, 1 mol de dCTP o dTTP a partir de glucosa, glutamina, aspartat i bicarbonat requereix 6 mols d'ATP, mentre que per la via de recuperació es requereix la metitat d'energia: 3 mols d'ATP (Voet & Voet, 2004). Però a part d'aquest cost energètic directe, també s'ha de tenir en compte que els metabòlits emprats (glucosa, glutamina...) no podran ser emprats per obtenir energia dintre de la cèl·lula. Amb la qual cosa, el guany energètic aconseguit per la cèl·lula amb la via de recuperació no és gens menyspreable, en aquest cas la natura ens mostra l'avantatge indiscutible d'aprofitar i

reciclar recursos a nivell molecular. Aquest estalvi energètic pot ser emprat per realitzar altres funcions cel·lulars, per tant, estem davant d'una via complementària a la síntesi *de novo* però que exerceix un paper important en la homeòstasi energètica cel·lular. En experiments realitzats amb ratolins KO d'enzims imprescindibles per a la via de recuperació, com ho són dCK i TK1, s'observa que els animals neixen per sota de freqüències mendelianes i que presenten un creixement retardat, per tant, es tracta d'una via notòria a nivell fisiològic (Austin et al., 2012). A més, està descrit que quan els nivells d'hipoxantina són suficients, els nucleòtids purínics són sintetitzats per la via de recuperació, i la regulació negativa sobre la via *de novo* és molt més important per l'estalvi energètic que suposa. No obstant, en condicions de creixement cel·lular la via *de novo* es veu incrementada (Yamaoka et al., 1997, 2001). També es va publicar fa uns anys que l'increment en la producció de purines per la via *de novo* està lligada a creixement cel·lular i transformació maligna (Weber et al., 1984). Pel que fa als teixits, el fetge i el múscul esquelètic tenen una elevada taxa de síntesi *de novo*, mentre que el cervell només té un 25-30% d'activitat en comparació al fetge. Les cèl·lules del moll de l'os sembla que tenen la capacitat biosintètica de nucleòsids molt limitada, amb la qual cosa depenen majoritàriament de la via de recuperació (Zhao et al., 2013).

La via de recuperació depèn del flux d'entrada dels nucleòsids i de les bases nitrogenades a la cèl·lula, i del seu posterior metabolisme. Com que els nucleòsids i nucleobases són molècules hidròfiles, necessiten d'una proteïna transportadora per entrar dintre de la cèl·lula, aquest paper l'exerceixen els transportadors de nucleòsids. Aquestes proteïnes estan dividides en les famílies gèniques SLC28 i SLC29. La família SLC28 codifica per als transportadors de nucleòsids concentratius (CNT-*Concentrative Nucleoside Transporter*) i està formada per tres membres en humans: hCNT1, hCNT2 i hCNT3. La família SLC29 codifica per als transportadors de nucleòsids equilibratius (ENT-*Equilibrative Nucleoside Transporter*) que són quatre proteïnes en humans: hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4 (Young et al., 2013).

2. Transportadors de nucleòsids

Transportadors de nucleòsids concentratius (CNTs)

La família gènica SLC28 en humans està formada per tres gens que codifiquen per les proteïnes hCNT1, hCNT2 i hCNT3. Aquestes proteïnes abunden en epitelis i altres tipus cel·lulars especialitzats. Quant a l'especificitat de substrat, tots tres transportadors internalitzen uridina, però presenten diferències en la resta de nucleòsids: hCNT1 té una preferència per nucleòsids pirimidínics; hCNT2 capta nucleòsids purínics i hCNT3 és el menys selectiu ja que transporta tant nucleòsids purínics com pirimidínics (Fig. 6) (Taula 1) (Pastor-Anglada et al, 2008; Young et al., 2013).

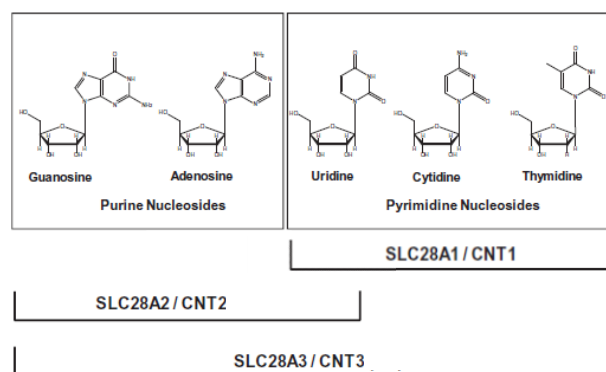


Figura 6. Esquema de l'especificitat dels CNTs. Adaptat de Young et al., 2013

Els tres CNTs internalitzen els nucleòsids de manera unidireccional en un procés que requereix energia de manera indirecta ja que el transport està acoblat a l'influx de cations sodi (Na^+), trencant així el gradient transmembrana de sodi. L'estequiometria del transport Na^+ :Nucleòsid és d'1:1 per a hCNT1 i hCNT2 (Smith et al., 2004), mentre que és de 2:1 per a hCNT3. A més, hCNT3 és l'únic que també pot utilitzar el gradient de protons (H^+) com a força motriu del transport (Smith et al., 2007).

Transportador	Gen	Substrat (K _M)
hCNT1	<i>SLC28A1</i>	Uridina (30 μM) Timidina (26 μM) Citidina (29 μM)
hCNT2	<i>SLC28A2</i>	Inosina (4 μM) Adenosina (8 μM) Uridina (40 μM) Guanosina (21 μM)
hCNT3	<i>SLC28A3</i>	Uridina (22 μM) Timidina (21 μM) Citidina (15 μM) Inosina (52 μM) Adenosina (15 μM) Guanosina (43 μM)

Taula 1. Propietats cinètiques dels transportadors concentratius de nucleòsids. Adaptat de Pastor-Anglada et al., 2008

Transportadors de nucleòsids equilibratius (ENTs)

La família dels transportadors equilibratius (SLC29) en humans la formen els quatre membres hENT1-4. Aquests transportadors permeten un transport passiu en funció de les concentracions intracel·lular i extracel·lular de substrat. Els transportadors millor caracteritzats són hENT1 i hENT2, que es troben en la majoria de cèl·lules i teixits humans i presenten un ampli rang de substrats (Taula 2): nucleòsids purínics, pirimidínics i nucleobases (Baldwin et al., 2004). Els dos transportadors es poden distingir per la seva sensibilitat a la inhibició per l'anàleg de nucleòsid NBTI (NitroBenzylThioInosine), essent hENT1 molt més sensible que hENT2. També tots dos són sensibles a potenciadors de la vasodilatació com el dipiridamol, també essent hENT1 més sensible (Visser et al., 2002). Quant a hENT3, també es troba àmpliament distribuït, té un gran rang de substrats i funciona de manera intracel·lular en lisosomes i mitocondris (Baldwin et al., 2004; Govindarajan et al., 2009). Pel que fa a hENT4, estrictament no es considera un transportador de nucleòsids ja que principalment transporta cations orgànics, encara que sota condicions de pH àcid pot comportar-se com un transportador d'adenosina (Barnes et al., 2006).

Transportador	Gen	Substrat (K _M)	Inhibidor (K _i)
hENT1	<i>SLC29A1</i>	Uridina (260 μM) Timidina (300 μM) Citidina (580 μM) Adenosina (40 μM) Guanosina (140 μM) Inosina (170 μM)	NBTI (1-10 nM) Dipiridamol (5 nM)
hENT2	<i>SLC29A2</i>	Uridina (250 μM) Timidina (710 μM) Citidina (5,6 mM) Adenosina (100 μM) Guanosina (2,7 mM) Inosina (50 μM) Nucleobases	NBTI (>10 μM) Dipiridamol (350 nM)

Taula 2. Propietats cinètiques dels transportadors equilibratius de nucleòsids 1 i 2. Adaptat de Baldwin et al. 2004

Estructura dels transportadors de nucleòsids

L'estructura dels transportadors de nucleòsids pot aportar informació sobre el mecanisme d'internalització de substrats i pot ajudar a entendre les diferents funcions fisiològiques associades a ells. Aquest coneixement pot contribuir al disseny de fàrmacs que es transportin de manera específica. A dia d'avui encara no s'ha aconseguit cristal·litzar cap transportador de nucleòsids humà. Només s'ha cristal·litzat un ortòleg procariota: un CNT de *Vibrio cholerae* (Johnson et al., 2012). Per tant, les estructures i topologies que existeixen estan basades en mètodes de predicció bioinformàtics junt amb validacions bioquímiques. Els ENTs i els CNTs transporten nucleòsids però no tenen cap paregut estructural significatiu entre ells ni amb cap altra família gènica. De fet, per al cas dels ENTs, no tenen cap ortòleg procariota (Dos Santos-Rodrigues et al., 2014).

Família SLC28:

L'homologia de l'estructura primària dels tres membres de la família SLC28 es troba al voltant del 50% (% d'identitat) i comparteixen l'estructura secundària.

L'estructura predita per als hCNTs mitjançant models topològics, estudis de mutagènesi dirigida i construccions quimèriques fins fa pocs anys era de 13 dominis transmembrana amb l'extrem amino terminal extracel·lular i l'amino terminal intracel·lular (Pastor-Anglada et al., 2008). No obstant, la recent cristal·lització de l'ortòleg procariota de *Vibrio cholerae* (vcCNT) dona una estructura de 8 dominis transmembrana (Fig. 7) (Johnson et al., 2012).

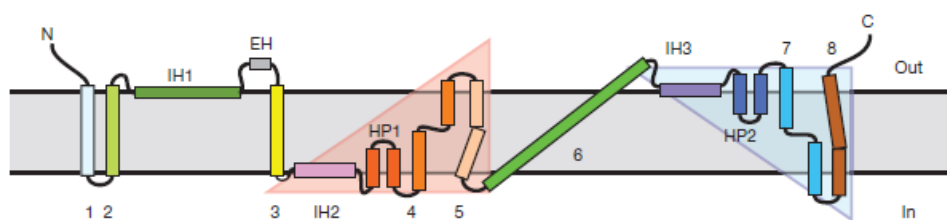


Figura 7. Topologia predita per cristal·lització de vcCNT. Extret de Johnson et al., 2012

Considerant que els ortòlegs procariotes són proteïnes més petites, si incloem els tres dominis transmembrana extra que tenen els eucariotes i el domini amino terminal intracel·lular (Hamilton et al., 2001), quedaria una estructura d'11 dominis transmembrana igualment amb l'extrem amino terminal intracel·lular i l'extrem carboxi terminal extracel·lular. Tenint en compte aquest nou model, els residus d'unió a uridina estan localitzats als dominis HP1 i HP2. El lloc d'unió a sodi es troba entre el domini HP1 i el domini transmembrana 4. Pel que fa al segon lloc d'unió a sodi que existeix en hCNT3 encara no ha sigut identificat (Young et al., 2013). No obstant, en resultats pendents d'acceptació procedents del nostre grup de recerca, semblaria que aquest segon lloc d'unió es trobaria prop de la Cisteïna 602 i la Treonina 605, i que en l'espai quedaria prop del primer lloc d'unió a sodi (Figura 8) (Arimany-Nardi et al., 2017-Pendent d'acceptació). Aquest model *in silico* és capaç d'explicar les evidències experimentals descrites per al polimorfisme C602R d'hCNT3 trobat en població espanyola, que exhibeix una estequiometria 1:1 Na⁺:Nucleòsid, front a l'estequiometria 2:1 per a la proteïna *wild type* (Errasti-Murugarren et al., 2008) i també presenta una localització en microdominis lipídics diferent (Errasti-Murugarren et al., 2010). En el moment que es van realitzar aquests assajos, es pensava que aquest residu estava localitzat en el suposat domini

transmembrana 13. A dia d'avui, amb les noves dades sobre l'estructura cristal·lina de vcCNT i el model bioinformàtic generat, podem deduir que aquest residu es troba prop del segon lloc d'unió a sodi i, per tant, la polaritat del residu influeix en l'estequiometria del transportador.

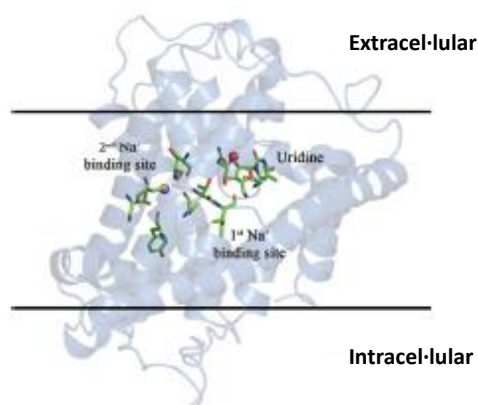


Figura 8. Topologia predita per a hCNT3 segons el model de (Arimany-Nardi et al., 2017-Pendent d'acceptació) .

L'extrem C-terminal presenta múltiples llocs de glicosilació que podrien influir en aspectes com l'activitat i la localització. L'extrem N-terminal és relativament gran en relació al total de la proteïna (suposa una cua d'entre 80 i 100 residus en proteïnes de més 600 aminoàcids) i no és estrictament necessari per a l'activitat del transportador, ja que els ortòlegs procariontes no el tenen i si es crea una proteïna truncada sense aquest domini encara reté certa capacitat de transport (Hamilton et al., 2001). A més, està descrit que és important per a processos reguladors d'unió a proteïnes, senyalització i tràfic a membrana com s'ha demostrat per als membres hCNT2 i hCNT3 (Errasti-Murugarren et al., 2010a; Huber-Ruano et al., 2010; Pinilla-Macua et al., 2012).

Família SLC29:

L'estructura predita per a aquests transportadors és d'11 dominis transmembrana amb l'extrem N-terminal intracel·lular i l'extrem C-terminal extracel·lular. Tenen un *loop* extracel·lular entre els dominis transmembrana 1 i 2, que té llocs de glicosilació imprescindibles per a l'activitat del transportador hENT1 (Bicket

& Coe, 2016) i un *loop* intracel·lular que connecta els dominis transmembrana 6 i 7 (Figura 9) (Dos Santos-Rodrigues et al., 2014).

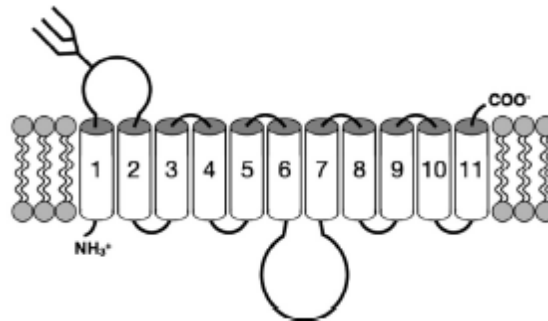


Figura 9. Topologia predita per als hENTs. Adaptat de Dos Santos-Rodrigues et al., 2014

Estudis amb proteïnes quimera han ajudat a identificar les funcions de diversos dominis. La regió entre els dominis transmembrana 1 i 6 en hENT2 sembla ser la responsable del reconeixement de deoxinucleòsids, mentre que la regió entre els dominis transmembrana 5 i 6 s'ha vist que està implicada en el reconeixement de nucleobases (Yao et al., 2002a). La regió entre els dominis transmembrana 3 i 6 conté residus importants per a la sensibilitat a inhibidors com NBTI, dipiridamol i dilazep (Sundaram et al., 2001). I també s'han fet estudis que modelen l'estructura tridimensional de la regió d'entrada extracel·lular de substrat (Valdés et al., 2014).

Variabilitat genètica dels transportadors de nucleòsids

Les dues famílies de transportadors de nucleòsids presenten pocs polimorfismes en comparació a altres famílies gèniques (Errasti-Murugarren & Pastor-Anglada, 2010). Les variants polimòrfiques existents poden presentar diferències d'activitat que poden influir en l'absorció dels nucleòsids i els seus derivats.

El gen *SLC28A1*, que codifica per a hCNT1, presenta uns 60 SNPs (*Single Nucleotide Polimorfism*), però només 15 d'ells alteren la seqüència d'aminoàcids. D'aquests, hi ha dues variants que presenten una pèrdua d'activitat total: hCNT1-S546P

i hCNT1-1153del (Gray et al., 2004). Per al gen *SLC28A2* (codifica per a hCNT2) s'han trobat 10 variants i totes retenen activitat, però algunes l'incrementen i altres la redueixen (Owen et al., 2005). Pel que fa al gen *SLC28A3* (hCNT3), que és on menys variants polimòrfiques s'han trobat, s'ha suggerit que aquest gen no tolera alteracions ja que la implicació dels canvis podria posar en compromís la salut de l'individu (Badagnani et al., 2005).

En la família SLC29 les variants genètiques són rellevants per la seva importància farmacocinètica ja que els transportadors són expressats de manera ubiqua, però amb lleugeres diferències. Quant a les variants d'hENT1, hi ha dues variants en la regió promotora que incrementen l'activitat del promotor (Myers et al., 2006). A més, segons el tipus de polimorfisme d'hENT1 que tingui el pacient, pot ser més efectiu el tractament de gemcitabina per a malalts de Leucemia Mieloide Aguda (Hyun et al., 2016). Per a hENT2 no es coneix cap variant que canviï l'activitat de la proteïna, però si que es coneixen diferents isoformes nuclears que podrien estar regulant el cicle cel·lular (Grañé-Boladeras et al., 2016). On sembla que si que existeixen canvis genètics importants és en el gen *SLC29A3* (hENT3), ja que algun d'ells donen lloc a malalties com el síndrome H que és una malaltia autosòmica recessiva caracteritzada per hiperpigmentació cutànea, hipertricosi, hepatoesplenomegalia, anomalies del cor, pèrdua d'oïda, hipogonadisme i una baixa estatura (Molho-Pessach et al., 2008). El síndrome PHID (*Pigmented Hypertrichosis with Insulin dependent Diabetes*) també és causat per mutacions en el gen d'hENT3, i aquesta malaltia presenta un fenotip molt semblant a l'anterior (Spiegel et al., 2010).

Distribució tissular dels transportadors de nucleòsids

Les dues famílies de transportadors de nucleòsids (CNTs i ENTs) s'expressen en les barreres epitelials (intestí, ronyó i fetge entre d'altres) on juguen un paper important, i sovint diferencial, en la captació de nucleòsids i els seus derivats. Entre els transportadors concentratius, CNT1 ha estat detectat en homogenats de fetge i ronyó principalment (Dufлот et al., 2002). hCNT2 també ha sigut detectat en aquests teixits, a més del cervell i el múscul esquelètic (Guillén-Gómez et al., 2004). hCNT3 es troba representat en molts teixits, amb una distribució semblant als altres dos membres de la

família. Mitjançant un *array* d'RNA es va detectar l'expressió d'hCNT3 en: glàndula mamària, medul·la òssia, tràquea, pàncrees, intestí, fetge, pulmó, placenta, pròstata, cervell i cor (Ritzel et al., 2001).

Estudis funcionals en enteròcits i en cèl·lules renals suggereixen un model de distribució asimètrica on els CNTs es troben majoritàriament en la regió apical, mentre que els ENTs es troben en la regió basolateral, permetent un flux vectorial de nucleòsids que permet la seva absorció (Figura 10A i 10B) (Pastor-Anglada et al., 2007; Rodríguez-Mulero et al., 2005; Young et al., 2013). El fetge (Fig. 10C) juga un paper important en l'homeòstasi de nucleòsids a l'organisme, en aquest model trobem CNT1 i CNT2 en la membrana sinusoidal facilitant la captació de nucleòsids. També estan presents ENT1 i ENT2 mitjançant una captació o sortida de nucleòsids en funció de la concentració intracel·lular/extracel·lular (Govindarajan et al., 2008). En la membrana canicular, que està en contacte amb el canalicle biliar, es troben CNT1 i CNT2 per absorbir els nucleòsids provinents de l'acció de les ectonucleotidases, i també hENT1, evidenciant la importància dels mecanismes de recuperació i alliberació de nucleòsids en el fetge (Dufлот et al., 2002).

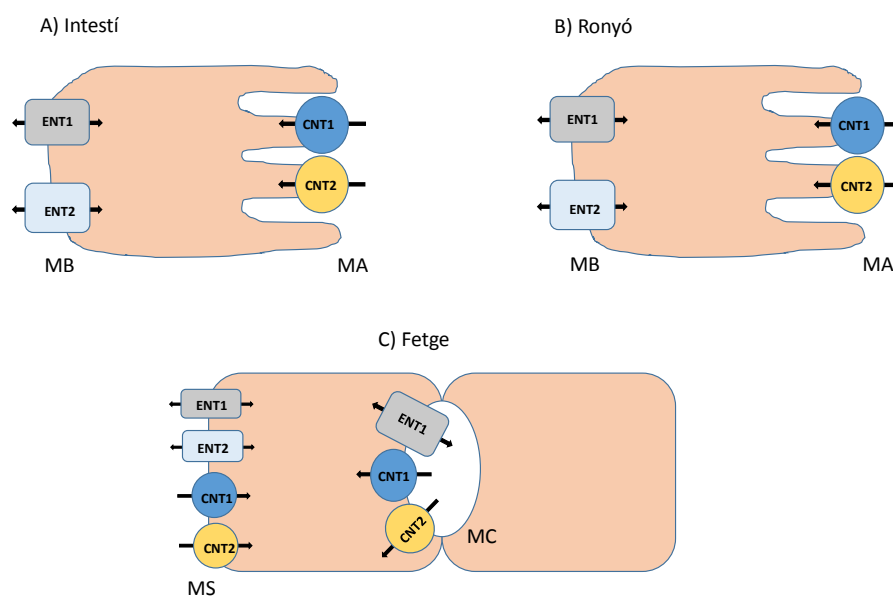


Figura 10. Distribució dels transportadors de nucleòsids en teixits polaritzats. MB: Membrana Basolateral. MA: Membrana Apical. MS: Membrana Sinusoidal. MC: Membrana Canicular. Adaptat de Pastor-Anglada et al., 2007.

Regulació dels transportadors de nucleòsids

La regulació de l'expressió gènica és un procés molt complex en el qual intervenen nombrosos factors a nivell genètic i ambiental. Per intentar comprendre els diferents processos de regulació de l'expressió gènica que s'han descobert fins al moment ens hem de remuntar al dogma central de la biologia molecular. Aquest dogma, proposat per Francis Crick el 1970 (Crick, 1970), ha estat acceptat per la comunitat científica durant tot aquest temps i s'entén com el flux pel qual la informació genètica es transcriu de DNA a RNA i es tradueix d'RNA a proteïna. En aquest dogma, el flux invers d'informació genètica només existeix d'RNA a DNA (transcripció inversa), en canvi no es contempla que una proteïna pugui transferir cap informació genètica als àcids nucleics. No obstant, com tots els principis o dogmes que s'intenten imposar a la biologia, existeixen evidències experimentals que trenquen amb aquesta visió, en aquest cas: els prions. Els prions són proteïnes que poden induir malalties com la malaltia de les vaques boges (malaltia de Creutzfeld-Jacob), i ser els causants de la infectivitat de la malaltia. I no només es troben en animals sinó en altres regnes com en llevats, on són encarregats de transmetre hereditàriament canvis fenotípics. Açò pot conduir a reformular el dogma central de la biologia molecular i a admetre que el flux d'informació genètica pot anar de manera inversa (Koonin, 2012; Tuite & Serio, 2010). De fet, alguns biòlegs de caire Lamarckià, veuen en aquest mecanisme l'explicació a l'herència d'alguns caràcters adquirits i la demostració de que no tota la informació hereditària es troba al DNA (Chernoff, 2001). Per aquests motius, establir dogmes o fonaments indiscutibles en ciència (especialment en biologia), pot portar a rebutjar teories o mecanismes que van en contra del dogma però que poden estar existint a la realitat. Amb aquesta visió, no es pretén desmentir el dogma central de la biologia molecular, que és obvi que existeix i és de vital importància per entendre la biologia molecular de la cèl·lula. Però és necessari que la comunitat científica en el camp de la biologia es qüestionï constantment els principis sobre els quals es fonamenta el coneixement generat i no tinguin por a elaborar hipòtesis que vagin en contra dels principis establerts.

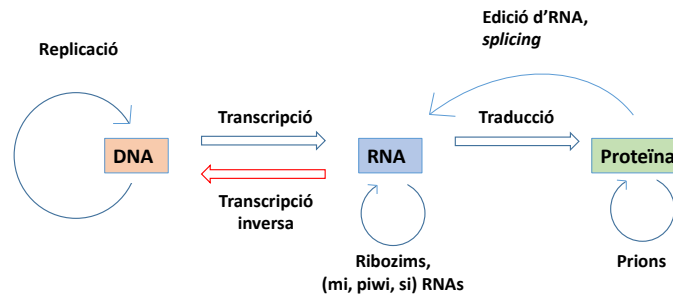


Figura 11. La creixent complexitat del dogma central de la biologia molecular.

Per tant, la regulació de l'expressió gènica és un camp on es coneixen molts mecanismes de regulació però on, segurament, encara queda molt per descobrir. A causa de la seva importància biomèdica i fisiològica, resulta imprescindible conèixer com es regula l'expressió dels transportadors de nucleòsids. Amb el coneixement d'aquests mecanismes es podria intervenir per promoure o inhibir l'expressió dels transportadors, o bé saber quines condicions ambientals o fisiològiques provocaran canvis en l'expressió dels mateixos.

Hi ha diverses evidències científiques de regulació a nivell transcripcional dels transportadors de nucleòsids en funció de diferents situacions o estímuls externs. Per exemple, malgrat que l'expressió d'hENT1 es considera constitutiva, l'augment de l'expressió es relaciona amb estímuls de tipus proliferatius (Soler et al., 2001b). L'expressió de CNT1 i CNT2 es veu incrementada en macròfags davant d'estímuls com TNF- α i LPS (Soler et al., 2001a). També, en una línia cel·lular epitelial intestinal (IEC-6) es va observar que després de l'estimulació amb TGF- α o EGF (promotors de proliferació cel·lular) hi havia un increment dels ENTs i aquest efecte era mimetitzat mitjançant un estímulo proliferatiu de ferida (*cell wounding*). També en aquest estudi es va veure que en presència de glucocorticoides com la dexametasona (conegut promotor de maduració d'enteròcits) hi havia un increment dels CNTs (Aymerich et al., 2004). També es va descobrir en un model de rata, que TGF- β és un potent inductor de CNT2 en cèl·lules del parènquima de fetge, però no així de CNT1, evidenciant una diferent regulació dels dos transportadors (Valdés et al., 2006). També s'ha descrit una reducció del transport d'adenosina realitzat per hENT1 en condicions d'elevada glucosa (Puebla et al., 2008). En un estudi *in vitro* del promotor d'hCNT1 es va trobar que el factor de

transcripció HNF4 α s'unia a la regió promotora i l'activava (Klein et al., 2009). Per tant, veiem que els hENTs es regulen per factors proliferatius mentre que els hCNTs per estímuls diferenciadors o citocines pro-inflamatòries suggerint una diferent funcionalitat entre les dues famílies.

A part d'aquesta regulació transcripcional, també s'ha descrit una regulació dels transportadors un cop sintetitzats mitjançant modificacions postraduccionals, canvis de localització subcel·lular, etc. Per a ENT1 hi ha fortes evidències de que es fosforila mitjançant PKC i PKA (Coe et al., 2002; Reyes et al., 2011) i mitjançant CK2 en ratolí (Bone et al., 2007). També s'ha descrit que per a hENT1 existeix una regulació per la presència de substrat, ja que al exposar cèl·lules a un substrat com la citidina, s'observa una internalització del transportador (Zafar et al., 2016). Nivillac i col·laboradors també van realitzar un estudi holístic sobre com es regulava l'expressió d'hENT1 al llarg del cicle cel·lular i van definir els mecanismes pels quals arribava a membrana i es degradava (Nivillac et al., 2011). Recentment també s'ha descrit el mecanisme pel qual els nivells d'hENT1 dels eritròcits (eENT1) es redueixen en condicions d'hipòxia i altitud mitjançant una degradació via proteasoma (Song et al., 2017). En un model de leucèmia limfàtica crònica, la línia cel·lular MEC1, el tractament amb àcid trans-retinoic (ATRA) produïa un increment de l'activitat d'hCNT3. L'àcid trans-retinoic s'utilitza per al tractament de leucèmia promielocítica aguda i el mecanisme pel qual incrementa l'activitat d'hCNT3 és a través de promoure el tràfic del transportador a membrana (Fernández-Calotti & Pastor-Anglada, 2010). En un estudi on es van utilitzar cèl·lules humanes en cultiu, oòcits de *Xenopus laevis* i un model de ratolí es va evidenciar com la proteïna RS1 regulava negativament la presència en membrana dels tres membres de la família hCNT (Errasti-Murugarren et al., 2012).

Altre tipus de regulació post-transcripcional descrita per als transportadors de nucleòsids és l'*splicing* alternatiu. S'han identificat dues noves variants d'*splicing* del transportador equilibratiu ENT2 que estan presents en la membrana nuclear. Davant de condicions proliferatives aquestes variants es regulen positivament i es recluten a la membrana nuclear per a que pugui haver translocació de nucleòsids al nucli per a la seva posterior incorporació al DNA durant la replicació (Grañé-Boladeras et al., 2016). Per a hCNT3 també s'ha descobert que existeix una variant d'*splicing* que s'expressa en gran

varietat de teixits i que reté certa capacitat de transport en un model polaritzat com les cèl·lules MDCK i que presenta un temps de vida mitja molt més curt que la variant *wild type* del transportador (Errasti-Murugarren et al., 2009). En aquest estudi s'evidencia que existeix una regulació de la degradació proteica d'hCNT3 i que és possible que es doni per als altres transportadors de nucleòsids també. Aquest aspecte és important ja que l'expressió dels transportadors de nucleòsids és un factor clau en l'assequibilitat de molts fàrmacs (Molina-Arcas et al., 2008) i, a més, en alguns tipus de processos oncològics l'expressió dels transportadors de nucleòsids es veu alterada (Bhutia et al., 2011; Farré et al., 2004; Gloeckner-hofmann et al., 2006; Lane et al., 2010). A dia d'avui, no hi ha cap estudi publicat que expliqui com es produeix la pèrdua de l'expressió dels transportadors de nucleòsids concentratius en un context tumoral i podria ser una bona estratègia per poder modular en un futur l'eficàcia dels fàrmacs antitumorals anàlegs de nucleòsids segons el context cel·lular. Actualment en el grup de recerca hi ha alguns projectes centrats en esbrinar l'etiologia de la pèrdua d'expressió dels hCNTs, per exemple, s'està estudiant si els possibles canvis epigenètics que es donen en una cèl·lula cancerosa o la diferent expressió de factors de transcripció poden influir en l'expressió dels transportadors. També s'està analitzant si els canvis en el perfil d'expressió d'alguns miRNAs poden inhibir l'expressió dels hCNTs. Per al cas concret d'hCNT1, està descrit que hi ha una baixada d'RNA i proteïna en teixit tumoral en comparació amb el normal (Bhutia et al., 2011; Farré et al., 2004), per tant, si apliquem estrictament el dogma central de la biologia molecular, sembla que es produeix un canvi en la regulació de l'expressió a nivell de DNA. No obstant, veient les dades experimentals obtingudes pel grup de recerca (Pérez-Torras et al., 2013), al restituir hCNT1 i un mutant sense activitat en línies d'adenocarcinoma pancreàtic es genera una resposta fenotípica en les cèl·lules. Entre d'altres canvis, es promou la mort cel·lular, però no s'ha esbrinat el mecanisme concret. Donat que els hCNTs es troben principalment en teixits diferenciats i polaritzats, podria ser que la pèrdua d'expressió d'aquestes proteïnes induís un fenotip més desdiferenciat i semblant a la cèl·lula tumoral. Per tant, potser són proteïnes que poden regular d'alguna manera l'expressió gènica provocant així canvis fenotípics dintre de la cèl·lula.

Paper farmacològic del transportadors de nucleòsids.

Com ja s'ha esmentat abans, els nucleòsids són importants a nivell fisiològic ja que són els precursors de biomolècules imprescindibles com els àcids nucleics, cofactors... Però també ho són pel seu paper terapèutic en diferents malalties, ja que modificacions en l'estructura molecular dels nucleòsids generen derivats que són actius farmacològicament. Els derivats de nucleòsids tenen característiques semblants als nucleòsids naturals: requereixen un transportador per entrar a la cèl·lula, una vegada internalitzats necessiten ser activats per enzims i utilitzen les mateixes vies metabòliques (Fig. 12). El mecanisme farmacològic d'aquests derivats és la inhibició d'enzims com les polimerases o les ribonucleòtid reductases o bé per incorporació al DNA, la qual cosa acaba provocant finalment l'apoptosi cel·lular (Jordheim et al., 2013).

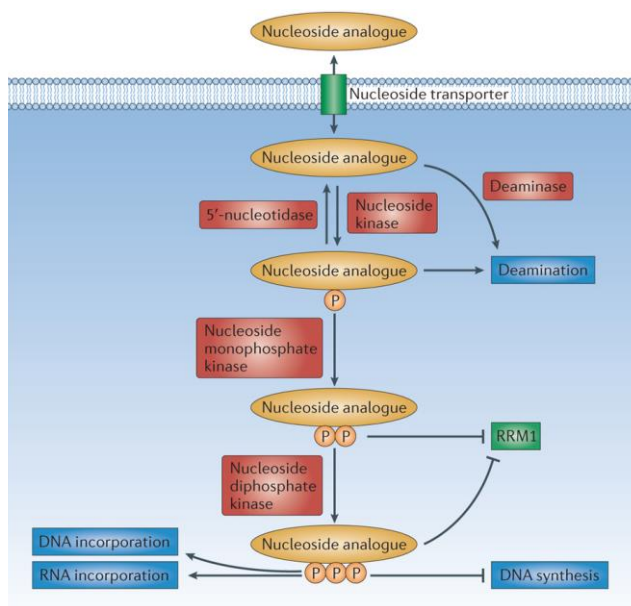


Figura 12. Mecanisme d'acció farmacològica dels derivats de nucleòsids. Adaptat de Jordheim et al., 2013

El principal mecanisme de resistència a aquests fàrmacs respon a una baixa concentració intracel·lular del fàrmac actiu que pot ser causat per una captació insuficient per baixa expressió dels transportadors de nucleòsids, per l'expressió de variants polimòrfiques de transportadors amb baixa o nul·la activitat, per una elevada expressió de bombes ABC que expulsen l'anàleg fosforilat, per baixos nivells dels enzims

que activen els fàrmacs (nucleòsid quinases) o per una elevada expressió dels enzims que els degraden (nucleotidases) (Galmarini et al., 2001). Segons el tipus de malaltia, els anàlegs emprats són diferents. Aquests compostos difereixen en el tipus de transportador que els internalitza i en la preferència d'interacció amb les diferents dianes. Açò podria explicar perquè alguns compostos són efectius contra tumors que proliferen ràpidament i altres són efectius contra processos neoplàsics amb una proliferació més lenta (Galmarini et al., 2001).

Anàlegs de nucleòsids en el tractament contra el càncer

Entre els diferents agents antitumorals trobem anàlegs de nucleòsids de purines i pirimidines. Aquests derivats van ser dels primers agents emprats per al tractament de malalties serveres i, a dia d'avui, la seva eficàcia és ben coneguda i presenten un ampli ús clínic. De fet, la recerca feta sobre purines i anàlegs de purines va ser guardonada amb el premi Nobel de Fisiologia i Medicina el 1988 a Gertrude Elion i George Hitchings. Concretament es va guardonar el desenvolupament racional de diversos fàrmacs basant-se en el coneixement dels processos bioquímics i fisiològics (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1988/elion-bio.html).

Els derivats de nucleòsids segueixen les mateixes vies que els nucleòsids endògens com a mecanisme d'acció: l'anàleg entra dintre de la cèl·lula (majoritàriament a través d'un transportador de nucleòsids), es modifica pels enzims de la via de recuperació i es converteix en anàleg de nucleòtid, la seva forma activa. Llavors poden ser incorporats als àcids nucleics, inhibir la síntesi de DNA i provocar l'apoptosi cel·lular. La diferència entre els diferents fàrmacs resideix en la seva habilitat d'interaccionar amb els enzims de la via de recuperació de purines i pirimidines. En general, els anàlegs de nucleòsids pirimidínics mostren eficàcia contra càncers hematològics i tumors sòlids mentre que els nucleòsids purínics funcionen, quasi exclusivament, contra malalties hematològiques. El que encara no s'acaba d'entendre d'aquest mecanisme farmacològic és que molècules que actuen de manera semblant a nivell cel·lular donen resultats clínics tan diferents (Jordheim et al., 2013; Parker, 2009).

Hi ha un total de 13 anàlegs de nucleòsids aprovats per la FDA (*Food and Drug Administration*), el que suposa un 20% dels fàrmacs emprats per al tractament del càncer. A més, un d'ells va ser dels primers compostos aprovats per la FDA per al tractament de la leucèmia infantil: la 6-mercaptapurina. Aquest compost va ser aprovat el 1953 i encara es considera efectiu i és un dels estàndards de tractament per a aquesta malaltia (Parker, 2009). Com ja s'ha esmentat, l'entrada d'aquests fàrmacs a la cèl·lula es produeix majoritàriament a través dels transportadors de nucleòsids (Taula 3).

Fàrmac antitumoral	Anàleg	Transportador que els internalitza
Mercaptopurina	Purínic	hCNT3, hENT1, hENT2
Citarabina	Pirimidínic	hCNT1, hENT1, hENT2
Fludarabina	Purínic	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2
Pentostatina	Purínic	hENT1, hENT2
Cladribina	Purínic	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2
Azacitidina	Pirimidínic	hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2, hENT3, hENT4
Clofarabina	Purínic	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2
Nelarabina (AraG)	Purínic	
Decitabina	Pirimidínic	hENT2
Floxuridina	Pirimidínic	hCNT1, hCNT2, hCNT3
Gemcitabina	Pirimidínic	hCNT1, hCNT3, hENT1, hENT2, hENT3
5-DFUR	Pirimidínic	hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2
5-Fluorouracil	Pirimidínic	hENT1, hENT2, hOAT2

Taula 3. Fàrmacs derivats de nucleòsids emprats per al tractament del càncer. Adaptat de Pastor-Anglada & Pérez-Torras, 2015

Anàlegs de nucleòsids en el tractament contra malalties víriques

Els derivats de nucleòsids també són de gran utilitat per tractar malalties víriques per la seva capacitat d'inhibir polimerases de DNA víriques i transcriptases inverses. Alguns d'aquests anàlegs tenen un grup 3'-hidroxil que permet l'elongació de la cadena

després d’haver sigut incorporats al DNA o RNA, la qual cosa pot causar mutagènesi, reduint així la infectivitat del virus (Leyssen et al., 2008). Entre les malalties víriques, cal destacar el tractament amb anàlegs de nucleòsids per al VIH (Virus de la Immunodeficiència Humana) ja que hi ha un gran nombre de derivats de nucleòsids que s’empren per a combatre aquesta malaltia (Errasti-Murugarren & Pastor-Anglada, 2010). La diversitat dels anàlegs de nucleòsids per al tractament antiviral és molt divers estructuralment ja que hi ha nucleòsids, nucleòtids i nucleòsids acíclics (De Clercq & Holý, 2005). En la Taula 4 es recullen els anàlegs de nucleòsids antivirals internalitzats pels transportadors de nucleòsids.

Fàrmac antiviral	hCNT1	hCNT2	hCNT3	hENT1	hENT2	hENT3
Zidovudina (AZT)	S	NT	S	NT	S	S
Zalcitabina (ddC)	NT	NT	S	S	S	S
Didanosina (ddI)	NT	S	S	S	S	S
Stavudina (d4T)	S	NT	S	NT		S
Lamivudina (3tC)	NT	NT		NT		S
Ribavirina	NT	S	S	S	S	S

Taula 4. Fàrmacs derivats de nucleòsids emprats per al tractament de malalties víriques. S: Substrat. NT: No transportat. Adaptat de Molina-Arcas, et al. 2008

Anàlegs de nucleòsids en el tractament de malalties inflammatòries

Les tiopurines són fàrmacs que s’utilitzen per a una gran varietat de condicions clíniques. Són utilitzats en malalties inflammatòries cròniques com la malaltia inflammatòria intestinal, malalties hematològiques i com immunosupressors en transplantaments (Sahasranaman et al., 2008). Les tiopurines poden exercir la seva acció farmacològica de diverses maneres. Les tiopurines necessiten l’activació per la Hipoxantina-Guanina Fosforibosil Transferasa (HGPRT), i es poden incorporar al DNA causant un arrest en el cicle cel·lular i apoptosi. Al ser anàlegs de nucleòsids, també inhibeixen enzims de la via *de novo*. Moltes línies limfocítiques es veuen afectades per l’acció de les tiopurines i

també bloquegen la proliferació d'algun tipus de limfòcits i açò acaba provocant immunosupressió (Sahasranaman et al., 2008). Aquests derivats han demostrat ser eficaços en diverses manifestacions de malaltia inflamatòria intestinal com la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa (Axelrad et al., 2016). No obstant, l'efecte terapèutic d'aquests compostos està sota estudi ja que també presenten una elevada toxicitat (Marçal Pastor-Anglada & Pérez-Torras, 2015). Amb l'arribada de nous agents terapèutics amb altres dianes immunològiques específiques l'ús de les tiopurines es veurà clarament afectat, tot i que es necessiten més estudis per estudiar el seu possible efecte positiu en sinèrgia amb altres fàrmacs (Axelrad et al., 2016).

Importància farmacològica del transportadors de nucleòsids

En el genoma humà existeixen més de 400 transportadors de membrana. Els estudis clínics i pre-clínics evidencien que el transport és un pas determinant en l'assequibilitat dels fàrmacs i, per tant, dels efectes terapèutics i adversos dels fàrmacs. Els transportadors són el factor limitant del procés d'absorció, distribució i eliminació dels fàrmacs en les barreres epitelials (Giacomini & Huang, 2013). Amb la intenció de millorar el coneixement d'aquest procés, es va crear l'*International Transporter Consortium* (ITC) per tal de recolzar la investigació a nivell d'absorció, distribució, metabolisme i excreció de fàrmacs, així com possibles interaccions entre diferents fàrmacs (Giacomini KM, et al. 2010). Els transportadors de nucleòsids es troben en aquest conjunt de transportadors que internalitzen una ampla varietat de fàrmacs, d'aquí la importància biomèdica del seu estudi a tots els nivells. De fet, està descrit que els transportadors SLC són una oportunitat emergent com a dianes terapèutiques (Lin et al., 2015).

Per altra banda, també hi ha línies de recerca que investiguen la possibilitat d'internalitzar aquests tipus de fàrmacs sense utilitzar transportadors per tal de millorar l'assequibilitat i selectivitat del fàrmac en qüestió, per exemple amb biopolímers (Gorzkiwicz & Klajnert-Maculewicz, 2017). Si finalment aquesta aproximació resulta viable, pot ser útil en casos on l'expressió dels transportadors de nucleòsids s'hagi perdut per complert i no hi hagi manera de recuperar-la. No obstant, aquest tipus d'estratègies encara no s'apliquen clínicament perquè no aconsegueixen l'eficiència i

especificitat de la internalització realitzada per proteïnes transportadores, el que ens està indicant que l'eficàcia d'aquest tipus de teràpia farmacològica depèn en gran mesura de l'expressió dels transportadors de nucleòsids, entre d'altres.

3. Altres funcions dels transportadors de nucleòsids

Biomarcadors

Com ja s'ha descrit, els transportadors de nucleòsids, a més d'internalitzar els seus substrats naturals també internalitzen els derivats de nucleòsids emprats com a teràpia per a algunes malalties. Per aquesta raó, en funció de l'expressió dels transportadors pot variar l'eficàcia del tractament, per tant, són bons candidats per a ser biomarcadors de sensibilitat als fàrmacs derivats de nucleòsids i de prognosi del tractament (Marçal Pastor-Anglada & Pérez-Torras, 2015).

L'exemple més estudiat és l'expressió d'hENT1 en tumors sòlids i la resposta a gemcitabina, principalment en càncer de pàncrees. Les dades *in vitro* evidencien que l'activitat d'hENT1 és el factor determinant per a l'acció de la gemcitabina. Quan es sobreexpressa hENT1 s'incrementa la resposta de gemcitabina en càncer de pàncrees, i en cèl·lules que no tenen hENT1 s'observa una elevada resistència al fàrmac (Mori et al., 2007; Pérez-Torras et al., 2008). A més, hi ha estudis sobre la correlació positiva entre l'expressió d'hENT1 i el resultat clínic de la gemcitabina en pacients (Giovannetti et al., 2006; Spratlin et al., 2004). També s'ha descrit que hENT1 pot ser un biomarcador per a la malaltia de Huntington, ja que modula els nivells d'adenosina en el cervell en les primeres etapes d'aquesta malaltia (Guitart et al., 2016).

En el cas dels transportadors de nucleòsids concentratius, també es va analitzar l'expressió d'hCNT1 en tumors ginecològics i es va veure que la pèrdua d'expressió correlacionava amb mala prognosi (Farré et al., 2004). En càncer de mama també es va determinar que hCNT1 tenia un valor de prognosi per determinar la supervivència i el risc de recaiguda per als pacients que havien estat sotmesos a cirurgia i un tractament de ciclofosfamida, metotrexat i 5-FU (Gloeckner-Hofmann et al., 2006).

Membres del purinoma

El purinoma es defineix com una xarxa molecular de lligands, receptors, enzims, canals i transportadors purinèrgics. Aquesta xarxa és important ja que regula múltiples processos en les cèl·lules i els teixits (Volonté & D'Ambrosi, 2009). Alguns transportadors de nucleòsids, com que transporten nucleòsids purínics, formen part d'aquesta xarxa. Per exemple, en el sistema nerviós central els ENTs permeten un flux d'adenosina i aquest nucleòsid té diversos receptors que desencadenen vies de senyalització intracel·lulars importants ja que es tracta d'un neuromodulador que regula la neurotransmissió entre d'altres aspectes (Dos Santos-Rodrigues et al., 2014; Nguyen et al., 2015). En un model neuronal, la hipòxia i l'estimulació dels receptors P1 d'adenosina regulaven la presència de CNT2 (Medina-Pulido et al., 2013). Pel que fa a CNT2, es va veure que estava sota control de receptors A1 d'adenosina en hepatòcits a través de canals de potassi sensibles a ATP (Duflot et al., 2004). A més, l'adenosina captada per CNT2 és la responsable de l'activació d'AMPK (Aymerich et al., 2006; Medina-Pulido et al., 2013). Quant a CNT3, també està sota control purinèrgic en colangiòcits. En el nostre grup de recerca s'ha descrit un mecanisme pel qual es recapta adenosina del medi extracel·lular a partir d'una senyalització inicial per ATP. D'aquesta manera es regula fisiològicament el colangiòcit i el flux biliar (Figura 13) (Godoy et al., 2014).

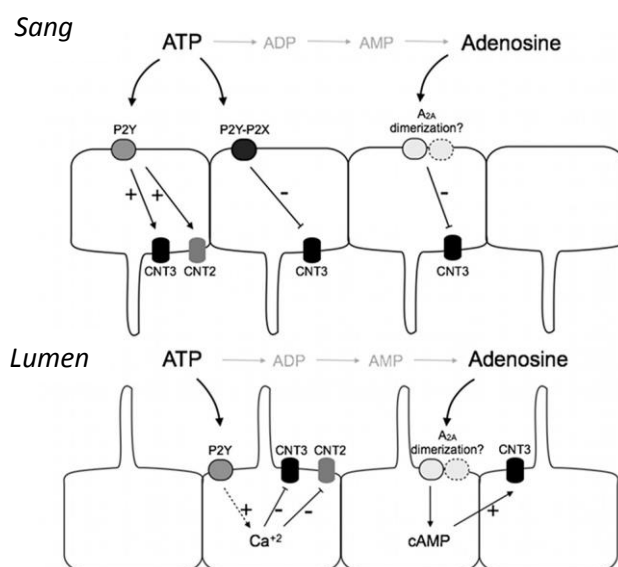


Figura 13. Esquema dels passos pels quals l'adenosina i l'ATP poden modular la captació luminal d'adenosina en un model de colangiòcits. Adaptat de Godoy et al., 2014

Transceptors

A part de totes les funcions abans descrites per als transportadors de nucleòsids, hi ha evidències que suggereixen que també participen en la regulació d'altres processos com la transició epitelial-mesènquima, la migració cel·lular, el cicle cel·lular... Per exemple, en cèl·lules renals, es va veure que la inhibició d'hENT1 induïa la transició epitelial-mesènquima (Guillén-Gómez et al., 2011), aquest procés està descrit que contribueix a la disseminació de les cèl·lules canceroses i que és imprescindible per a la invasió i metastasi d'adenocarcinoma pancreàtic (Rhim et al., 2012). En un model *in vivo* on es va inhibir la transició epitelial-mesènquima, es va veure que l'expressió d'hCNT3 i hENT2 es veia incrementada i, per tant, també ho feia la sensibilitat a gemcitabina (X. Zheng et al., 2015). Per altra banda, també es va descobrir que si s'inhibia l'activitat dels transportadors de nucleòsids amb un compost de síntesi també s'inhibia la diferenciació d'osteoclasts (Katsuyama et al., 2016). L'expressió dels hCNTs està associada a tipus cel·lulars ben diferenciats (Molina-Arcas et al., 2008; Pastor-Anglada et al., 2008) i està descrit que en processos oncològics l'expressió es veu reduïda (Farré et al., 2004; Govindarajan et al., 2009; Mohelnikova-Duchonova et al., 2013) així com en condicions de cultiu cel·lular *in vitro* (del Santo et al., 1998; X. Zheng et al., 2015). En el grup de recerca s'ha demostrat que al restaurar l'expressió d'hCNT1 en una línia d'adenocarcinoma pancreàtic s'aconsegueix induir arrest en el cicle cel·lular, s'incrementa la mort cel·lular mitjançant un mecanisme no relacionat amb l'apoptosi, s'activen diferents vies de senyalització i s'inhibeix la migració cel·lular. Tots aquests esdeveniments cel·lulars es donen també quan restaurem l'expressió d'un mutant d'hCNT1 que no té l'habilitat de translocar substrat. A més, al restituir l'expressió d'hCNT1 en un model *in vivo* d'adenocarcinoma pancreàtic aconseguim una reducció del creixement tumoral (Pérez-Torras et al., 2013).

Totes aquestes evidències fan pensar que els transportadors de nucleòsids podrien ser definits com transceptors. El concepte de transceptor va ser descrit per primer cop a partir d'estudis fets en *S. cerevisiae* i *E. coli* (Holsbeeks et al., 2004). Aquestes investigacions evidenciaven que existia un mecanisme en la membrana de la cèl·lula que feia de sensor de nutrients essencials, no obstant, ja es coneixia la presència de receptors que al ser activats pels seus lligands activaven senyals intracel·lulars. El que

va ser sorprenent va ser el descobriment de proteïnes que eren sensors de nutrients amb una activitat de transport residual. Per exemple, en *E.coli* van descobrir una còpia duplicada del gen que codifica per a la glucosa-6-fosfatasa que tenia poca activitat transportadora, però que induïa l'expressió de la seva còpia activa (Schwöppe et al., 2003). Per tant, ens trobem davant d'una proteïna que es comporta com un transportador i un receptor, d'aquí el nom de transceptor. Amb el temps, s'han anat descobrint diferents tipus de transceptors (Figura 14): els que tenen activitat transportadora (Hundal & Taylor, 2009; Lacoste et al., 2012; Tanaka et al., 2014) i els que l'han perduda (Forsberg & Ljungdahl, 2001). Per tant, es podria pensar que evolutivament els receptors provenen dels transceptors que, amb el temps, han anat perdent la capacitat de transportar el substrat. Aquesta teoria es veu recolzada quan el receptor i el transportador presenten una estructura semblant. No obstant, en molts casos no es coneix si el substrat/l·ligand s'uneix en el mateix lloc d'unió en el cas del transportador/transceptor/receptor (Conrad et al., 2014; Thevelein & Voordeckers, 2009). De fet, ja hi ha transportadors que tenen llocs d'unió amb diferents afinitats com és el cas d'hOCT1 (Koepsell, 2011).

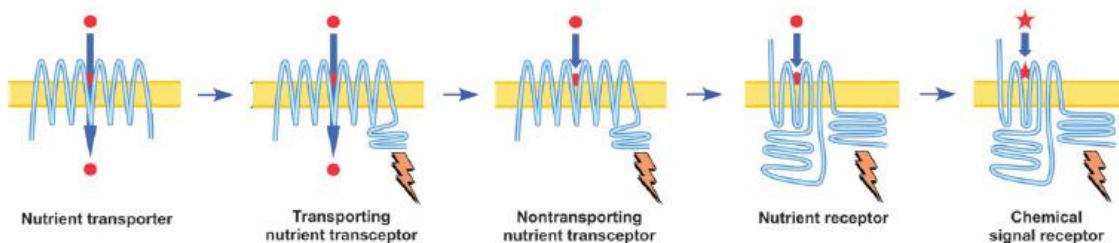


Figura 14. Teoria de l'evolució dels receptors a partir dels transportadors i passant pels transceptors. Adaptat de Thevelein & Voordeckers, 2009

Existeixen nombrosos exemples publicats de transceptors en els diferents regnes: un dels més estudiats en mamífers és del transportador d'aminoàcids LAT1-4F2hc que senyalitza a través del complex mTOR (L. Zheng et al., 2016) i influeix en la invasió i migració de cèl·lules de colangiocarcinoma (Janpipatkul et al., 2014), també s'han descrit múltiples transceptors en plantes (Giehl & von Wirén, 2015; J. Sun & Zheng, 2015). Tot açò fa pensar que és un mecanisme molt conservat al llarg de l'evolució i que, possiblement, hi ha molts transportadors involucrats en aquest tipus de senyalització.

4. Regulació dels transportadors per interaccions proteiques

La gran majoria dels processos biològics dintre de les cèl·lules es porten a terme per proteïnes que interaccionen físicament formant complexos estables (Srihari et al., 2015). La interacció proteïna-proteïna es coneix com el contacte físic entre dues proteïnes dintre d'una cèl·lula o un organisme viu. Però no és el mateix si dues proteïnes comparteixen un contacte funcional que si estan juntes en l'espai (Rivas & Fontanillo, 2010). De fet, Mackay i col·laboradors comparen les interaccions proteiques publicades a la literatura científica amb la situació que ocorre en l'obra mestra de William Shakespeare "*Othello*": quan s'esdevé una gran tragèdia perquè Othello evidencia de manera poc sòlida una interacció física inapropiada de Desdemona. Des del seu punt de vista, la major part de les interaccions proteiques publicades estan basades en dades i tècniques poc fiables i aquestes dades estan sent utilitzades per generar mapes d'interaccions proteiques (Figura 15), els quals poden generar confusions a l'hora d'extreure conclusions biomèdiques (Mackay et al., 2007). L'elevada taxa d'errors, falsos positius i baixa reproductibilitat dels mètodes proteòmics actuals posa de manifest que el coneixement generat mitjançant aquestes tècniques haurà de ser validat posteriorment amb altres mètodes (Stagljär, 2016). Existeixen diverses tècniques per a fer cribratges d'interaccions de proteïnes i que estan acuradament recopilats en una revisió publicada per Snider i col·laboradors (Snider et al., 2015). Cada tècnica presenta una sèrie de limitacions que l'investigador/a ha de tenir en compte a l'hora d'extrapolar els resultats obtinguts amb aquestes tècniques. A més, s'està evidenciant cada cop més que en el camp de la interacció de proteïnes es requereixen tècniques molt sensibles ja que, en molts casos, es tracta d'unions transitòries i molt breus (Milles et al., 2015). No obstant, les tècniques de cribratge d'ampli espectre es segueixen emprant per a la detecció d'interaccions proteiques ja que hi ha evidències que, en certa mesura, són eines d'utilitat per a la generació de coneixement bàsic (Snider et al., 2015) i que sembla ser que en un futur puguin ser d'utilitat clínica (Arkin et al., 2004; Laraia et al., 2015).

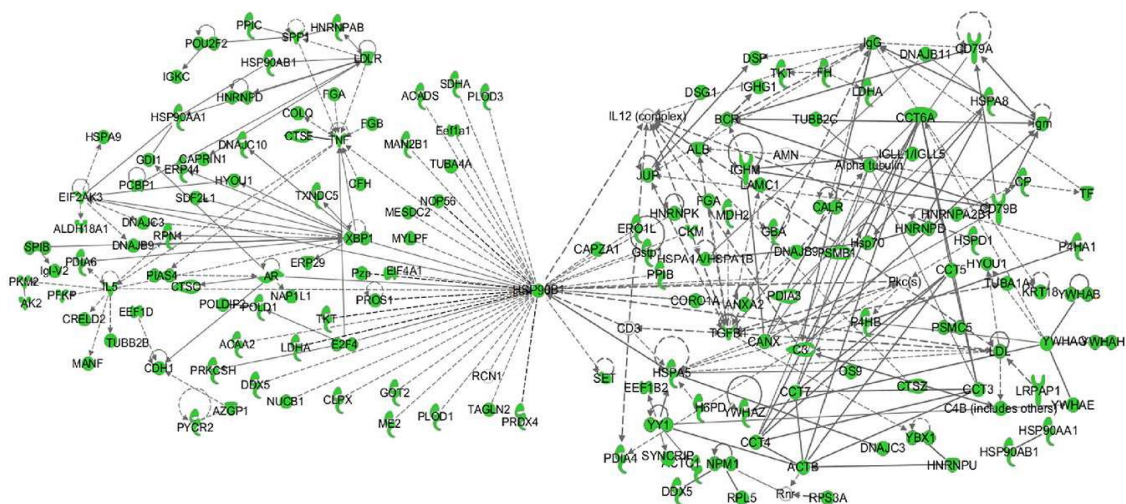


Figura 15. Interactoma de la proteïna HSP90. Imatge extreta de Hong et al., 2017

Aquestes tècniques més convencionals s’han fet servir per a conèixer algunes de les proteïnes que interaccionen amb proteïnes de membrana. Un dels casos més paradigmàtics relacionat amb la regulació de proteïnes de membrana és l’intercanviador de sodi i protons (NHE3) que és un membre de la família gènica SLC9 i que diversos estudis han demostrat la importància fisiològica de les interaccions proteïques en la regulació d’aquest intercanviador (Donowitz et al., 2009; Donowitz & Li, 2007). Aquest intercanviador de sodi i protons comparteix un tret estructural amb els transportadors de nucleòsids concentratius, que és la presència d’un gran domini intracel·lular a través del qual interaccionen les diferents proteïnes. Per als transportadors de nucleòsids les tècniques de detecció d’interaccions proteïques han permès conèixer alguns aspectes reguladors lligats al domini amino terminal, ja que ha sigut el domini emprat per a trobar les proteïnes d’interacció. Per exemple, per a hCNT2 es van descobrir dues proteïnes d’interacció mitjançant un doble híbrid en bacteris i *GST-Pull Down*: aldolasa B i GRP58 respectivament. GRP58 sembla ser un efector negatiu d’hCNT2, mentre que un flux glucolític en aldolasa B modulava l’activitat d’hCNT2 incrementant l’afinitat pels seus substrats (Huber-Ruano et al., 2010). Quant a hCNT3, amb la tècnica de *GST-pull down*, es va descobrir Galectina-4 com a possible proteïna d’interacció, després de validar-ho amb altres tècniques, es va observar en cèl·lules de càncer de colon que la presència de

Galectina-4 afavoreix la localització d'hCNT3 a membrana i incrementa la seva activitat (Fernández-Calotti et al., 2016).

Per al cas dels transportadors de nucleòsids equilibratius, les aproximacions que s'han fet per trobar interaccions proteiques han sigut amb la proteïna sencera. La tècnica emprada ha sigut el cribratge d'ampli espectre MYTH (*Membrane Yeast Two-Hybrid*) que també s'ha utilitzat en aquesta tesi doctoral. Mitjançant aquest mètode s'ha descobert que la calmodulina interacciona amb hENT1 i segons els nivells de calci es veu afectada la seva activitat (Bicket et al., 2016). Per a la proteïna hENT2 també s'ha realitzat el MYTH (*Membrane Yeast Two-Hybrid*) on es van trobar unes 100 possibles proteïnes d'interacció englobades en diferents funcions o regions cel·lulars com proteïnes nuclears, mitocondrials, relacionades amb tràfic, etc. De les quals encara no s'ha acabat de demostrar la implicació fisiològica (Tesi Doctoral - Natàlia Grañé Boladeras).

OBJECTIUS

Els transportadors de nucleòsids són de gran importància pel seu paper clau en la recuperació de nucleòsids extracel·lulars, així com per les noves funcions descrites més enllà de la translocació dels seus substrats, que els relacionarien amb diversos aspectes de la fisiologia cel·lular. A més, els transportadors de nucleòsids són un objectiu d'estudi important a nivell biomèdic ja que són els encarregats d'internalitzar els fàrmacs derivats de nucleòsids emprats en el tractament de malalties víriques, inflamatòries i en processos oncològics. L'eficàcia d'aquests derivats dependrà en primer lloc de l'entrada del fàrmac a la cèl·lula pel transportador corresponent.

D'entre tots els transportadors de nucleòsids, aquest treball s'ha centrat en l'estudi del membre hCNT1 per la seva implicació en la captació de nombrosos fàrmacs emprats en tumors sòlids, per l'alteració de la seva expressió es veu alterada en processos carcinogènics i per les sòlides evidències del seu comportament com un transceptor.

En base a aquests antecedents ens vam plantejar com a objectiu general d'aquest treball estudiar els determinants estructurals i les implicacions funcionals de l'interactoma proteic d'hCNT1.

Per poder assolir-lo es desenvoluparen els següents objectius concrets:

- Estudi de l'impacte funcional de la primera mutació en el gen *SLC28A1* (hCNT1) detectada en una patologia humana amb un fenotip sever.
- Estudi de la funció del domini N-terminal d'hCNT1 i la possible implicació en la biologia tumoral.
- Identificació de l'interactoma proteic d'hCNT1 i estudi de la funció biològica del mateix.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. Estudi de l'impacte funcional de la primera mutació del gen *SLC28A1* detectada en una patologia humana

En el marc de la reunió de la *Purine and Pyrimidine Society* de l'any 2015, es va tenir accés a dades no publicades del doctor André van Kuilenburg (Academic Medical Center-Països Baixos) d'un cas clínic d'un malalt nou-nat que va morir a les nou setmanes de vida i que mostrava uns nivells elevats d'uridina i citidina en orina. Els símptomes del malalt es corresponien amb un fenotip mitocondrial. El pacient va desenvolupar una acidosi làctica persistent amb els nivells d'enzims hepàtics alterats i presentava insuficiència respiratòria gradual. També presentava una lleugera hepatomegàlia, esplenomegàlia marcada i necrosi aguda al còrtex renal.

Les dades clíniques, sobretot la presència d'uridina i citidina en orina per sobre dels nivells habituals, van fer pensar que es podria tractar d'algun problema en el metabolisme dels nucleòsids pirimidínics. Per això es van analitzar els principals enzims del metabolisme de nucleòsids però no es va trobar cap anomalia a nivell de seqüència. Analitzant el cas més en profunditat vàrem proposar que podria tractar-se d'un problema de recaptació de nucleòsids, llavors es van analitzar els gens dels transportadors de nucleòsids (famílies SLC28 i SLC29). Aleshores es van trobar canvis en la seqüència per a hCNT1 (gen *SLC28A1*) (Taula 5), que és el transportador que, junt amb hCNT3, transporta uridina i citidina amb major afinitat.

Canvi de Residu	Canvi de Base	Freqüència al·lèlica menor (%)
p.N3N/wt	c.9C>T/wt	2.2
p.V189I/wt	c.565G>A/wt	34.8
p.G210G/wt	c.630A>T/wt	1.8
p.Q237K/wt	c.709C>A/wt	25.1
p.K383K/wt	c.1149G>A/wt	46.8
p.Q456Q/wt	c.1368A>G/wt	7.2
p.R510C/wt	c.1528C>T/wt	11.8
p.R561Q/wt	c.1682G>A/wt	<1

Taula 5. Recopil·lació dels canvis en la seqüència del gen *SLC28A1* detectades en el pacient.

Entre totes les modificacions, ens vam centrar en aquelles que comportaven un canvi d'aminoàcid que pogués provocar alguna alteració funcional de la proteïna. L'únic canvi de residu que no era un polimorfisme i era la primera vegada que es descrivia és el que correspon a l'alteració 1682G>A (*wt*>pacient) i que comporta el canvi de residu R561Q. Mentre que els altres canvis: V189I, Q237K i R510C, eren polimorfismes ja descrits.

Segons dades publicades amb diversos models de treball, CNT1 es troba majoritàriament al túbul contornejat proximal, àrea del ronyó implicada en la reabsorció de glucosa, aminoàcids i -entre d'altres soluts orgànics- aparentment també nucleòsids. La ubicació apical d'aquest transportador li atorga un paper clau en la recaptació de nucleòsids (Figura 16) (Errasti-Murugarren et al., 2012; Pastor-Anglada et al., 2007; Rodríguez-Mulero et al., 2005). Arran de les dades clíniques obtingudes i les evidències funcionals que semblen relacionar la pèrdua de nucleòsids per orina amb l'activitat d'hCNT1, es va decidir fer un estudi sobre l'impacte d'aquesta mutació i dels polimorfismes sobre la funcionalitat de la proteïna hCNT1.

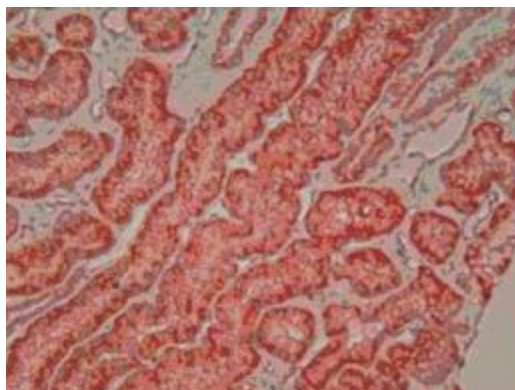


Figura 16. Immunohistoquímica d'hCNT1 en una biòpsia renal. Figura extreta de: Pastor-Anglada et al., 2007

Primerament, es va realitzar un estudi bioinformàtic de les possibles implicacions d'aquests canvis en la seqüència d'aminoàcids de la proteïna. En col·laboració amb els Drs. Xavier Barril i Axel Bidon-Chanal, es va generar un model bioinformàtic amb els programes GOLD (Jones et al., 1997) i GLIDE (Halgren et al., 2004) que prediu *in silico* l'estructura dels hCNTs (Arimany-Nardi et al., 2017-Pendent d'acceptació). Segons

aquest model, la mutació R561Q estaria situada una en la cara extracel·lular i estaria lluny del lloc d'unió del substrat (Fig.17). Dels canvis polimòrfics, es va analitzar el possible impacte dels canvis R510C i Q237K, que estan situats a la cara intracel·lular i en una regió dintre de la membrana respectivament (Fig. 2).

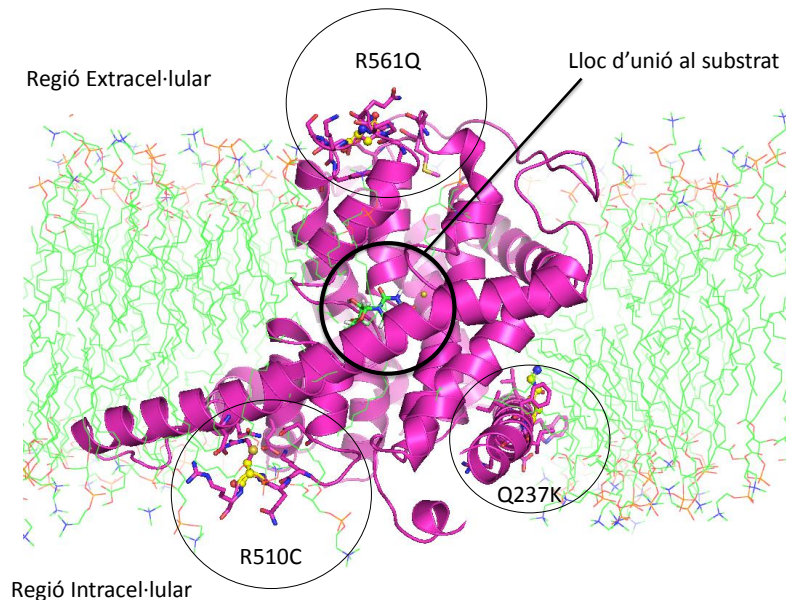


Figura 17. Predicció de l'estructura d'hCNT1 i localització dels canvis de residu estudiats.

Analitzant els canvis a escala molecular (Fig. 18), es va veure que els canvis d'aminoàcid podrien trencar algunes interaccions electrostàtiques importants. El canvi Q237K pot afectar el correcte posicionament del transportador a la membrana (representada en superfície) ja que implica l'aparició d'una càrrega positiva en una zona altament hidrofòbica en l'estructura cristall del transportador. L'arginina 510 interacciona amb l'aspàrtic 440 i la glutamina 461 de manera que manté la posició de les hèlixs a les quals pertanyen. La mutació a cisteïna trencaria el conjunt d'interaccions i podria dificultar el canvi conformacional. Pel que fa a l'arginina 561, estaria interaccionant amb l'aspàrtic 564, la metionina 333 i l'alanina 331 de manera que mantindria la posició de les hèlixs a les quals pertanyen. La mutació a glutamina trencaria el conjunt d'interaccions i també podria dificultar el canvi conformacional a l'hora de translocar el substrat.

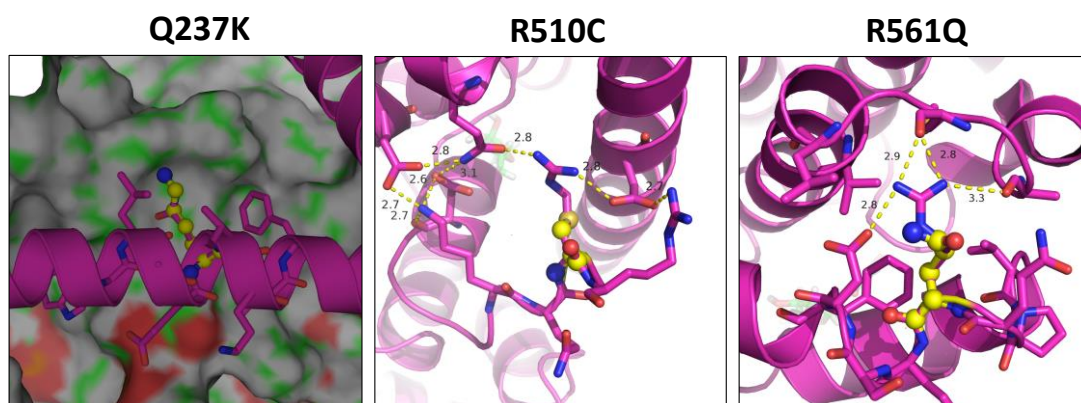


Figura 18. Predicció de les interaccions electrostàtiques de cada canvi d'aminoàcid.

A continuació, es va subclonar hCNT1 a partir de teixit hepàtic en un vector d'expressió eucariota (pcDNA3.1) per a poder fer un estudi funcional en cèl·lules en cultiu. Seguidament es van generar per mutagènesi dirigida els canvis d'aminoàcid R510C i R561Q per separat i conjuntament. Es va escollir estudiar el polimorfisme R510C junt amb la mutació ja que bioinformàticament ambdós canvis semblaven estar dificultant el canvi conformacional del transportador al realitzar la seva funció. Com s'observa en la Figura 19, el transportador *wild type* presenta gairebé el doble d'activitat que les variants que incorporen les respectives mutacions. Quant als nivells de proteïna, també veiem que s'expressa en major proporció que les variants mutades.

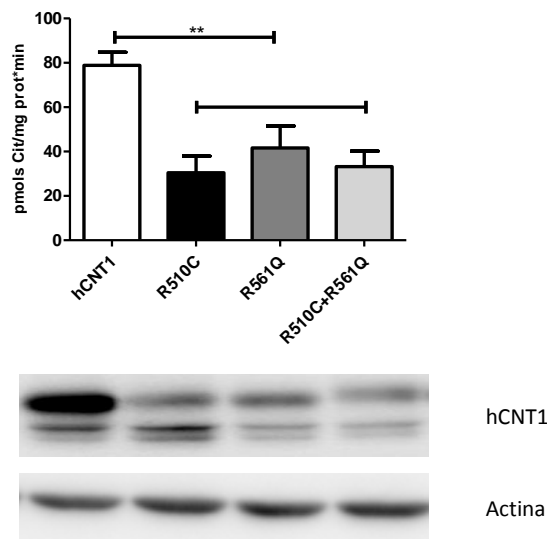


Figura 19. Activitat i nivells de proteïna hCNT1 de cada constructe. Transfecció transitòria dels constructes en la línia cel·lular HEK293 i mesura de l'activitat de transport (captació de citidina) i dels nivells de proteïna per *western blot* 48h després de la transfecció. Resultats expressats com: Mitjana \pm S.E.M. n=3.

També es van subclonar tots els constructes en el vector d'expressió pEGFP-C1 per poder fusionar GFP a l'extrem amino terminal i poder seguir la localització de cada proteïna. Es pot veure a la Figura 20 que el patró d'activitat és molt similar a l'obtingut sense la proteïna GFP fusionada però els valors absoluts d'activitat són lleugerament inferiors. Això pot ser perquè probablement la fusió de GFP pertorba l'activitat o bé que els nivells d'expressió són diferents ja que els promotors dels plasmidis són diferents. No es va poder subclonar satisfactòriament el constructe amb les dues mutacions. S'ha intentat repetir la subclonació sense èxit. Desconeixem el problema ja que les dianes de restricció utilitzades per a la subclonació no deuen donar problemes. Una altra opció per obtenir aquest constructe seria afegir per PCR altres dianes de restricció per subclonar-lo adequadament.

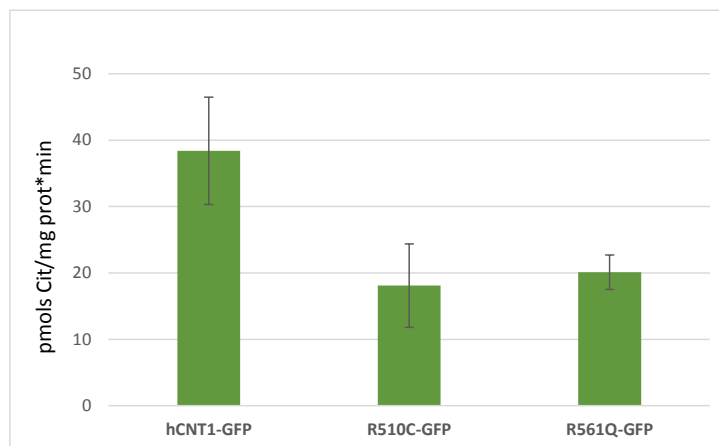


Figura 20. Activitat de hCNT1 de cada constructe fusionat amb GFP. Transfecció transitòria dels constructes en la línia cel·lular HEK293 i mesura de l'activitat 48h després de la transfecció. Resultats expressats com: Mitjana \pm S.E.M. n=2.

Al analitzar la localització cel·lular de cada constructe (Fig. 21) s'aprecia que el constructe hCNT1 està present a membrana. Pel que fa als mutants, R510C és el constructe que presenta menys marcatge a membrana, el que quadraria amb la menor activitat d'aquest constructe. El mutant R561Q es troba lleugerament més a membrana que R510C però no arriba als nivells del *wild type*. Per tal de determinar quantitativament els nivells dels diferents constructes a membrana s'hauria de tenir la membrana plasmàtica amb reactius com el WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) associat a un fluorocrom. Es va determinar l'expressió dels diferents constructes quantificant la intensitat de senyal en diferents cèl·lules mesurant els píxels per unitat d'àrea (Figura 22) i la tendència es correlaciona amb els valors d'activitat i expressió obtinguts per *western blot*, no obstant, les diferències no són significatives ja que els valors tenen una taxa d'error molt elevada a causa de la diferència d'intensitat entre distintes cèl·lules i el pla on s'analitzava.

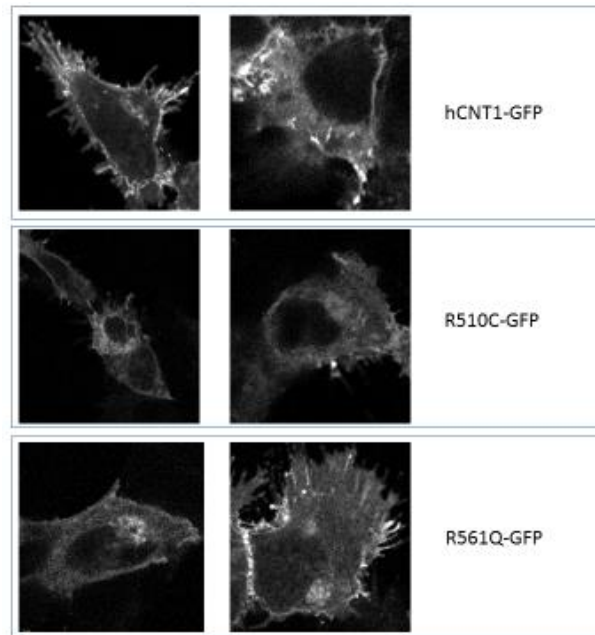


Figura 21. Localització subcel·lular dels constructes. Transfecció transitòria dels constructes fusionats amb GFP en la línia cel·lular HEK293. Immunocitoquímica realitzada 48h després de la transfecció. Imatges obtingudes amb el microscopi confocal Leica SPE, objectiu 63X.

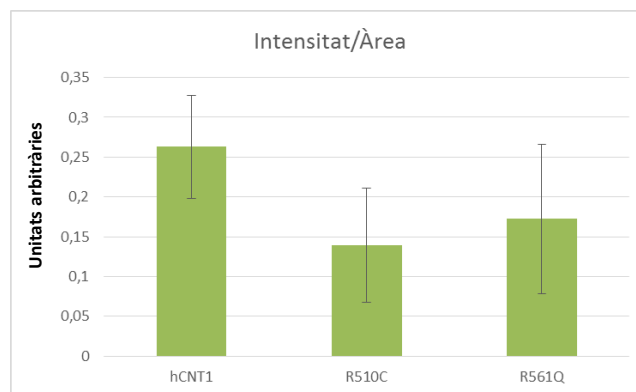


Figura 22. Determinació de l'expressió dels constructes. La intensitat de fluorescència de cada constructe es va determinar quantificant el nombre de píxels per unitat d'àrea. Càlcul realitzat amb el software lliure FIJI, quantificant els píxels per unitat d'àrea en un total de 10 cèl·lules de cada constructe.

Una de les hipòtesis que es van plantejar davant d'aquestes evidències experimentals va ser la possibilitat de que les mutacions causaren un plegament defectuós de la proteïna i això comportés una major degradació de la mateixa. Altra opció seria que aquests canvis d'aminoàcid no permeteren un canvi conformacional adequat del transportador al internalitzar el substrat, així, el recanvi proteic d'aquestes variants d'hCNT1 podria ser més ràpid i per això hi hauria menys quantitat de proteïna i, en conseqüència, menys activitat de transport. Hi ha nombrosos casos a la literatura científica on es demostra que diferents mutacions o variants d'*splicing* d'una proteïna presenten variacions en el recanvi i això afecta a l'expressió de la proteïna (Araki et al., 2014; Errasti-Murugarren et al., 2009; Nakagawa et al., 2011). A més, existeixen correlacions entre la velocitat de recanvi de les proteïnes que contenen mutacions i alguns paràmetres clínics de pacients amb problemes pituitaris (Hernández-Ramírez et al., 2016), glaucoma (Banerjee et al., 2016) o esclerosi lateral amiotròfica (ELA) (Araki et al., 2014) entre d'altres.

Per tal de demostrar si el recanvi proteic d'aquestes mutacions es veia afectat, en una primera aproximació es va analitzar la vida mitja d'aquestes proteïnes mitjançant un assaig d'inhibició de la síntesi proteica amb cicloheximida. Aquest antibiòtic produït pel bacteri *Streptomyces griseus* actua inhibint la translocació dels tRNA, bloquejant així l'elongació de la síntesi proteica. En una primera aproximació, es va realitzar un tractament de vuit hores i es va analitzar per *western blot* la quantitat total de proteïna (Figura 23).

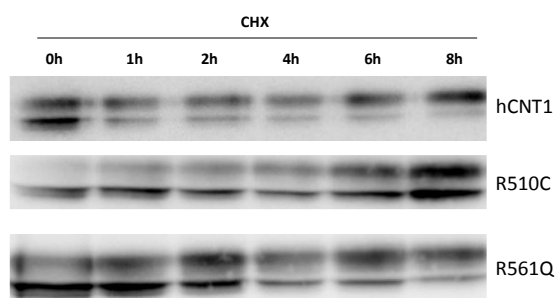


Figura 23. Determinació de l'expressió dels constructes en funció del temps. Transfecció transitoria dels diferents constructes en la línia HEK293, a les 24h post-transfecció s'atura la síntesi proteica amb cicloheximida (CHX) (20 µg/mL) i s'analitza per western blot la presència de cada constructe.

Com s'observa en la figura 23, el marcatge d'hCNT1 és un doblet i s'observa una reducció de la banda inferior però no de la superior al inhibir la síntesi proteica. De fet, semblaria que la banda superior s'enriqueixi al llarg del tractament. Al no poder determinar la diferència entre les dues bandes (que podria tractar-se de dues isoformes d'hCNT1 amb diferents modificacions postraduccionals) i no sabíem quina de les dues bandes tenir de referència es va decidir treballar amb els constructes fusionats amb GFP i es va mesurar per citometria de flux la intensitat de la fluorescència de GFP en funció del temps un cop aturada la síntesi proteica (Figura 24). Aquest mètode resulta més sensible que la mesura per *western blot* ja que estem mesurant la intensitat de fluorescència de cada cèl·lula individualment i això ens donarà un valor d'expressió més acurat.

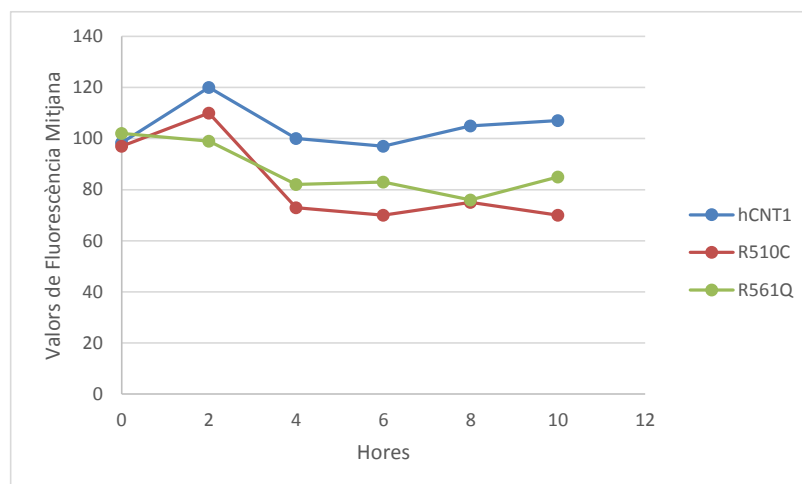


Figura 24. Fluorescència mitjana de les cèl·lules transfectades amb cada constructe. Transfecció transitòria dels diferents constructes en la línia HEK293, a les 24h post-transfecció s'atura la síntesi proteica amb cicloheximida (20 µg/mL) i s'analitza per citometria de flux la fluorescència mitjana de les cèl·lules. n=1.

Com es pot veure en la Figura 24, ambdues mutacions semblen degradar-se més ràpidament que la proteïna *wild type* ja que, després de 10 hores de tractament amb cicloheximida, la fluorescència mitjana de les mutacions s'ha reduït un 20% respecte a l'inici mentre que la fluorescència de la proteïna *wild type* ha romàs constant. En les primeres dues hores de tractament, la sobreexpressió encara és més potent que la

inhibició de la síntesi proteica i tenim un lleuger augment de la fluorescència. En canvi, conforme transcorre el temps del tractament, la fluorescència en el cas de les mutacions decau lleugerament i la fluorescència de la proteïna *wild type* és la mateixa. De tota manera, s'han d'analitzar temps més llargs amb la síntesi proteica inhibida per confirmar que les proteïnes mutades s'acaben degradant totalment abans que la proteïna normal. Altra cosa que sobta d'aquest resultat és que hi hagi uns ritmes de degradació tan lents, ja que està descrit que per a hCNT3 la vida mitja es troba al voltant de les 8 hores (Errasti-Murugarren et al., 2009). Una possible explicació a aquesta observació podria ser que la degradació de la fluorescència és més lenta perquè la proteïna GFP és molt estable per la seva estructura secundària compacta (Li et al., 1998; Mateus & Avery, 2000). Alternativament, hCNT1 podria ser més estable que altres membres de la família hCNT i la seva vida mitja és més llarga. Per tal de saber si el tag GFP està influïent en la vida mitja de la proteïna s'hauria de determinar per *western blot* l'expressió dels dos constructes en funció del temps.

En una segona aproximació, es va realitzar el tractament de cicloheximida unes 40 hores post-transfecció (enlloc de 24 hores) per tenir més quantitat de proteïna sintetitzada i es va doblar la concentració de cicloheximida (40 µg/mL) per tal de que la inhibició de la síntesi proteica fos més acusada.

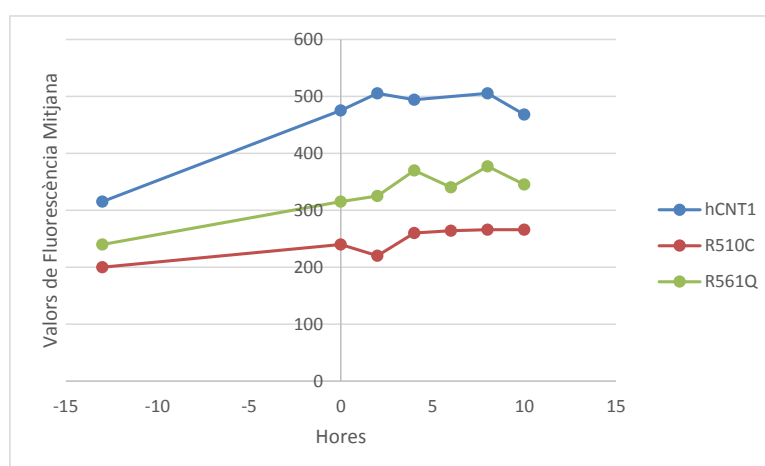


Figura 25. Fluorescència mitjana de les cèl·lules transfectades amb cada constructe de hCNT1. Transfecció transitòria dels diferents constructes en la línia HEK293, a les 40h post-transfecció (t=0 hores) s'atura la síntesi proteica amb cicloheximida (40 µg/mL) i s'analitza per citometria de flux la fluorescència mitjana de les cèl·lules. n=1.

Com s'observa a la Figura 25, abans de tractar amb cicloheximida hi ha més quantitat d'hCNT1 *wild type* que dels mutants i aquesta diferència s'incrementa amb el temps (de -13 hores fins 0 hores). Un cop afegim la cicloheximida, l'increment de la intensitat de la fluorescència s'atura i roman constant al llarg del tractament. Aquest resultat és difícil d'interpretar ja que esperariem que la fluorescència anés disminuint per la degradació de les diferents proteïnes. Podria ser que la cicloheximida no estigués inhibint la síntesi proteica d'una manera eficient, encara que hem emprat una concentració més elevada en comparació a altres treballs (Errasti-Murugarren et al., 2009; Fernández-Calotti et al., 2016). Morfològicament sí que sembla que la cicloheximida està exercint un efecte tòxic sobre les cèl·lules ja que anaven morint al llarg del tractament. Podria ser que davant d'uns nivells tan elevats de la proteïna fós més difícil de detectar la degradació o bé estem davant de proteïnes molt estables. Per tal d'esbrinar alguna d'aquestes incògnites s'hauria de tenir algun control intern de que la inhibició de la síntesi proteica s'està donant, per exemple, es podria mesurar una proteïna de temps de vida mitja curt. També es deurien mesurar els valors de degradació a temps més llargs de tractament, fins arribar a les 24h almenys, per veure si ens trobem davant de proteïnes amb vida mitja més llarga. Malgrat no s'ha pogut determinar un valor de vida mitja concret per a cada constructe, si que s'observa una diferència entre la relació síntesi/degradació dels diferents constructes i això pot ser causat per la desestabilització que provoquen els canvis d'aminoàcid. Per motius temporals no s'ha pogut realitzar cap assaig més però, per resoldre les diferents incògnites, el projecte continuarà en les mans d'un altre membre del grup de recerca. Les següents aproximacions a dur a terme seran analitzar el perfil d'expressió de cada constructe des de l'inici de la transfecció fins al pic d'expressió (unes 40 hores post-transfecció), en funció d'aquest perfil, s'escollirà el punt més adient per iniciar el tractament amb cicloheximida. La millor condició que se'ns ocorre per fer la inhibició de la síntesi proteica és gairebé a l'inici de la transfecció quan els valors d'expressió aparentment són més semblants entre els tres constructes. A partir d'aquest punt esperem poder demostrar que la degradació dels mutants és més ràpida.

Un cop determinats els valors de vida mitja dels constructes, s'intentarà esbrinar si la degradació proteica es dona per la via del proteasoma o per la via lisosomal. També

s'estudiarà si el tractament amb inhibidors del proteasoma (com MG132) o inhibidors de la degradació lisosomal o autofàgica (com la hidroxicloroquina) poden ser efectius per a restaurar la funció de la proteïna tal i com ja s'ha descrit per a altres proteïnes (Cebotaru et al., 2014). De fet, ja s'han realitzat diversos assajos clínics amb fàrmacs inhibidors del proteasoma (Einsele, 2014; Obrist et al., 2014), de la degradació lisosomal (Wolpin et al., 2014) o combinacions dels dos (Vogl et al., 2014) per al tractament de diferents tipus de malalties on la degradació d'alguna proteïna es veu alterada. Aquests tipus de tractaments recuperen l'expressió de proteïnes que estan afectades per una major degradació. No obstant, es tracta d'una teràpia insuficient ja que es desenvolupen mecanismes de resistència, però sí que és un tractament útil quan s'utilitza en combinació amb fàrmacs que tinguin altres dianes (Wang et al., 2015).

La rellevància d'aquest estudi en un context fisiològic és difícil d'extrapolar, ja que el treball s'ha realitzat en una línia cel·lular renal on s'ha sobreexpressat la proteïna d'interès. Està descrit que CNT1 es troba en el ronyó junt als altres CNTs (Elwi et al., 2006), més concretament en el túbul contornejat proximal, on es dona l'absorció d'ions i soluts orgànics (Figura 26) (Pastor-Anglada et al., 2007; Rodríguez-Mulero et al., 2005). Podria ser que si es redueix l'expressió d'hCNT1 a la meitat com hem observat, es reduïu la recuperació i, per tant, provoqués una pèrdua notable de nucleòsids per l'orina. Llavors, els nucleòtids haurien de ser sintetitzats principalment per la via *de novo*, amb el cost energètic que suposa per a l'organisme respecte a la via de recuperació (*salvage*). Aquesta desregulació en els nivells de citidina i uridina podria causar una desregulació en el ronyó que podria provocar alguna lesió a l'òrgan com la necrosi cortical aguda detectada, amb una consegüent fallida renal. La fallida renal pot provocar problemes en el balanç àcid-base de l'organisme (Andreoli, 2009), el que podria lligar amb l'acidosi làctica que presentava el pacient. De fet, en un model de diabetis en rata, s'observà una pèrdua d'expressió dels CNTs al ronyó i això podria ser una explicació a la nefropatia desenvolupada amb diabetis (Rodríguez-Mulero et al., 2005). De manera que sembla que la correcta expressió dels transportadors de nucleòsids està lligat a un funcionament renal adequat. Els possibles tractaments terapèutics un cop està desenvolupada la fallida renal aguda (*Acute Kidney Injury* en anglès) són el transplantament de ronyó i la diàlisi (Andreoli, 2008, 2009).

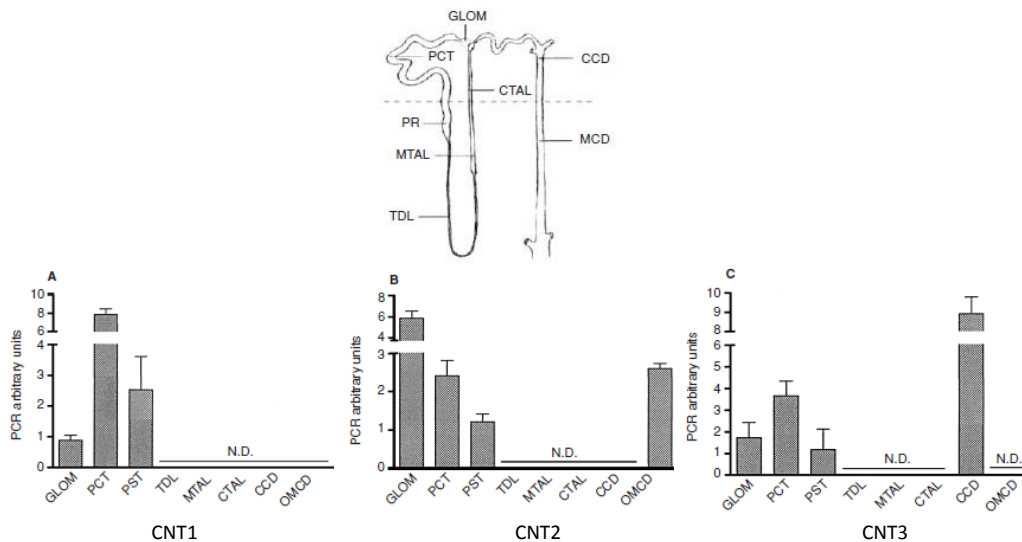


Figura 26. Perfil d'expressió dels transportadors de nucleòsids en la nefrona. Figura adaptada de Rodríguez-Mulero et al., 2005

En el ronyó també hi ha expressió de hCNT2 i hCNT3 (Young et al., 2013) que poden captar uridina i citidina amb elevada afinitat. Resultaria lògic pensar que aquestes dues proteïnes podrien compensar en certa mesura la reabsorció d'aquests dos nucleòsids. Però en un model de nefrona de rata està descrit que la localització d'aquests transportadors és més distal (en comparació a CNT1 que és més proximal) i podrien estar regulant la recaptació d'adenosina (Fig. 26) (Rodríguez-Mulero et al., 2005). L'adenosina és un dels principals reguladors d'aquest òrgan, regulant múltiples processos com la retroalimentació tubuloglomerular (*tubuloglomerular feedback*), que és el mecanisme pel qual canvien el processos d'absorció en funció de les concentracions d'electròlits (Vallon et al., 2006). Podria succeir que aquests dos transportadors estiguessin saturats d'adenosina i no poguessin compensar la manca d'activitat de CNT1.

Malgrat que ja existien descrites dues variants polimòrfiques d'hCNT1 amb pèrdua total de funció transportadora, aquestes variants es trobaven en heterozigosi i hi havia una còpia del transportador que funcionava correctament. De fet, aquest estudi genètic està fet amb un banc de DNA de població sana, per tant, no presentaven cap fenotip de malaltia per ser portadors d'aquestes mutacions en heterozigosi (Gray, et al., 2004). En el cas clínic estudiat, com que no es va poder fer cap biòpsia al pacient ni als

pares, no sabem si el malalt tenia alterades les dues còpies del gen que codifica per a hCNT1 o només en un dels cromosomes. Per a esbrinar quin és l'efecte dels canvis detectats en el pacient, seria interessant generar un model *in vivo* on es poguessin introduir tots els canvis de residu trobats per a hCNT1 i observar el fenotip i la fisiologia que presenta el model. Potser que la combinació de tots els canvis acumulats resulta en una caiguda total de funció que explicaria el fenotip del pacient. També podria ocórrer que les alteracions estiguessin en cromosomes diferents i, per tant, ambdues còpies tindrien activitat disminuïda.

Altra possible explicació seria pensar que la mutació no només està afectant a la funció transportadora d'hCNT1, sinó que potser està modificant la capacitat transceptora descrita. Com s'ha demostrat per a línies d'adenocarcinoma pancreàtic, hCNT1 produïa canvis fenotípics com la inducció de mort cel·lular, canvis en el cicle cel·lular i una reducció de la migració. La mutació S546P, sense activitat transportadora, també provocava els mateixos canvis (Pérez-Torras et al., 2013). Potser els canvis d'aminoàcid R510C o R561Q poden generar algun canvi en aquest tipus de senyalització i provocar que hCNT1 indueixi uns canvis fenotípics diferents. Per tal d'analitzar-ho, s'haurien de generar els constructes adenovirals amb els canvis d'aminoàcid per poder transduir les línies cel·lulars on s'ha descrit l'activitat transceptora d'hCNT1.

2. Estudi de la funció del domini N-terminal d'hCNT1 i la possible implicació en la biologia tumoral.

Com ja s'ha esmentat a la introducció, l'estructura predita en base a models bioinformàtics (Sonnhammer et al., 1998) per a la família gènica SLC28 (CNT-*Concentrative Nucleoside Transporter*) fins fa pocs anys era de 13 dominis transmembrana amb un domini N-terminal intracel·lular i un C-terminal extracel·lular (Pastor-Anglada et al., 2008). No obstant, la cristal·lització del primer transportador de nucleòsids concentratiu de *Vibrio cholerae* (vcCNT) (Johnson et al., 2012) va aportar nova informació per replantejar el model existent. L'elevada homologia que presenta el transportador vcCNT amb els seus ortòlegs humans (per exemple, l'homologia amb hCNT3 és d'un 38%) va permetre establir un model lleugerament diferent a l'anterior. L'estructura cristal·lina de l'ortòleg de *Vibrio cholerae* prediu 8 dominis transmembrana, de manera que si s'afegeixen els tres dominis transmembrana extra que hi ha en els organismes eucariotes, el model quedaria amb 11 dominis transmembrana i els extrems N-terminal i C-terminal en les regions intracel·lular i extracel·lular respectivament (Figura 27). Els residus d'unió a uridina estan localitzats als dominis HP1 i HP2. El lloc d'unió a sodi es troba entre el domini HP1 i el domini transmembrana 4. Pel que fa al segon lloc d'unió a sodi que existeix en hCNT3 encara no ha sigut identificat (Young et al., 2013).

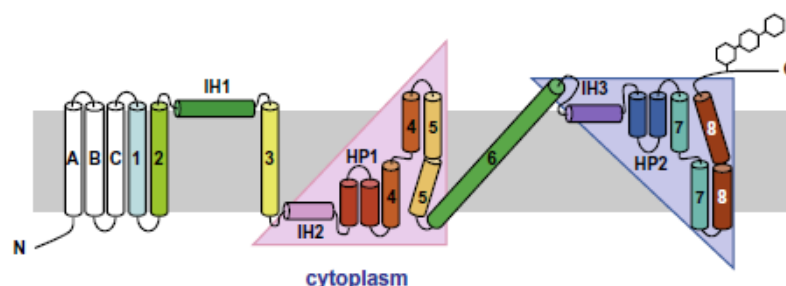


Figura 27. Topologia predita per a CNT2 a partir del model de: Johnson et al., 2012. Figura adaptada de: Young et al., 2013

El domini N-terminal intracel·lular i els següents tres dominis transmembrana només es troben en eucariotes i semblaria ser una adquisició evolutiva ja que els ortòlegs procariotes no tenen aquesta part (Hamilton et al., 2001). També hi ha evidències experimentals que demostren que aquesta regió N-terminal no és estrictament necessària per l'activitat del transportador ja que mutants truncats per a aquesta regió encara conserven una activitat residual de transport (Hamilton et al., 2001). Tot açò podria suggerir que ens trobem davant d'un domini que podria tenir funcions reguladores mitjançant la interacció amb altres proteïnes o bé podria estar regulant la senyalització i tràfic a membrana com ja s'ha descrit per als altres membres de la família: hCNT2 i hCNT3 (Errasti-Murugarren et al, 2010a; Pinilla-Macua et al., 2012; Young et al., 2013). Cal tenir en compte que aquest domini N-terminal es tracta d'un domini relativament gran, segons prediccions bioinformàtiques (*topcons.cbr.su.se*) està al voltant dels 80 aminoàcids per a hCNT1, el que suposa un 12% dels residus de la proteïna total. A més, el que resulta interessant és que es tracta d'un domini molt soluble (més de la meitat dels residus són polars i/o amb càrrega) i sense cap estructura predita, el que li estaria conferint unes característiques de domini amb relativa flexibilitat. Com ja s'ha esmentat, en el grup de recerca es va descobrir que la restauració de l'expressió d'hCNT1 en línies d'adenocarcinoma pancreàtic influïa en diversos aspectes relacionats amb la biologia tumoral com la migració, el cicle cel·lular i la mort cel·lular. El que resultava sorprenent era que aquest efecte era independent de la seva capacitat de translocar el substrat ja que un mutant sense activitat també generava aquesta resposta (Pérez-Torras et al., 2013). Donat que la resposta cel·lular era independent de l'activitat del transportador es va deduir que, d'alguna manera fins al moment desconeguda, la presència d'hCNT1 generava aquesta resposta. Es va analitzar si els altres hCNTs generaven una resposta semblant al ser transduïts a les línies cel·lulars. Com que s'havia descrit que al transduir hCNT1 es generava una activació de la via Akt, es va analitzar la fosforilació d'Akt en funció de la transducció dels diferents hCNTs. Com s'observa en la Figura 28, es tracta d'una reacció específica d'hCNT1 i no dels altres hCNTs.

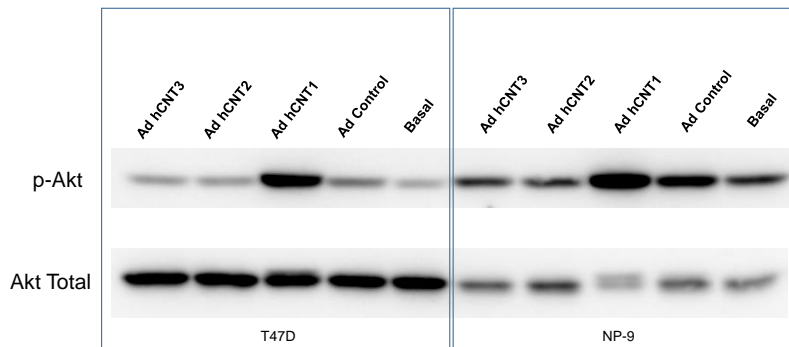


Figura 28. Anàlisi de l'activació de la via de senyalització Akt després de transduir els diferents membres de la família hCNT a dues línies cel·lulars: T47D i NP-9. Transducció dels diferents hCNTs durant 48h en les línies cel·lulars T47D i NP-9 i posterior anàlisi de l'activació d'Akt per detecció de les formes fosforilades per *western blot* en comparació amb la proteïna total.

Totes aquestes evidències van portar a suggerir la hipòtesi de que el domini N-terminal podria estar actuant com a regió d'interacció amb altres proteïnes que regulin el transportador o es podria estar formant un complex proteic amb funcions diferents al transport de nucleòsids. Donada la singularitat del domini, es va proposar la hipòtesi de que aquest domini N-terminal podria ser el responsable d'aquestes implicacions en biologia tumoral demostrades per a hCNT1 i no per als altres membres de la família. Com que està descrit que la informació de la localització subcel·lular de la proteïna es troba en l'extrem amino terminal (Kunze & Berger, 2015) no es va optar per fer una proteïna truncada sense el domini N-terminal com ja s'havia fet anteriorment per a hCNT3, ja que aquests constructes mutants no arribaven eficientment a la membrana plasmàtica (Errasti-Murugarren et al., 2010a). L'estratègia que es va seguir va ser generar proteïnes quimèriques, ja que està descrit que són una eina de gran utilitat en l'estudi funcional de dominis proteics concrets. De fet, hi ha estudis amb proteïnes quimèriques fets amb membres de la família SLC28 i SLC29 que han permès determinar la funció de certs dominis implicats en l'especificitat de substrat (Yao et al., 2002; Zhou et al., 2007). Les quimeres que es van dissenyar per al nostre objectiu es van generar bescanviant els dominis N-terminal entre hCNT1 i hCNT2, hCNT3 i un altre transportador que no fos de la família SLC28: hOCT1, que pertany a la família SLC22. Com que l'adquisició evolutiva dels hCNTs respecte l'ortòleg procariota *NupC* són els últims tres

dominis transmembra i l'amino terminal (Hamilton et al., 2001), també es va fer una construcció amb només aquesta regió de la proteïna per veure si només aquesta regió generava algun tipus d'efecte (Fig. 29). Amb la intenció de poder expressar els constructes quimèrics al major nombre de línies cel·lulars possible i, fins i tot, amb la possibilitat de fer-ho a un model *in vivo*, es va decidir generar aquestes construccions en vectors adenovirals.

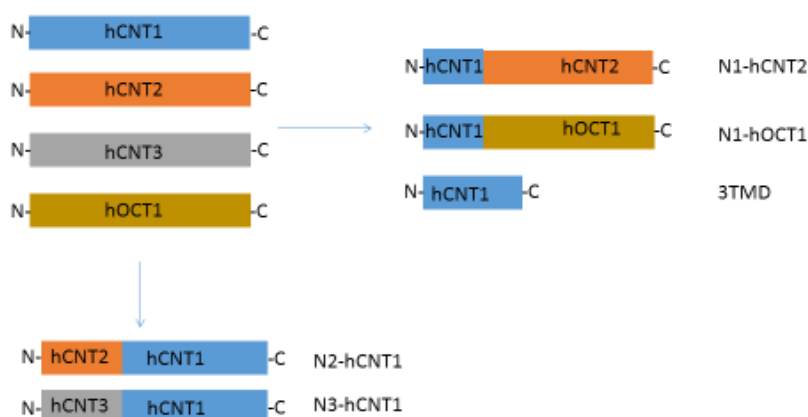


Figura 29. Esquema de les proteïnes quimèriques generades i la seva nomenclatura

Abans de generar els constructes adenovirals, primerament es van clonar les proteïnes quimera en vectors d'expressió eucariota per comprovar la seva funcionalitat. La generació d'aquestes proteïnes quimèriques es va realitzar mitjançant el mètode de *crossover PCR* (descriu a la secció Materials i Mètodes) i es van clonar en el vector d'expressió pcDNA3.1 entre les dianes de restricció KpnI i NotI i es va procedir a avaluar la seva funcionalitat a nivell de localització i activitat. Aquesta primera validació funcional es va realitzar mitjançant transfeccions transitòries en HEK293. Quan es van generar aquestes construccions quimèriques també es va afegir una etiqueta d'expressió (HA) que es va incorporar a l'extrem C-terminal per tal de poder seguir l'expressió i localització dels constructes. Com podem observar a les imatges de microscòpia confocal (Fig. 30), els constructes presenten localització a membrana com es pot esperar d'un transportador, excepte el constructe 3TMD que queda retingut intracel·lularment (Fig. 30.6). Per tant, semblaria que totes les proteïnes quimèriques es

comporten de la manera esperada quant a la seva localització, llevat de la construcció 3TMD. Açò no sorprèn ja que es una part molt petita de la proteïna que no es sap com es processarà al ser sintetitzada i semblaria que queda en forma d'agregats dintre de la cèl·lula.

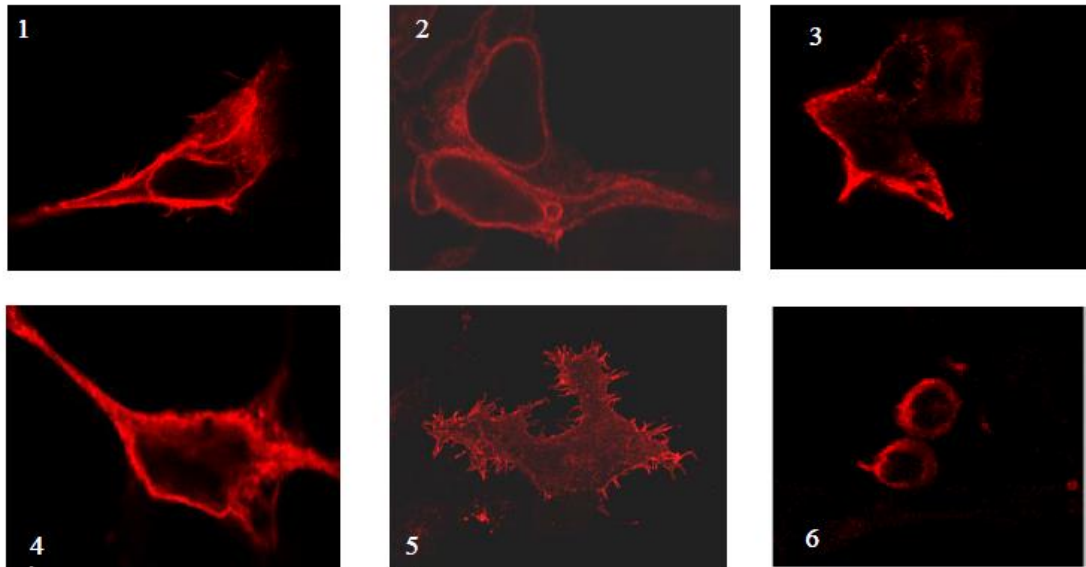


Figura 30. Localització subcel·lular dels constructes quimèrics. Es va realitzar una transfecció transitòria dels diferents constructes quimèrics en HEK293 i es va analitzar per immunocitoquímica la seva localització subcel·lular. 1) hCNT1-HA, 2) N1-hCNT2, 3) N1-hOCT1, 4) N2-hCNT1, 5) N3-hCNT1., 6) 3TMD. Objectiu 63x.

Pel que podem observar a les Figures 31 i 32, totes les construccions quimèriques són funcionals llevat de la que té el cos d'hOCT1 i l'extrem N-terminal d'hCNT1 (N1-hOCT1) i la 3TMD. La construcció 3TMD, com era d'esperar no presenta activitat ja que quedava retinguda intracel·lularment i a més, els dominis responsables de l'activitat de transport es troben en la resta de la proteïna. Pel que fa a la construcció N1-hOCT1 s'han bescanviat dos dominis amb grandàries molt diferents: l'extrem N-ter de hCNT1 és d'uns 80 aminoàcids mentre que el d'hOCT1 només té uns 20 residus (Shu et al., 2003), això pot comportar problemes estèrics per a la proteïna. Aquest canvi podria estar influïnt en aspectes com l'oligomerització d'hOCT1, que es dona en una regió propera al domini N-terminal (Keller et al., 2011). Si es volgués treballar amb una proteïna diferent de la família hCNT s'hauria de seleccionar un altre candidat amb un extrem amino terminal

intracel·lular i d'una grandària semblant. Respecte a la resta de construccions, són actives encara que presenten una lleugera caiguda d'activitat que no és significativa.

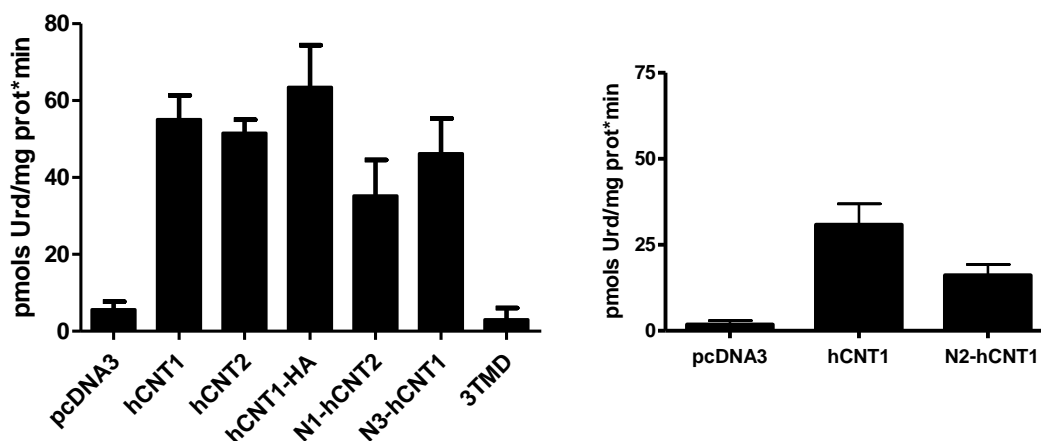


Figura 31. Transport dependent de sodi d'uridina marcada. Es va realitzar una transfecció transitòria dels diferents constructes quimèrics i els transportadors en la línia cel·lular HEK293 i 48h més tard es va analitzar l'activitat de transport dels mateixos. Resultats expressats com: Mitjana \pm S.E.M. n=3.

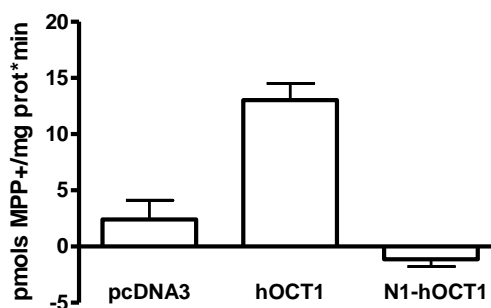


Figura 32. Captació d'MPP⁺ dels constructes hOCT1 i N1-hOCT1. Es va realitzar una transfecció transitòria dels constructes en HEK293 i 48h més tard es va analitzar l'activitat de transport dels mateixos. Resultats expressats com: Mitjana \pm S.E.M. n=3.

El següent pas va ser generar els constructes adenovirals recombinants. Per tal de generar-los es va seguir el sistema AdEasy™ XL Adenoviral Vector System (Agilent Technologies) descrit a la secció de Materials i Mètodes. Es va aconseguir amplificar els adenovirus recombinants i les titulacions obtingudes han sigut:

Adenovirus	TU/mL
pShuttle	$4,2 \times 10^{-10}$
hCNT1HA	$1,4 \times 10^{-10}$
N1-hCNT2	4×10^{-10}
N2-hCNT1	2×10^{-9}
N3-hCNT1	8×10^{-9}
3TMD	6×10^{-10}

Taula 6. Titulació dels adenovirus recombinants. Es va realitzar una dilució seriada del constructe adenoviral i una posterior infecció en cèl·lules HEK293. Es van comptar les cèl·lules infectades mitjançant immunocitoquímica emprant l'anticòs anti 2Hx-2 que s'uneix contra un epítip adenoviral (una proteïna de l'hexó). Titulació expressada com: TU(Transduction Units)/mL.

El pas d'amplificació dels adenovirus va portar una sèrie de complicacions ja que en els primers assajos no es varen aconseguir títols elevats. Després de canviar la línia cel·lular i algun paràmetre com la proporció de FBS es va aconseguir que s'amplificaren. Els adenovirus presenten una concentració elevada que permetrà fer una gran varietat d'experiments, excepte el constructe quimèric de l'amino terminal d'hCNT1 i el cos d'hOCT1, que no va poder ser amplificat ja que s'obtenien títols molt baixos amb els quals no es podia treballar.

Els passos a seguir seran validar els constructes adenovirals i testar la seva capacitat de generar els efectes descrits per a hCNT1. Aquest projecte està essent continuat en el marc d'una altra tesi doctoral d'un altre membre del grup de recerca. Resultats preliminars de la investigadora en formació Sandra Moro (Figura 33) ens mostren que només observem una activació de la via d'Akt al transduir hCNT1HA mentre que la resta de proteïnes quimèriques no sembla activar-la. No obstant, hi ha dos constructes (N2-hCNT1 i 3TMD) que no hem pogut constatar que s'hagin expressat correctament. També s'observa que quan afegim el domini N-terminal d'hCNT1 al cos d'hCNT2 (N1-hCNT2) no activa la via, per tant, sembla que només amb aquest domini no és suficient per desencadenar les funcions transceptores d'hCNT1. Per altra banda, en el cas on hem afegit l'amino terminal d'hCNT3 en el cos d'hCNT1 (N3-hCNT1) es perd la capacitat d'activar la via Akt, per tant, aquest domini per si sol no és capaç de generar les funcions accessòries d'hCNT1 en altres proteïnes però sembla que sense ell tampoc

es poden donar. Per tant, aquest resultat preliminar suggeriria que estem davant d'un domini essencial per a les funcions accessorïes dels transportadors de nucleòsids.

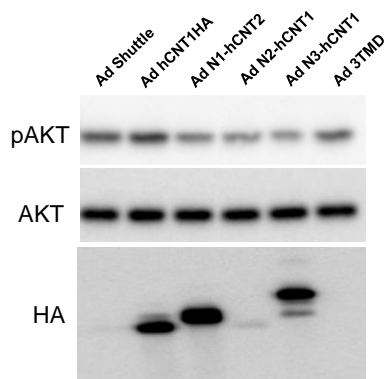


Figura 33. Transducció dels adenovirus recombinants. Es va realitzar transducció de 50 MOI de cada constructe en la línia cel·lular NP-9 durant 48h. A continuació, es van lissar les cèl·lules per obtenir els extractes proteics i es va analitzar l'activació de la via d'Akt per immunodetecció de la forma fosforilada d'Akt en relació a la proteïna total. L'expressió dels constructes es va determinar per immunodetecció de l'epítip HA. n=1.

La importància d'aquest estudi recau en esbrinar si les funcions accessorïes al transport de nucleòsids que s'han descrit per als transportadors concentratius de nucleòsids (Huber-Ruano et al. 2010; Pérez-Torras et al. 2013; Godoy et al. 2014) resideixen en aquest domini que han adquirit evolutivament respecte dels seus ortòlegs procariotes. Es tractaria d'una evidència més de com els organismes eucariotes presenten una major complexitat biològica respecte els procariotes (Vellai & Vida, 1999). El que s'ha pogut observar és que aquest domini sol no és capaç de generar les funcions transceptores, però que és essencial per a que es donin. Llavors estem davant d'una evidència clara de que el domini és important però es necessita la proteïna sencera per desencadenar les respostes cel·lulars addicionals a la capacitat de transportar, és a dir, la funció com a transceptor (Figura 34) (Thevelein & Voordeckers, 2009). De fet, cada cop hi ha més evidències (Lacoste et al., 2012; Tanaka et al., 2014; L. Zheng et al., 2016) que suggereixen que els transportadors en general no només es limiten a internalitzar o expulsar el seu substrat de la cèl·lula sinó que generen senyals dintre de la cèl·lula que la predisposarien a canvis adaptatius en funció de l'arribada

d'una biomolècula concreta, de manera que l'adaptació de la cèl·lula a canvis externs seria més ràpida i eficient.

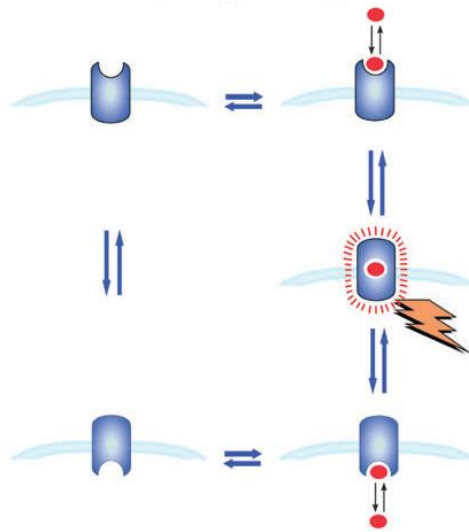


Figura 34. Esquema de funcionament d'un transceptor. Figura adaptada de Thevelein & Voordeckers, 2009.

3. Identificació de l'interactoma proteic d'hCNT1 i estudi de la funció biològica del mateix.

3.1 Interacció hCNT1-prosaposina

Els assajos de doble híbrid clàssics per trobar proteïnes d'interacció només permeten fer el cribratge amb proteïnes solubles que puguin arribar a nucli (Snider et al., 2015). Aquesta limitació és de gran importància per a treballar amb proteïnes de membrana plasmàtica, ja que al estar ancorades a ella, no és possible realitzar aquest assaig amb la proteïna sencera. Per a solucionar-ho, es va decidir estudiar les interaccions de proteïnes de membrana a partir de només un domini, que havia de ser intracel·lular i soluble. Per al cas dels hCNTs, el domini N-terminal compleix aquests requisits. A més, la seva relativa grandària (suposa una cua entre 82 i 103 aminoàcids en proteïnes de més de 600 residus) i la manca d'una estructura secundària rígida i definida li podria conferir la capacitat d'interaccionar amb altres proteïnes, tal i com s'ha observat per a altres proteïnes amb dominis flexibles i desordenats (Figura 35). A més, això suggeriria que el domini pot servir com a nucli (*hub*) on altres proteïnes podrien interaccionar per realitzar algun tipus de funció cel·lular com està descrit per a altres proteïnes de membrana com CFTR (*Cystic Fibrosis Transport Regulator*) (Kunzelmann & Mehta, 2013).

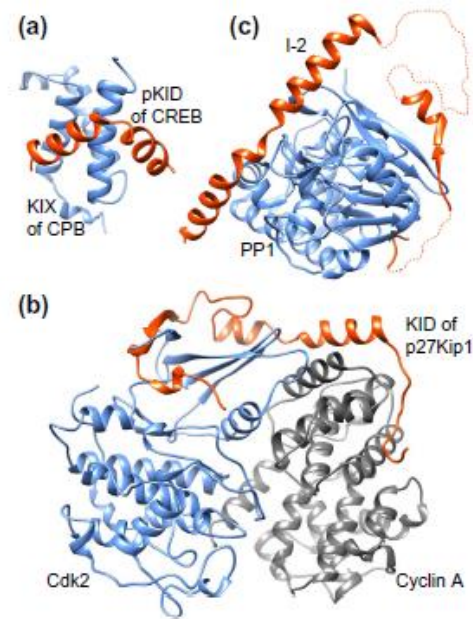


Figura 35. Exemples de dominis amb flexibilitat i desordre intrínsec dintre de complexos proteics. a) Plegament induït del domini sense estructura pKID de la proteïna CREB (Taronja) en la unió al domini KIX de la proteïna CPB (Blau). b) Unió del domini amb desordre intrínsec KID de la proteïna p27Kip1 a la Ciclina A i Cdk2. c) I-2 (Taronja) roman desordenada mentre s'uneix a PP1 (Blau). Els dominis intrínsecament desordenats estan representats per una línia discontinua i no són visibles per l'estructura cristal·lina. Extret de Srihari et al., 2015

En treballs realitzats anteriorment en el grup de recerca, es va dur a terme un assaig de doble híbrid bacterià (*bacterial two-hybrid*) per trobar proteïnes d'interacció amb l'amino terminal d'hCNT1. Aquest mètode té l'inconvenient de que es realitza en un organisme procariota i amb només un domini concret de la proteïna d'interès, però permet analitzar un gran nombre de positius en poc temps i el sistema dona menys falsos positius que l'homòleg en llevats (Joung et al., 2000). Un cop realitzat aquest rastreig, entre d'altres positius, es va detectar prosaposina com a possible proteïna d'interacció amb hCNT1 i es va confirmar la interacció per un doble híbrid dirigit (Tesi Doctoral-Pedro Cano Soldado). Prosaposina és una glicoproteïna implicada en diversos processos cel·lulars com l'adhesió, invasió, migració i metàstasi (Campana et al., 1999; Hu et al., 2010; Kang et al., 2009; Sun et al., 2010). A causa d'aquesta relació amb la biologia cel·lular del càncer, es va decidir estudiar la possible interacció amb hCNT1, que també ha estat descrita com una proteïna que pot regular algun d'aquests processos (Pérez-Torras et al., 2013). En una primera aproximació es va decidir validar la interacció amb mètodes com la co-immunoprecipitació i la co-immunolocalització. Com que les

línies cel·lulars analitzades no presenten expressió detectable d'hCNT1 ja que es perd l'expressió en línies immortalitzades (Pastor-Anglada et al., 2008), el model d'estudi per dur-ho a terme va ser la línia HEK293-hCNT1, generada al laboratori i que expressa de manera estable el transportador. També es va corroborar que expressés de manera endògena prosaposina. Primerament es va realitzar un assaig per immunoprecipitar prosaposina (Fig. 36) i es pot observar que s'arrossegava de manera específica amb l'anticòs però no amb les IgGs de conill inespecífiques.

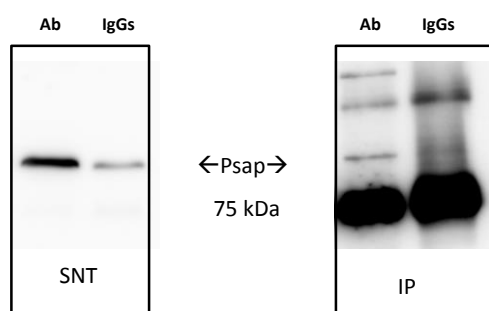


Figura 36. Immunoprecipitació contra prosaposina. Prosaposina va ser immunoprecipitada en un extracte proteic de HEK-hCNT1 amb l'anticòs específic contra prosaposina (Ab) o amb IgGs de conill com a control. La mostra va ser analitzada per *western blot*. SNT: Sobrenedant. IP: Immunoprecipitat.

Quan vam analitzar si hCNT1 co-immunoprecipitava amb prosaposina (Fig. 37), no es va aconseguir observar que es co-immunoprecipités de manera específica ja que hCNT1 s'arrossegava tant amb l'anticòs específic contra prosaposina com amb les IgGs inespecífiques, el que invalidava la unió específica d'hCNT1 i prosaposina en aquests assajos. També vam intentar fer la co-immunoprecipitació inversa, precipitant el transportador i analitzant si s'arrossegava conjuntament prosaposina. Però l'anticòs monoclonal contra hCNT1 del que disposàvem, que havia estat generat al laboratori, tot i que funciona correctament per a immunodetecció per *western blot*, no va funcionar per a fer immunoprecipitacions, almenys amb les condicions assajades.

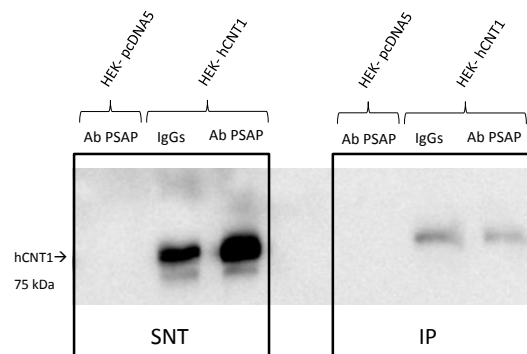


Figura 37. Co-Immunoprecipitació de hCNT1 amb prosaposina. Prosaposina va ser immunoprecipitada en extractes proteics de HEK-hCNT1 i HEK-pcDNA5 com a control. La mostra es va analitzar per *western blot* per veure la presència de hCNT1. SNT: Sobrenedant. IP: Immunoprecipitat.

Com que no es va poder provar la interacció per co-immunoprecipitació, per tal de validar la interacció amb altres tècniques, es va decidir fer assajos d'immunocitoquímica per veure si ambdues proteïnes co-localitzaven. Com s'observa en la Figura 38, hCNT1 presenta un marcatge a la membrana com correspon a un transportador, però també intracel·lular ja que es tracta d'una línia cel·lular que l'està sobreexpressant. Quant a prosaposina, la senyal és intracel·lular i de manera puntejada com ja s'havia descrit en altres publicacions (Xu et al., 2012). Pel que fa a la combinació de les dues senyals, no semblen co-localitzar en gran mesura. No obstant, sí que existeixen petites zones de la cèl·lula on sí que coincideixen ambdues senyals (marcades amb fletxes blanques a la Figura 38).

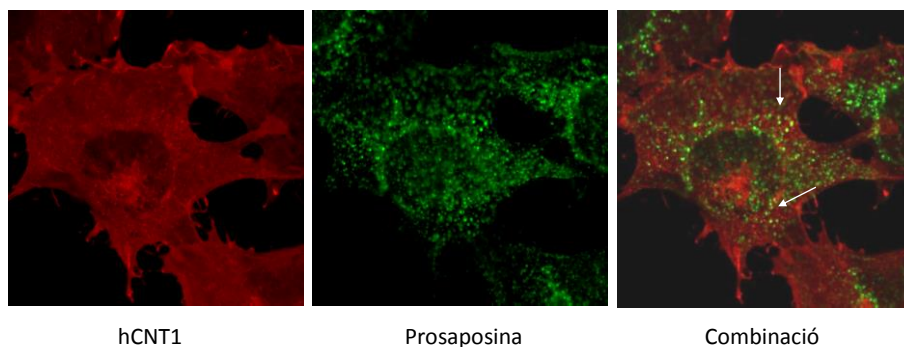


Figura 38. Localització cel·lular de prosaposina i hCNT1. Imatge de microscòpia confocal d'una immunocitoquímica representativa de la línia HEK-hCNT1. Senyal d'hCNT1 en vermell i senyal de prosaposina en verd. Colocalització en groc. Imatges adquirides amb microscopi Leica SPE, Objectiu 63x.

En paral·lel a aquests experiments, es van posar a punt les condicions experimentals per reduir l'expressió de prosaposina mitjançant siRNA. Es va aconseguir un fort descens en la quantitat de RNA (Fig. 39a) però no es veié cap efecte en els nivells de proteïna (Fig. 39b) després de 48h de tractament amb el siRNA.

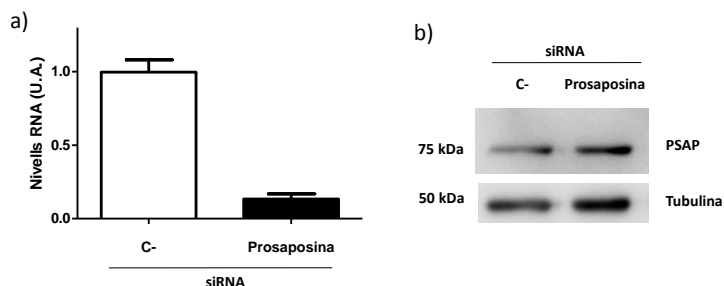


Figura 39. Silenciament de prosaposina mitjançant siRNA a HEK-hCNT1. Anàlisi dels nivells de prosaposina en RNA mitjançant qRT-PCR (a) i de proteïna per *western blot* (b) 48h després de realitzar el silenciament. n=3.

Aquests resultats demostraven que l'anticòs contra prosaposina no era específic i que els assajos realitzats prèviament quedaven invalidats. A més, la resta d'anticossos comercials disponibles no eren útils per a immunoprecipitar la proteïna.

En una aproximació per valorar la possible relació funcional entre aquestes dues proteïnes, es van fer assajos d'activitat de transport d'hCNT1 en la línia estable HEK-hCNT1 silenciant l'expressió de prosaposina. A la Figura 40, podem veure una reducció significativa de l'activitat de transport de citidina depenent de sodi al silenciar prosaposina. Caldria determinar si aquesta baixada d'activitat és un efecte directe de l'absència de prosaposina o si és a causa d'altres efectes indirectes, ja que realment només tenim evidències sòlides de que aconseguim reduir l'RNA de prosaposina però no sabem si els nivells de proteïna canvien. Analitzant les dades de transport, podem veure que la captació de citidina en medi colina (fracció de transport corresponent a transportadors equilibratius) no es veu afectada significativament (Fig. 41). Llavors semblaria que és un efecte específic per a l'activitat d'hCNT1.

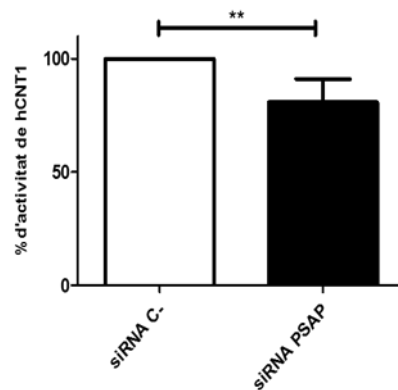


Figura 40. Activitat d'hCNT1 expressada en tant per cent de transport de citidina dependent de sodi. En la línia HEK-hCNT1 es va mesurar el transport de citidina tritiada en condicions control o de silenciament de prosaposina (PSAP). Resultats expressats com: Mitjana \pm S.E.M. n=3.

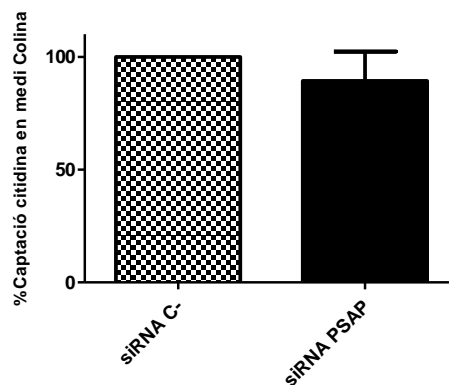


Figura 41. Activitat dels transportadors equilibratius expressada en tant per cent de transport de citidina independent de sodi. En la línia HEK-hCNT1 es va mesurar el transport de citidina tritiada en condicions control o de silenciament de rosaposina (PSAP). Resultats expressats com: Mitjana \pm S.E.M. n=3.

Al no disposar d'anticossos que funcionen correctament per a les tècniques d'interès, el projecte es va deixar aturat fins a l'eventual disposició de les eines apropiades. Una possible solució a aquesta limitació experimental era treballar amb proteïnes amb etiquetes (*tags*) d'expressió, tot i que això dificulta l'estudi d'efectes fisiològics. Però com que es preveia iniciar un nou projecte per fer un cribratge de proteïnes d'interacció específic per a proteïnes de membrana (*MYTH-Membrane Yeast Two-Hybrid*), es va decidir centrar els esforços en aquest nou assaig i aturar aquest projecte fins que es disposés de les ferramentes necessàries.

Si en algun moment es disposa d'anticossos adequats es plantejaria tornar a començar aquest projecte ja que la relació funcional que sembla observar-se i les implicacions en biologia tumoral que tenen aquestes dues proteïnes fa que sigui una interacció proteica interessant d'analitzar des del punt de vista biomèdic. Està descrit que prosaposina promou la migració i invasió en una línia de fibrosarcoma i açò pot veure's inhibït per una interacció proteica amb TFPI-2 (Xu et al., 2012) i també s'ha descobert que la disminució de prosaposina redueix l'adhesió, la migració i invasió en una línia de càncer de pròstata (Hu et al., 2010); per altra banda, s'ha descobert que hCNT1 pot reduir la migració de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic (Pérez-Torras et al., 2013). A més, prosaposina utilitza la via PI3K/Akt per a induir supervivència cel·lular en cèl·lules de Schawnn (Campana et al., 1999); hCNT1, en canvi, activa aquesta via de senyalització però induint mort cel·lular en línies d'adenocarcinoma pancreàtic (Pérez-Torras et al., 2013), aquesta resposta resulta sorprenent ja que principalment es tracta d'una via de supervivència cel·lular (Agarwal et al., 2013), fet que es podria correspondre a un canvi en les proteïnes d'interacció d'hCNT1 al ser restituint. Les evidències publicades suggeririen que ambdues proteïnes juguen papers funcionalment oposats dintre de la cèl·lula tumoral, encara que es tracta d'estudis fets en models cel·lulars molt diferents i estrictament no es pot descartar que les proteïnes tinguin funcions diferents en funció del tipus cel·lular. Pel que s'ha descrit als resultats, si reduïm els nivells de prosaposina, l'activitat d'hCNT1 es redueix significativament. Llavors s'hauria de determinar si aquesta reducció d'activitat es deguda a una disminució en la quantitat de proteïna d'hCNT1 o de la presència del transportador a membrana de manera que prosaposina estigues intervenint en l'estabilització i/o tràfic a membrana d'hCNT1.

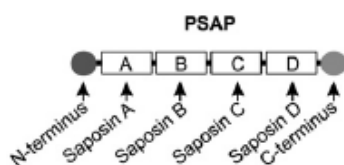


Figura 42. Diagrama de la prosaposina (PSAP) i les saposines de les quals és precursora. Figura extreta de Yuan & Morales, 2011

També podria succeir que al reduir els nivells de prosaposina s'estigués modificant el metabolisme dels esfingolípids lisosomals, ja que la prosaposina és la

proteïna precursora de les Saposines (Fig. 42), que són les proteïnes que participen en la degradació d'esfingolípid en els lisosomes (Regis et al., 1999; Yuan & Morales, 2011). Està descrit que deficiències en el gen de la prosaposina comporten malalties lisosomals fatals (Motta et al., 2016), llavors estem davant d'una proteïna important que al reduir-ne l'expressió podria veure's afectada la viabilitat cel·lular. Aquest desequilibri podria provocar un canvi dintre de la cèl·lula que provoqués indirectament una reducció de l'activitat d'hCNT1, però és curiós que el transport de nucleòsids per part dels transportadors equilibratius no es veu afectat de manera significativa, per tant, sembla ser un efecte específic per a hCNT1.

3.2 Determinació de l'interactoma d'hcNT1 per la tècnica MYTH i estudi funcional de la interacció amb RNF41.

3.2.1 Obtenció de l'interactoma proteic de la família hcNT mitjançant la tècnica MYTH

Moltes funcions cel·lulars importants es donen per mitjà de complexos proteics (Srihari et al., 2015). També es coneix que la regulació de certes proteïnes es pot donar, entre d'altres mecanismes, per la interacció amb altres proteïnes (Fig. 43) (Bar-Peled et al., 2013; Scott et al., 2016). Per aquesta raó, l'estudi dels interactomes (xarxes d'interaccions de proteïnes) i de les interaccions puntuals entre proteïnes pot generar un coneixement de gran valor biològic per entendre els mecanismes que es donen a l'interior de la cèl·lula (Acuner Ozbabacan et al., 2011; Snider et al., 2013, 2015) .

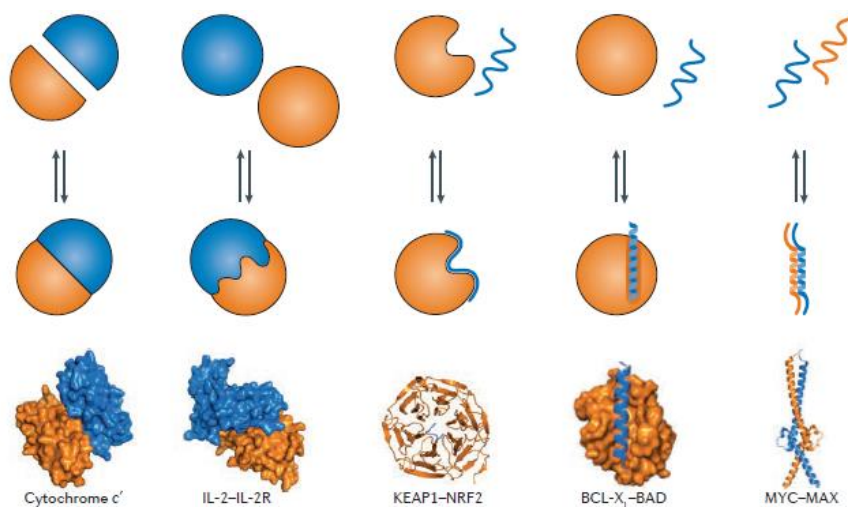


Figura 43. Esquema amb els diferents tipus d'interaccions entre proteïnes. Extret de Scott et al., 2016.

Arran les evidències trobades sobre altres possibles funcions dels transportadors de nucleòsids (Huber-Ruano et al. 2010; Pérez-Torras et al. 2013; Godoy et al. 2014), es va decidir iniciar l'estudi de l'interactoma dels hcNTs per determinar si hi havia altres actors implicats en aquestes funcions accessòries. Les aproximacions que s'havien fet fins al moment havien sigut amb tècniques com *GST-Pull Down* i *Bacterial Two-Hybrid*

on només es podia utilitzar una regió soluble i intracel·lular de la proteïna: el domini N-terminal. A més, els models de treball eren *in vitro* o en bacteris, els quals difereixen notablement d'una cèl·lula humana. Llavors es va decidir realitzar un anàlisi amb un mètode que permetés treballar amb la proteïna sencera i que es realitzés en un model d'estudi el més semblant a una cèl·lula humana. Així, vam optar per una tècnica relativament nova que s'adequava perfectament a les nostres necessitats: el MYTH (*Membrane Yeast Two-Hybrid*) (Snider et al., 2010). Aquest sistema permet detectar interaccions de proteïnes de membrana amb la proteïna sencera i es realitza en el model *S. cerevisiae* (llevat), que és un organisme eucariota que pot fer modificacions post-traduccionals semblants a la cèl·lula humana (Leach & Brown, 2012). Per aquestes raons es va decidir iniciar el cribratge per a buscar proteïnes d'interacció a tota la família dels hCNTs.

Aquest mètode requeria una sèrie d'infraestructures, materials i coneixement previ del que no disposàvem i, per tant, no era viable començar-ho des de l'inici al nostre laboratori. Per això, es va decidir col·laborar amb el laboratori del Dr. Igor Stagljar, on s'havia desenvolupat la tècnica, al Terrence Donnelly Centre de la Universitat de Toronto (Canadà) i vam realitzar allí el cribratge. La resta de treball de validació ha estat realitzat al Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Universitat de Barcelona.

El MYTH es basa en la capacitat de dividir la ubiquïtina, una proteïna de 76 aminoàcids, en dos dominis estables: l'amino terminal (Nub) i el carboxi terminal (Cub). Aquest dos dominis, al re-associar-se *in vivo* formen una molècula de pseudoubiquïtina que es reconeguda pels enzims desubiquïtinitzadors que proteolitzen aquesta pseudoubiquïtina. La unió entre els dos dominis pot veure's pertorbada pel canvi d'aminoàcid de la isoleucina 13 per una glicina en el domini N-terminal (NubG). Llavors la unió no és tan forta i és necessari que els dos dominis estiguin propers en l'espai per a que es formi la pseudoubiquïtina.

El que resulta innovador d'aquesta tècnica és l'ús d'aquest sistema com un sensor d'interacció entre proteïnes. El que es fa es utilitzar la proteïna d'interès que es vol analitzar (*bait*) i se li fusiona l'extrem carboxi terminal de l'ubiquïtina (Cub) i un factor de transcripció (TF), que conté el domini d'unió a DNA d'*Escherichia coli* "LexA" i el domini d'activació transcripcional "VP16" del virus d'herpes simple. Les possibles

proteïnes d'interacció (*preys*) es fusionen amb l'extrem amino terminal mutant (NubG) i amb una etiqueta d'expressió com HA per a verificar la presència de la proteïna. Per a cribratges d'ampli espectre s'utilitzen llibreries de cDNA on cada proteïna estarà clonada amb aquestes condicions. Un cop tenim ambdues proteïnes fusionades, les expressem en una soca especial de *S. cerevisiae*: NMY41. Si les proteïnes interaccionen, els dominis NubG i Cub estaran prop a l'espai, s'uniran i formaran la pseudoubiquïtina, aquesta serà proteolitzada i el factor de transcripció quedarà alliberat i es podrà desplaçar al nucli per transcriure els gens que estiguin sota el seu control transcripcional. La soca de *S. cerevisiae* NMY41 ha estat genèticament modificada i conté tres gens de selecció sota el control del factor de transcripció que està fusionat al *bait* (Figura 44).

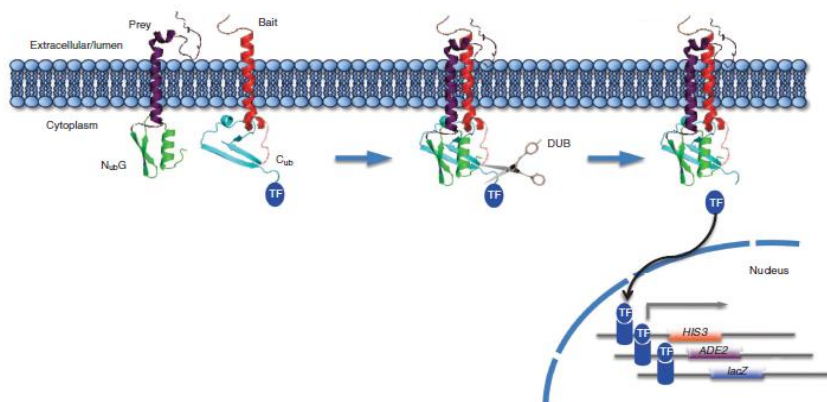


Figura 44. Esquema del mecanisme del sistema MYTH. Adaptat de Snider et al. 2010.

La diferència d'aquest mètode amb el doble híbrid clàssic radica en que la interacció no ha de donar-se exclusivament a nucli, pot donar-se en qualsevol regió de la cèl·lula del llevat. Açò és de gran interès per a analitzar proteïnes de membrana, que no solen estar a nucli.

El primer pas per iniciar l'assaig va ser la clonació dels hCNTs (*bait*s) en els plasmidis pBT3N i pTLB1 que contenen fusionats els factors de transcripció i el domini Cub. La diferència entre tots dos és que estan sota diferent control transcripcional. Per fer l'assaig es van emprar les construccions amb el plasmidi pTLB1 ja que era amb el que millor creixien els llevats. A continuació, es va procedir a clonar en els vectors específics per als *preys* les proteïnes d'interacció anteriorment descrites per als hCNTs amb altres

tècniques (*GST-pull down* i doble híbrid en bacteris). Amb aquests constructes es va realitzar el test NubG/I per tal de comprovar que el sistema funcionava correctament, determinar les condicions més restrictives i evitar falsos positius (protocol detallat a Materials i Mètodes). Per a restringir el sistema s'afegeix (3-amino-1,2,4-triazole), un inhibidor competitiu de l'enzim His3, aquest enzim és un dels gens reporters del sistema. Al inhibir-lo, estem eliminant activacions basals que podrien donar lloc a falsos positius. Al realitzar el test NubG/I (Fig. 45), vam observar que funcionava correctament i que la concentració idònia de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) per a hCNT1, hCNT2 i hCNT3 era de 25 mM, 25 mM i 50 mM respectivament.



Figura 45. NubG/I Test. Creixement de les colònies de llevats en medi sòlid de –WLAH amb diferents proteïnes transfectades i diferents concentracions de 3-AT. Cada fila correspon a una dilució seriada de dreta a esquerra de la colònia en concret.

A continuació, es va validar la localització dels *baits* ja que al tractar-se de proteïnes humanes, no es podia anticipar el comportament en un sistema heteròleg com els llevats, encara que ja hi havia evidències experimentals de que els hCNTs eren funcionals en *S. cerevisiae* (Vickers et al., 2001). Per aquesta raó, vam fusionar YFP a les proteïnes d'estudi i vam comparar la localització amb el *bait* control (CD4). Es pot observar a la Figura 46 la presència de cada constructe a membrana i també a citosol, açò ens indicà que el transportadors arriben a membrana correctament. La presència a citosol és típica d'una transfecció transitòria on es sobreexpressa gran quantitat de la proteïna i pot quedar en forma d'agregats.

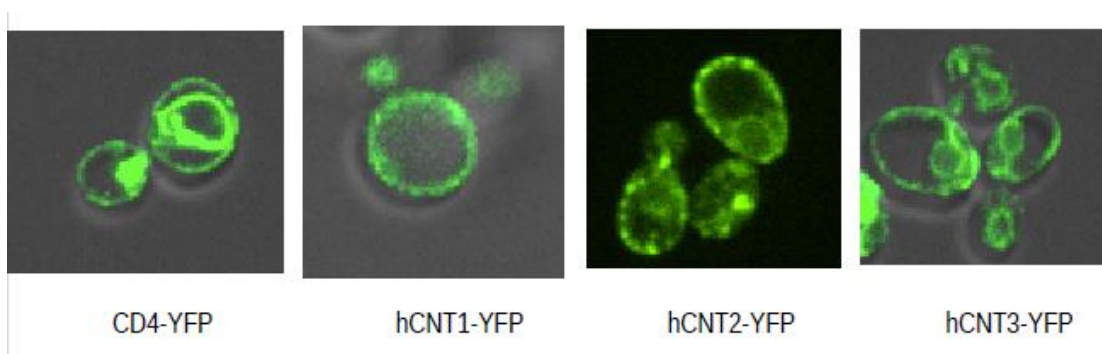


Figura 46. Validació de la localització dels *baits*. Imatges de microscòpia confocal dels diferents constructes transfectats a la soca de llevat NMY-41. Microscopi confocal invertit Leica DMI 6000B (63x).

Un cop verificades les condicions òptimes per realitzar el cribratge per a cada proteïna d'estudi, es va procedir a fer transformacions a gran escala de les dues llibreries de cDNA de les que es disposava (ronyó i sistema nerviós central). *A priori*, la llibreria de ronyó era més interessant a nivell funcional pel paper dels hCNTs en aquest teixit (Pastor-Anglada et al., 2007), tot i que els hCNTs també juguen un paper en models neuronals (Medina-Pulido et al., 2013), llavors els resultats obtinguts amb la llibreria de sistema nerviós central també poden aportar coneixement bàsic sobre els transportadors. Els resultats obtinguts van ser:

Per a hCNT1, es van trobar unes 30 colònies positives amb la llibreria de cDNA de ronyó, de les quals només 5 van passar el test d'especificitat del *bait* (*bait dependency test*) (Fig. 47). Van ser seqüenciades i es va comprovar que dues d'elles donaven

seqüències en pauta de lectura. Amb la llibreria de sistema nerviós central (SNC) es van obtenir 120 colònies positives i d'aquestes només 10 van passar el test d'especificitat. De les 10 colònies, només 2 van donar seqüències que codificaven per a proteïnes en pauta de lectura. El llistat de proteïnes d'interacció detectades i susceptibles de ser posteriorment validades es descriu a la Taula 7. D'aquests quatre positius en total, es va descartar el positiu THO complex 3 ja que només estava compostat per 10 aminoàcids de la proteïna sencera. Amb la resta es va decidir intentar validar la interacció per altres mètodes.

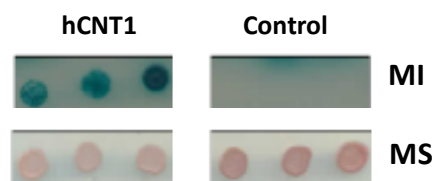


Figura 47. Exemple d'una proteïna que supera el test d'especificitat del *bait*. En les plaques control hi ha les colònies blanques crescudes en medi de selecció (MS) on s'observa creixement i, per tant, la presència d'ambdues proteïnes. En les plaques amb medi d'interacció (MI) les colònies blaves només creixen quan estan co-transfectades amb el *bait* d'interès i no amb el control, el que ens indica que la interacció és específica de la nostra proteïna.

El nombre de positius obtinguts sorprèn una mica ja que s'esperava que la quantitat de positius fos més elevada com s'ha descrit per a altres proteïnes de membrana (Lam et al., 2015; Petschnigg et al., 2016; Z. Yao et al., 2017). Els controls interns (NubG/I test i validació del *bait*) van sortir adequadament i no sembla que hi hagués cap problema durant l'execució de la tècnica. Com que era la primera vegada que s'analitzaven els transportadors de nucleòsids concentratius per aquest cribratge, tampoc es sabia quin seria el resultat. Potser aquestes proteïnes són menys donades a interaccionar amb altres proteïnes. També podria ser que l'elecció de les condicions de treball fos molt restrictiva reduint així la detecció d'altres possibles interaccions. No obstant, amb unes condicions molt restrictives els positius obtinguts haurien de ser més sòlids i podria tractar-se d'unions més estables que, a l'hora d'una validació posterior, probablement ens portin a resultats més conclouents.

Per a hCNT2 no es va obtenir cap positiu. Al transformar-lo amb les llibreries, no va créixer cap colònia. Aquest resultat podria portar a pensar que la construcció quedava fora de pauta de lectura, però la construcció estava ben dissenyada ja que havia estat seqüenciada i havia passat els controls interns (test NubG/I i localització subcel·lular). Per tal de poder buscar proteïnes d'interacció per a hCNT2 amb aquesta tècnica s'hauria de repetir l'assaig canviant alguna condició per fer el cribratge menys restrictiu.

Per a hCNT3, es van trobar unes 20 colònies positives amb la llibreria de cDNA de ronyó, de les quals cap va passar el test d'especificitat de *bait*. Amb la llibreria de sistema nerviós central (SNC) es van obtenir 80 colònies positives de les quals 16 van passar el test d'especificitat. D'aquestes 16 colònies, 4 van donar seqüències que codificaven per a proteïnes en pauta de lectura (Taula 1). D'aquestes 4, es va descartar el positiu de la tubulina ja que es tracta d'una proteïna que sol ser un fals positiu en aquest tipus d'assajos i tampoc es va trobar cap relació funcional amb el transportador. Amb la resta de proteïnes es va decidir intentar validar la interacció per altres mètodes.

Proteïna bait	Proteïnes d'interacció detectades	Llibreria
hCNT1	Gamma-butyrobetaine dioxygenase	Ronyó
	Nuclear Factor 1 C-type isoform 5	Ronyó
	E3 Ubiquitin protein Ligase NRDP1	SNC
	THO complex 3, partial	SNC
hCNT3	GTF3C5 protein	SNC
	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	SNC
	Dihydropteridine reductase (QDPR)	SNC
	Tubulin beta-2A chain isoform 2	SNC

Taula 7. Proteïnes d'interacció obtingudes amb l'assaig MYTH. Resum de les proteïnes d'interacció obtingudes per a hCNT1 i hCNT3 i que van superar el test d'especificitat de *bait*. SNC: Sistema Nerviós Central.

El següent pas fou la recerca bibliogràfica per anticipar les possibles implicacions funcionals dels diferents positius obtinguts. A continuació, es descriuen breument les diferents proteïnes i les seves funcions i implicacions fisiològiques:

-Gamma-butyrobetaine dioxygenase (BBOX1): És l'enzim encarregat de catalitzar l'últim pas de la síntesi *de novo* de l'L-carnitina (Rigault et al., 2006), l'L-carnitina és essencial per al transport dels àcids grassos a través de la membrana

mitocondrial per a la seva β -oxidació. L'expressió per teixits sembla ser elevada en ronyó, moderada a fetge i molt baixa al cervell (Vaz et al., 1998). També s'ha relacionat el gen amb processos oncològics arran d'estudis a gran escala d'anàlisi de dades de *microarrays* (Dawany et al., 2011).

-Nuclear Factor 1 C-type isoform 5 (NFIC): Aquest factor de transcripció està implicat en processos tan diversos com el creixement i la forma de les arrels de les dents (Kim et al., 2015); en la transició epiteli-mesènquima (Lee et al., 2015) i promou la proliferació i diferenciació de cèl·lules mare de papil·la humana (Zhang et al., 2015).

-E3 Ubiquitin Protein Ligase Nrdp1 (RNF41 o Nrdp1): Es tracta d'una ubiquitina lligasa E3 de tipus RING que s'encarrega de transferir el pèptid d'ubiquitina a la proteïna diana. Es coneix que està implicada en la degradació de proteïnes com Erbb3, que intervenen en senyalització dintre de processos carcinogènics (Mujoo et al., 2014). Aquesta proteïna també inhibeix el creixement de cèl·lules de càncer colorectal (Lu et al., 2014) i al inhibir-se la seva expressió pot augmentar la metastasi de cèl·lules de càncer colorectal (Jiang et al., 2015).

-General Transcription Factor III Complex 5 (GTF3C5): Aquesta proteïna forma part del complex transcripcional III (TFIIIC) que es creu que, a part de regular la transcripció, funciona com a regulador de la cromatina entre d'altres processos (Donze, 2012).

-Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2 (GABARAPL2 o GATE16): Proteïna que participa en l'autofàgia i la formació autofagosomes ja que regula la unió i fusió de les membranes d'aquests compartiments cel·lulars (Nakatogawa et al., 2007; Weidberg et al., 2011).

-Dihydropteridine reductase (DHPR o QDPR): És un enzim involucrat en el reciclatge del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), un cofactor necessari per a les hidroxilases d'aminoàcids aromàtics. La deficiència d'aquest gen està relacionada amb un fenotip de fenilcetonúria (Dianzani et al., 1998).

3.2.2 Validació bioquímica de les possibles proteïnes d'interacció obtingudes

El conjunt de proteïnes d'interacció identificades s'associen a funcions biològiques molt diferents. *A priori*, són funcions allunyades del transport i metabolisme de nucleòsids, però podria existir alguna relació amb la regulació dels hCNTs desconeguda fins al moment i que podria ser útil per entendre el mecanisme pel qual els hCNTs desenvolupen altres funcions dintre de la cèl·lula. En una primera aproximació, es va decidir validar bioquímicament totes sis interaccions per, posteriorment, continuar amb la validació funcional d'aquelles on es demostrés la interacció.

Per començar la validació bioquímica de les sis interaccions es va decidir emprar *tags* d'expressió per poder treballar amb els mateixos anticossos amb tots els *preys*. En el cas d'hCNT1 i hCNT3, es van emprar els constructes que prèviament s'havien generat en el grup de recerca, on s'havien clonat els transportadors en el vector pcDNA3.1 fusionats amb l'epítip HA en l'extrem C-terminal. Els *preys* es van clonar en el mateix vector i es va afegir un altre *tag*. Per la seva versatilitat, es va escollir l'epítip Myc i es va fusionar tant en l'extrem N-terminal com en el C-terminal per evitar interferir en algun domini on es donés la interacció. No obstant, al transfectar-los en la línia HEK293, només vam ser capaços de detectar els constructes on s'havia fusionat el *tag* Myc en l'extrem N-terminal (llevat del cas de QDPR, que es van detectar tots dos constructes) (Fig. 48). Per aquesta raó, només es van poder realitzar els experiments de validació amb el constructe que contenia el *tag* en N-ter.

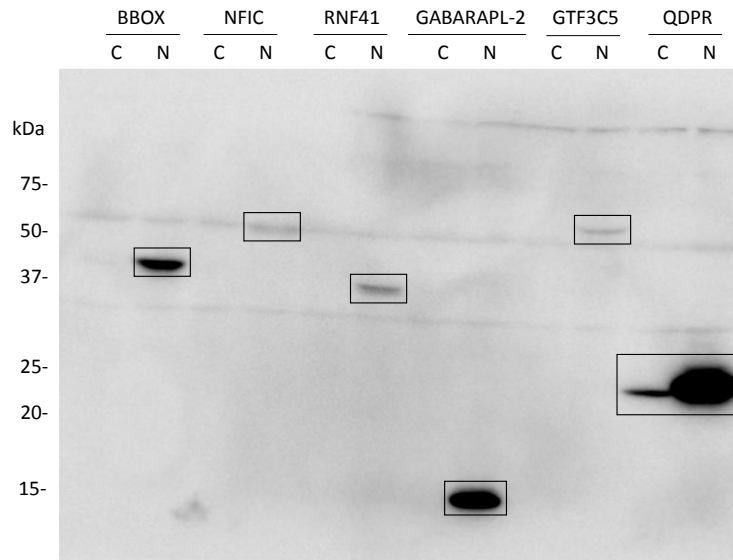


Figura 48. Determinació de l'expressió dels diferents constructes de les possibles proteïnes d'interacció mitjançant *western blot* amb immunodetecció contra el tag MYC. Cada proteïna té dos constructes amb el tag MYC fusionat en l'extrem carboxi terminal (C) i en l'extrem amino terminal (N).

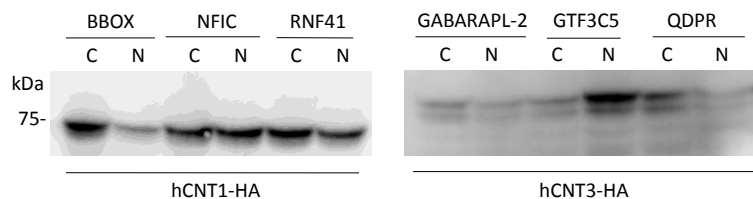


Figura 49. Determinació de l'expressió dels transportadors en les co-transfeccions dels diferents constructes de les possibles proteïnes d'interacció. Immunodetecció mitjançant *western blot* contra el tag HA.

Un cop establertes les condicions en les quals s'expressaven adequadament les proteïnes d'interacció (Figura 48) i els transportadors (Figura 49), es va procedir a la realització dels assajos de co-immunoprecipitació i co-immunocolocalització. Els experiments d'immunoprecipitació es van realitzar primerament immunoprecipitant els *preys* amb un anticòs contra el tag Myc. Es va emprar un anticòs comercial contra c-Myc ja unit a les boles d'agarosa (Sigma-Aldrich®). L'eficiència d'immunoprecipitació obtinguda va ser elevada i, a més, facilitava considerablement el protocol d'immunoprecipitació. Així, un cop establertes les condicions d'immunoprecipitació, es va procedir a analitzar la co-immunoprecipitació del transportador per validar la

interacció mitjançant la immunodetecció del *tag* HA. Com a control del sistema, vam utilitzar un dels *preys* d'hCNT1 com a control dels d'hCNT3 i viceversa (Fig. 50).

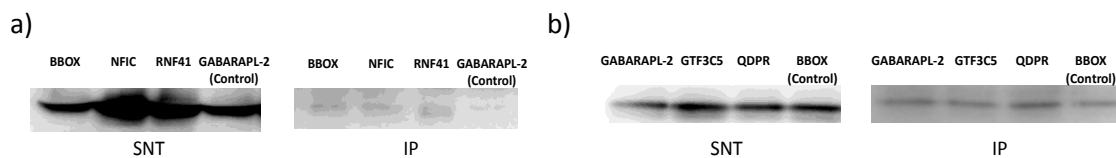


Figura 50. Co-immunoprecipitació dels *baits* amb els diferents *preys* i el control. Co-transfecció dels constructes en HEK293 i posterior immunoprecipitació dels Myc-*preys* a partir dels extractes proteics obtinguts. Finalment s'analitza la presència del *bait*, hCNT1 (a) i hCNT3 (b), en l'immunoprecipitat per *western blot* per immunodetecció d'HA. Figura representativa de 4 assajos independents.

Com podem observar en la Figura 50, els *baits* s'immunoprecipiten junt amb els *preys*. El problema és que també s'arrosseguen els *preys* suposadament inespecífics. No obstant, a causa de l'elevada homologia entre hCNT1 i hCNT3 no es pot descartar que els *preys* interaccionen amb tots dos, sobretot en condicions de sobreexpressió com és el cas de la co-transfecció.

Els assajos de co-localització dels transportadors amb les possibles proteïnes d'interacció es van realitzar seguint el mateix protocol de co-transfecció d'ambdues proteïnes fusionades amb el *tag* d'expressió. Com es veu a la Figura 51, els transportadors (hCNT1HA i hCNT3HA) presenten una localització a membrana i també al citosol. Pel que fa als *preys*, els factors de transcripció (NFIC i GTF3C5) es veuen a nucli (el que concorda amb la seva funció com a factors de transcripció) i a citosol. La resta de proteïnes presenten un marcatge citosòlic sense cap patró que ens induís a pensar que es troben en alguna regió subcel·lular concreta. Quan es va analitzar la combinació de les dues senyals es va detectar co-localització en tots els casos ja que es veuen regions en color groc. Açò ens indica que les dues proteïnes estarien a prop en l'espai dintre de la cèl·lula i podrien estar interaccionant.

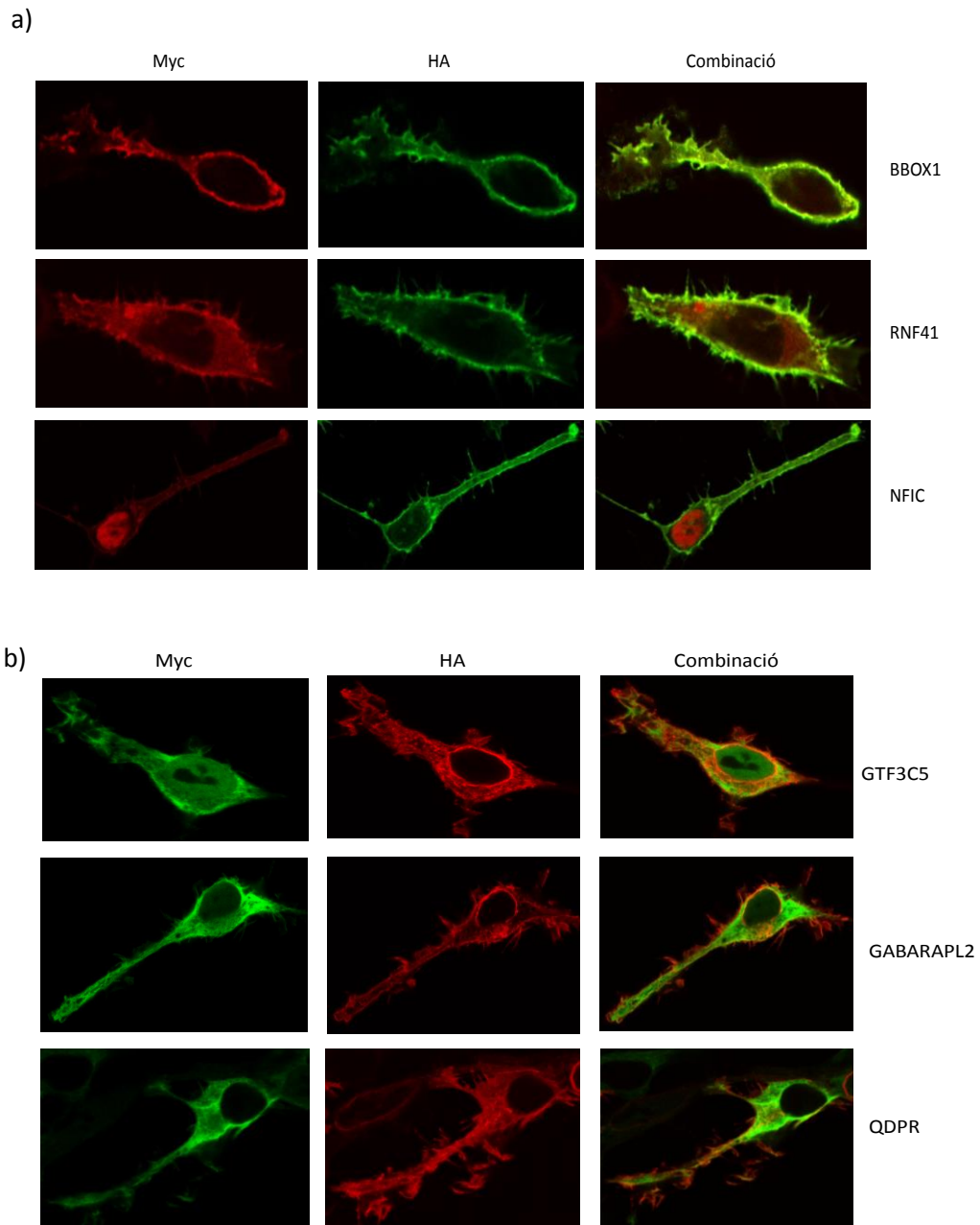


Figura 51. Immunocolocalització dels *baits* amb els diferents *preys*. Co-transfecció dels constructes en HEK293 i posterior detecció amb tècniques immunocitoquímiques. Co-transfecció d'hCNT1-HA i els seus *preys* (a); co-transfecció d'hCNT3-HA amb els seus *preys* (b). Imatges de microscòpia confocal adquirides amb el microscopi Leica SPE, objectiu 63x.

3.2.3 Validació funcional de la interacció RNF41-hCNT1

Una vegada que vam observar que tots els *preys* semblaven estar interaccionant en aquest model d'expressió heteròleg amb la mateixa intensitat, es van centrar els esforços en fer validacions funcionals individuals. Per la seva relació amb la biologia tumoral, es va escollir RNF41 com a primer candidat per a valorar la implicació funcional de la interacció amb hCNT1. RNF41 és una ubiquïtina lligasa E3 de tipus RING que s'encarrega de transferir el pèptid d'ubiquïtina a la proteïna diana. La família de lligases E3 és la més nombrosa (s'han trobat unes 600 en el genoma humà) i el seu nom prové de la presència d'un domini RING (*Really Interesting New Gene*) (Foot et al., 2016). A més, en una recent publicació es descriu un mecanisme de degradació proteasòmica mitjançant el sistema d'ubiquïtina per a un transportador de nucleòsids d'eritròcits (eENT1) (Song et al., 2017), el que ens indica que potser els transportadors de nucleòsids concentratius també són susceptibles d'èsser regulats mitjançant ubiquïtinació.

La funció d'RNF41 ens va portar a pensar que podria estar regulant l'estat d'ubiquïtinació del transportador. hCNT1 conté 19 lisines en la seva estructura primària, de les quals tres: K19, K393 i K401, són susceptibles de ser ubiquïtinades segons el predictor bioinformàtic *UbPred* (Radivojac et al., 2011). Per saber on es trobaven aquestes lisines en l'estructura secundària del transportador es va fer servir un model bioinformàtic que prediu l'estructura dels hCNTs. Aquest model ha estat generat pel nostre grup de recerca en col·laboració amb el grup dels Drs Xavier Barril i Axel Bidon-Chanal (Arimany-Nardi et al. 2017- Article pendent d'acceptació). Es pot veure a la Figura 52 que el model prediu que les lisines 393 i 401 es troben en la regió extracel·lular. La lisina 19 no ha pogut ser modelada ja que pertany a la regió amino terminal i aquesta regió no té cap estructura predita, però es coneix per altres mètodes que es tracta d'una regió intracel·lular (Hamilton et al., 2001). La maquinària encarregada d'ubiquïtinar altres proteïnes es troba a l'interior cel·lular (Foot et al., 2016), llavors semblaria ser que la lisina K19 seria la més susceptible d'ubiquïtinar-se. Açò lligaria amb la hipòtesi plantejada anteriorment de que el domini amino terminal dels hCNTs és una regió important per a la regulació de la proteïna.

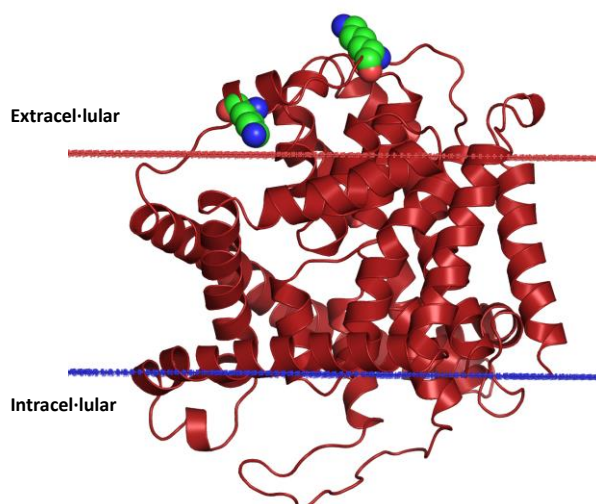


Figura 52. Predicció de la localització de les lisines 393 i 401 en el model d'estructura d'hCNT1.

Malgrat que l'ubiquïtinació més comuna és la que es dona a través de lisines, cada cop hi ha més evidències que es produeix ubiquïtinació en altres residus polars com les cisteïnes, serines, treonines, tirosines i l'extrem amino terminal (McDowell & Philpott, 2013). Per tant, no es pot descartar que existeixin altres residus on s'estigui ubiquïtinant la proteïna. La hipòtesi que es va plantejar va ser que RNF41 podria estar regulant l'estat d'ubiquïtinació d'hCNT1 i influir així en la seva degradació via proteasoma com ho fa amb altres proteïnes com Erbb3 (Shi et al., 2015; C. Wang et al., 2009). Però també podria tractar-se d'una ubiquïtinació no proteolítica que pogués influir en l'activitat o localització del transportador (Chen & Sun, 2009; Komander, 2009; Mukhopadhyay & Riezman, 2007). No s'ha d'oblidar que la ubiquïtinació no és l'única senyal per a degradació via proteasoma, és més, existeix degradació totalment independent de senyalització per ubiquïtina. A més, hi ha diferents tipus d'ubiquïtinació: en forma de monòmers, ramificada... i cada tipus genera una resposta diferent segons la proteïna (Komander, 2009; D. Wang et al., 2015). En el nostre cas, l'ubiquïtinació podria estar regulant la localització del transportador, com ocorre amb altres membres de la família SLC (Ibáñez et al., 2016).

Per tal de demostrar si RNF41 podia estar modulant l'estat d'ubiquïtinació del transportador es va escollir la línia HEK293 per realitzar una co-transfecció d'hCNT1-HA

en presència o absència de Myc-RNF41. A continuació, es va immunoprecipitar hCNT1HA i es van analitzar les formes ubiquïtinades (Fig. 53).

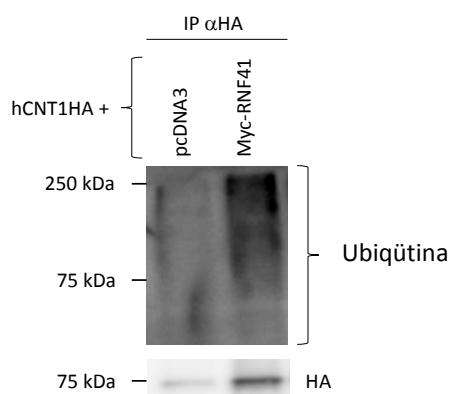


Figura 53. Nivells d'ubiquïtinació d'hCNT1-HA en la línia cel·lular HEK293. Co-transfecció de hCNT1-HA amb RNF41 o el vector buit (pcDNA3) en la línia HEK293 i a les 48h es va fer l'extracte proteic. A continuació es va realitzar una immunoprecipitació d'hCNT1-HA i es va analitzar per *western blot* la presència de formes ubiquïtinades.

En la Figura 53 s'observa que, on s'ha sobreexpressat Myc-RNF41, hi ha més quantitat de formes ubiquïtinades al immunoprecipitar hCNT1HA. Llavors semblaria que RNF41 està promovent l'ubiquïtinització d'hCNT1. També s'observa que la immunoprecipitació ha estat més eficient on hem transfectat Myc-RNF41, aquest pot ser un motiu pel qual els nivells de formes ubiquïtinades són més elevats. El problema va ser que no es va aconseguir que la immunoprecipitació fos equivalent en ambdues condicions per a que fossin quantitativament comparables. De tota manera, es va procedir a analitzar si existia una relació funcional entre aquestes dues proteïnes.

Per analitzar la funció biològica d'aquesta interacció es va decidir buscar un model que expressés de forma endògena RNF41. Per això, es va analitzar l'expressió de la proteïna RNF41 en un panell de línies cel·lulars de diferents orígens (ronyó, pulmó, fetge, adenocarcinoma pancreàtic, leucèmia limfàtica crònica, colon i pròstata) (Fig. 54).

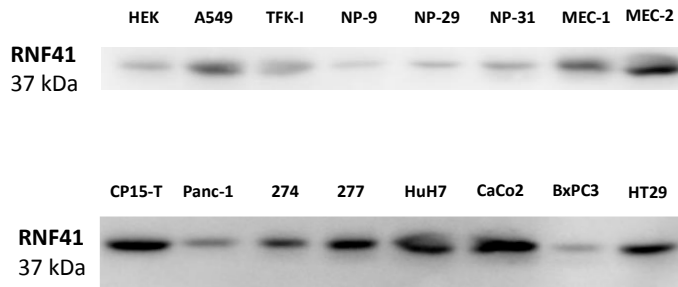
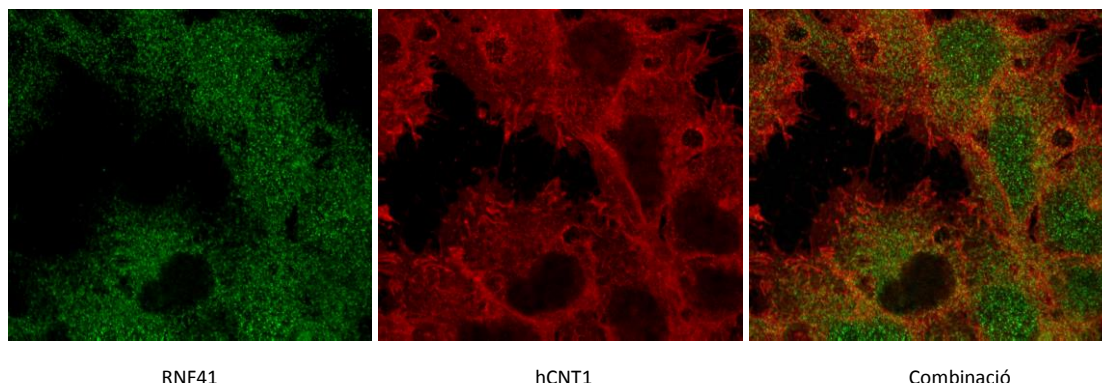


Figura 54. Expressió d'RNF41 en un panell de línies cel·lulars. Detecció per *western blot* de la presència d'RNF41 en línies cel·lulars de diferents teixits d'origen.

Com podem veure a la Figura 54, es tracta d'una proteïna que s'expressa en tota la varietat de línies cel·lulars analitzades. Per a alguna d'elles ja s'havia descrit prèviament l'expressió d'RNF41 (Lu et al., 2014). Tal i com era d'esperar per a hCNT1, cap de les línies cel·lulars analitzades presenta expressió detectable del transportador ja que l'expressió està associada a tipus cel·lulars diferenciats i es perd en línies immortalitzades (Pastor-Anglada et al., 2008; X. Zheng et al., 2015). Per tant, per tenir expressió d'hCNT1 s'havia de transfectar, transduir o treballar amb una línia derivada de HEK293 que expressa hCNT1 de manera estable i que ha estat generada prèviament al laboratori. En una primera aproximació, es va escollir la línia estable HEK-hCNT1 com a model on realitzar els primers assajos funcionals per validar la interacció ja que presentava l'expressió de totes dues proteïnes de manera estable. Amb la intenció de validar la funcionalitat de la interacció hCNT1-RNF41 en aquest model es van realitzar assajos d'immunocolocalització en condicions d'expressió endògena d'RNF41 i/o sobreexpressant-la amb el tag Myc. Com es veu a la figura 55A, el marcatge d'hCNT1 correspon amb una localització característica d'un transportador ja que es troba en gran mesura a la membrana plasmàtica. Pel que fa a RNF41, s'observa un marcatge puntejat sense cap distribució específica aparent. En funció de la cèl·lula pot trobar-se dintre del nucli o no. De tota manera, es veuen regions clares on totes dues senyals coincideixen i, per tant, on podrien estar interaccionant ambdues proteïnes. Quant a la condició de sobreexpressió de Myc-RNF41 (Fig. 55B), el marcatge d'RNF41 és més continu i principalment citosòlic, però s'observa clarament que hi ha regions prop de la

membrana on trobem co-localització amb la senyal d'hCNT1, que és semblant a la condició anterior.

A)

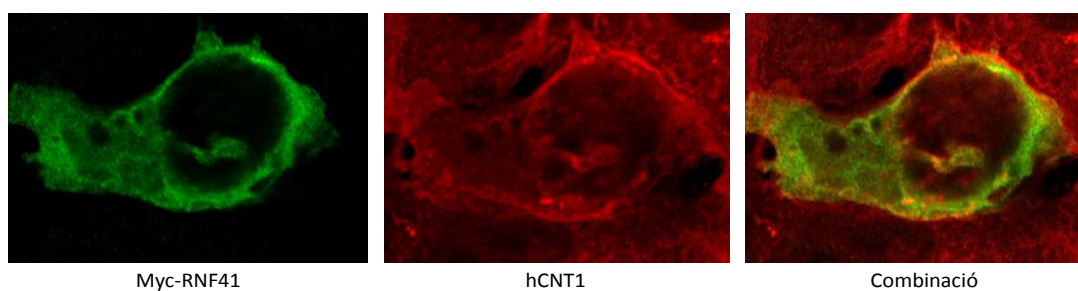


RNF41

hCNT1

Combinació

B)



Myc-RNF41

hCNT1

Combinació

Figura 55. Co-immunolocalització d'hCNT1 junt a RNF41. Immunocitoquímica de la línia HEK-hCNT1 en condicions d'expressió endògena d'RNF41 (A) o de sobreexpressió de Myc-RNF41 (B). Imatges de microscòpia confocal adquirides amb el microscopi Leica SPE. Objectiu 63x.

Un cop determinada la co-localització de les dues proteïnes en aquesta línia cel·lular, es va procedir a realitzar diversos assajos funcionals per esbrinar la funcionalitat de la interacció entre hCNT1 i RNF41. Primerament es va analitzar l'efecte que té el silenciament i la sobreexpressió d'RNF41 sobre l'activitat transportadora d'hCNT1 (captació de citidina dependent de sodi) (Figs. 56 i 57).

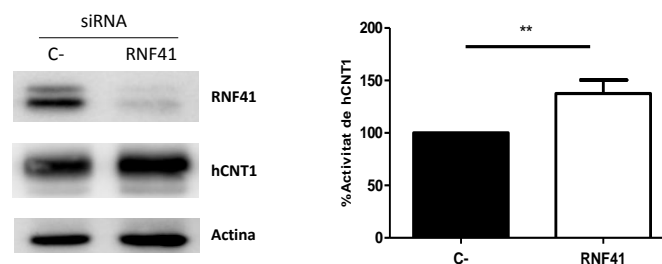


Figura 56. Efecte del silenciament d'RNF41 mitjançant siRNA sobre l'activitat d'hCNT1 en la línia estable HEK-hCNT1. Detecció per *western blot* de la presència d'RNF41, hCNT1 i actina com a control de càrrega en les línies cel·lulars analitzades. L'activitat d'hCNT1 està expressada com a percentatge de captació de citidina dependent de sodi. El silenciament es va realitzar durant 48h amb una concentració de siRNA de 50nM. n=3. Cada proteïna es detecta amb un anticòs específic contra un epítip propi (l·listats en la secció de Materials i Mètodes).

Es pot veure a la Figura 56 que el silenciament d'RNF41 és efectiu ja que reduïm l'expressió al voltant d'un 80% (densitometria relativa a actina). Aquest silenciament va induir un increment d'activitat d'hCNT1 d'un 30%. Els nivells totals de proteïna d'hCNT1 semblen mantenir-se constants.

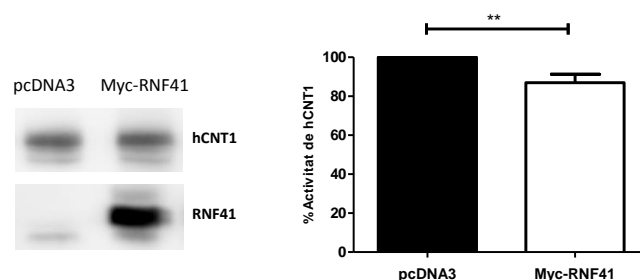


Figura 57. Efecte de la sobreexpressió d'RNF41 sobre l'activitat d'hCNT1 en la línia estable HEK-hCNT1. L'activitat d'hCNT1 està expressada com a percentatge de captació de citidina dependent de sodi. Detecció per *western blot* de la quantitat de proteïna total d'RNF41 i hCNT1. n=3. Cada proteïna es detecta amb un anticòs específic contra un epítip propi (l·listats en la secció de Materials i Mètodes).

Mitjançant l'aproximació inversa, al sobreexpressar RNF41 s'observa una disminució significativa de l'activitat d'hCNT1 d'un 15% aproximadament (Fig. 57). A més, els nivells de proteïna total del transportador es mantenen aparentment constants.

Com s'ha esmentat abans, en la Figura 53 s'observa que on s'ha sobreexpressat RNF41 hi ha més quantitat de formes ubiquitinades al immunoprecipitar hCNT1HA.

Llavors sembla que RNF41 està mediant l'ubiquitinació d'hCNT1. Les evidències funcionals són que els nivells d'RNF41 modifiquen l'activitat d'hCNT1 però no així els nivells totals de proteïna. Per tant, ens vam plantejar que l'ubiquitinació del transportador no estava promovent una degradació clàssica per la via de proteasoma, sinó que podia estar canviant la localització a membrana del transportador com ja s'ha descrit per a altres membres de la família SLC (Ibáñez et al. 2016). Per a provar aquesta teoria, una de les aproximacions que es va realitzar va ser analitzar la senyal d'hCNT1 per immunofluorescència en condicions de silenciament i sobreexpressió de RNF41 (Fig. 58).

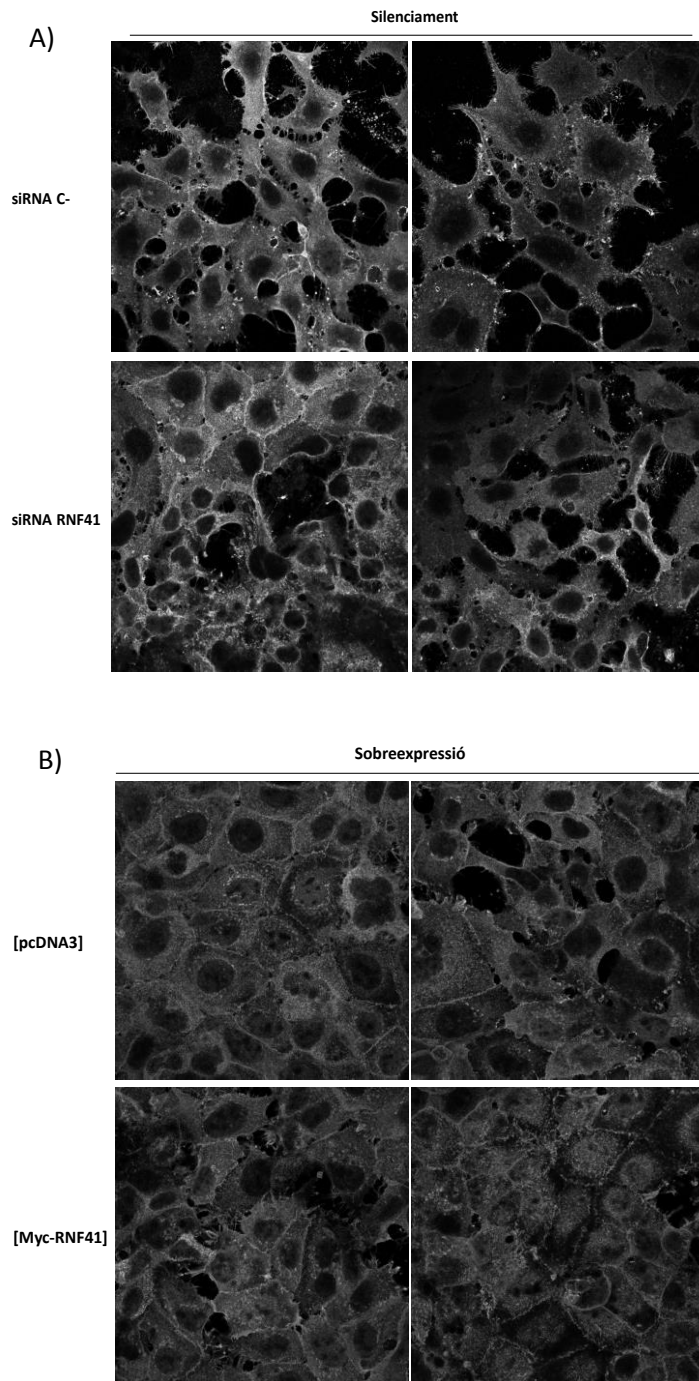


Figura 58. Immunolocalització d'hCNT1. Immunocitoquímica d'hCNT1 en la línia HEK-hCNT1 en condicions de silenciament d'RNF41 (A) o de sobreexpressió de Myc-RNF41 (B). Imatges de microscòpia confocal adquirides amb el microscopi Leica SPE. Objectiu 63x.

Com s'aprecia en la figura 58, no es veuen canvis importants en la localització d'hCNT1 que ens puguin induir a pensar que el canvi d'activitat estigui causat per una diferent localització a membrana. De tota manera, per poder quantificar aquesta

observació caldria fer una tinció de la membrana plasmàtica i analitzar la colocalització a membrana en totes les condicions.

Altra possible tècnica per realitzar aquest tipus de mesura seria analitzar-ho per citometria-FACS (FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) que permet diferenciar de quan la proteïna està a la membrana de la cèl·lula o no, però per a aquest assaig es necessita un anticòs contra hCNT1 que reconegui només la regió extracel·lular i l'anticòs amb el qual s'ha treballat està dirigit contra l'extrem amino terminal intracel·lular.

També es podria realitzar una biotinitització de les proteïnes de membrana i comparar per *western blot* la proporció d'hCNT1 a membrana en condicions de silenciament i sobreexpressió d'RNF41.

Una altra opció seria que la ubiquïtinació estigués produint un canvi conformacional que reduís l'activitat del transportador com s'ha descrit per a altres proteïnes de membrana (Foot et al. 2016). Per a provar aquestes hipòtesis, el que seria més adient seria mutar les lisines susceptibles de ser ubiquïtinades i observar si els canvis d'activitat es segueixen produint en les condicions de silenciament i sobreexpressió. També pot servir d'informació quin tipus d'ubiquïtinació s'està donant, ja que poden haver diversos tipus (lineal, ramificada...) i en funció del tipus l'efecte sobre la proteïna diana és diferent (Komander, 2009). Podria passar que l'ubiquïtinació es donés en altres residus diferents a la lisina (McDowell & Philpott, 2013). Açò s'ha de tenir en compte perquè malgrat mutar els residus de lisina potser es segueix donant la ubiquïtinació.

Com ja s'ha descrit per a altres transportadors com el transportador de monocarboxilat 8 (MCT8), la ubiquïtinació pot influir en la seva capacitat d'oligomeritzar (Zwanziger et al., 2016). En el cas de l'ortòleg procariota vcCNT, està descrit que podria formar trímers segons la seva estructura cristal·lina (Johnson et al., 2012). Com que l'homologia del vcCNT amb els hCNTs és elevada, no es pot descartar que els hCNTs també puguin oligomeritzar i que existeixi algun tipus de relació amb l'activitat i l'estat d'ubiquïtinació. No obstant, primerament s'hauria de demostrar que aquesta oligomerització existeix per a hCNT1.

També podria passar que l'ubiquitinació pogués estar canviant la localització del transportador en els diferents microdominis lipídics que hi ha a la membrana (*lipid rafts*). Per a hCNT3 es va descriure com una variant polimòrfica promovia aquest canvis de localització i afectava a la seva activitat (Errasti-Murugarren et al., 2010b).

Cal tenir en compte que el model amb el qual hem treballat, la línia HEK-hCNT1 que sobreexpressa establement el transportador, ens ha sigut molt útil per trobar algun tipus de relació funcional. No obstant, s'ha de ser conscient que es tracta d'un model d'expressió heteròleg i potser algun dels resultats obtinguts no es reproduïen en un context més fisiològic. De fet, al sobreexpressar el transportador potser s'estan emmascarant efectes que en un model *in vivo* podrien ser més potents i la importància biològica de la interacció cobraria més pes. Un dels efectes que no podríem estar observant és la possible degradació del transportador. En principi, els nivells de proteïna total d'hCNT1 no sembla que canvien en condicions de silenciament o sobreexpressió de RNF41, però com que el model estudiat expressa molta quantitat d'hCNT1 potser seria adient inhibir la degradació proteica per tal de veure si els nivells d'hCNT1 es modulen sota aquestes condicions. Per inhibir la degradació proteica bé podríem utilitzar inhibidors del proteasoma com MG132 o inhibidors de la degradació lisosomal o autofàgica com la hidroxiclороquina. Si els nivells d'hCNT1 canvien amb el silenciament o sobreexpressió d'RNF41 quan s'inhibeix la degradació proteica, voldria dir que estem davant d'un mecanisme de regulació on sí que intervé la degradació proteica.

Donat que molts fàrmacs antitumorals entren a la cèl·lula a través d'hCNT1 (Molina-Arcas et al., 2008), seria interessant potenciar l'activitat del transportador en cèl·lules tumorals per a incrementar l'eficàcia del fàrmac. A més, si tenim en compte que l'expressió d'hCNT1 es veu reduïda en processos oncològics (Farré et al., 2004; Mohelnikova-Duchonova et al., 2013), és fonamental aconseguir el màxim d'activitat d'hCNT1 a les cèl·lules canceroses. La degradació proteica és un mecanisme molt regulat dintre de la cèl·lula i que en moltes malalties es veu alterat. Actualment s'apunta a les lligases E3 del sistema d'ubiquitinació com a bones dianes de fàrmacs ja que hi ha unes 600 en el genoma i tenen certa selectivitat de substrat en comparació a les lligases E1 i E2, de les quals només en trobem 2 i 40 en el genoma respectivament (D. Wang et al., 2015). De fet, ja hi ha algun assaig clínic en fase 1 amb aquest tipus de fàrmacs (Shen et

al., 2013). Una possible estratègia farmacèutica per potenciar l'activitat d'hCNT1 podria ser el tractament amb lenalidomida, un derivat de la talomida que s'utilitza per al tractament de la leucèmia limfàtica crònica (Badoux et al., 2011) i que inhibeix l'activitat ubiquitina lligasa d'RNF41. Hi ha un estudi on es descriu que el tractament amb lenalidomida estabilitza un receptor pel fet d'inhibir RNF41, ja que és l'encarregada d'iniciar la degradació el receptor (Basiorka et al., 2016). Llavors, podria ser que inhibint RNF41 amb lenalidomida es pogués aconseguir una major eficiència de fàrmacs com la gemcitabina i la citarabina gràcies a l'increment d'activitat d'hCNT1. Com que la inhibició de l'activitat d'hCNT1 per part d'RNF41 no sembla que sigui per degradació proteica, per a que aquest tractament fos eficaç seria necessari que les cèl·lules tumorals encara retinguessin l'expressió d'hCNT1 per poder potenciar l'activitat. En casos on l'expressió del transportador s'ha perdut per complert aquest tractament segurament no seria efectiu.

Una altra possible estratègia per modular aquesta interacció proteica seria mitjançant molècules sintètiques que interferiren en la unió de les dues proteïnes (Fig. 59). En els últims anys, les interaccions proteiques han emergit com un objectiu important per a tractaments terapèutics i ja hi ha nombrosos fàrmacs que modulen interaccions proteiques i que estan en estudis clínics avançats (Keeton et al., 2017; Scott et al., 2016). Entre aquests fàrmacs, els pèptids sintètics són interessants per les seves propietats de poder aconseguir l'estructura desitjada. La principal dificultat que comporta és que aquests pèptids són molt inestables *in vivo* i tenen una baixa internalització cel·lular, no obstant, més de 200 fàrmacs derivats de pèptids estan o han estat utilitzats (Nevola & Giralt, 2015). També hi ha altres molècules de síntesi química que poden exercir aquest paper (Kanthala et al., 2014). En qualsevol cas, per tal de poder aplicar aquestes estratègies a la interacció estudiada en aquest treball, seria necessari determinar la regió molecular on es dona aquesta interacció per poder intervenir per trencar-la o reforçar-la.

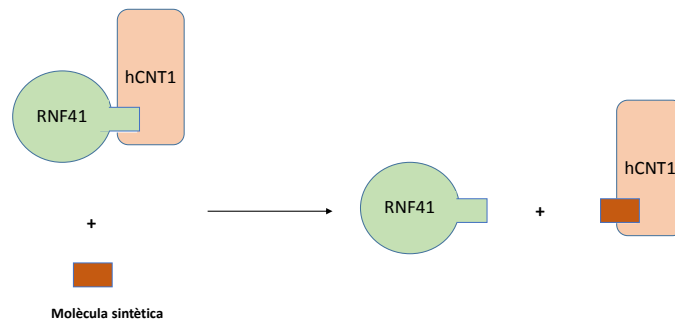


Figura 59. Esquema representatiu de la possible regulació de la interacció entre RNF41 i hCNT1 mitjançant una molècula sintètica.

Des d'un punt de vista fisiològic, per poder entendre el sentit biològic d'aquesta interacció s'hauria d'estudiar en altres models on hi hagués expressió endògena de les proteïnes. Per exemple, hi ha diversos estudis fets sobre la influència d'RNF41 en la degradació d'ErbB3/HER3 i la implicació en biologia tumoral que suposa aquesta degradació en cèl·lules de càncer colorectal, on totes dues proteïnes s'expressen (Jiang et al., 2015; Lu et al., 2014). Donat que ErbB3/HER3 és un receptor que intervé en senyalització dintre de processos carcinògens (Mujoo et al., 2014) i activa vies de senyalització com Erk i PI3K les quals la restitució d'hCNT1 també pot activar (Pérez-Torras et al., 2013), podria ser interessant buscar un model on totes tres proteïnes s'expressaren per poder buscar una possible relació funcional. El model més senzill seria buscar una línia cel·lular que les expressés totes tres, però com que l'expressió dels hCNTs està lligada a models cel·lulars diferenciats i es perd en línies immortalitzades (Pastor-Anglada et al., 2008) estem davant d'una limitació experimental. Una opció seria transduir hCNT1 en línies on hi hagi expressió d'RNF41 i ErbB3. Altra opció seria buscar un model de cultiu primari on encara es conservés certa diferenciació cel·lular i expressió d'hCNT1 com són els hepatòcits humans, on segons resultats no publicats del grup de recerca sabem que es reté la seva expressió en cultiu durant uns dies. O bé es podria fer l'estudi en un model *in vivo*.

Ens trobem davant la situació on RNF41 sembla estar regulant dues proteïnes que comparteixen l'activació de les mateixes vies, però amb resultats biològicament oposats ja que ErbB3 incrementa la supervivència mentre hCNT1 indueix mort cel·lular (Figura 60). A més, la regulació que exerceix RNF41 sobre ambdues és diferent ja que

s'encarrega d'ubiquïtinar a Erbb3 i això provoca una degradació proteolítica del receptor i una reducció de la senyalització. I pel que fa a hCNT1, també sembla ubiquïtinar-lo, però no per degradar-lo sinó per reduir la seva activitat de transport. De fet, no es sap quin efecte té RNF41 sobre la senyalització que es dona a través d'hCNT1, sabem que redueix la seva activitat transportadora però no s'ha analitzat quin efecte pot tenir en la suposada activitat transceptora. Podria ser que en funció del tipus cel·lular aquestes regulacions fossin diferents, de fet, cada estudi està realitzat en un model distint i no es sap com funcionaria en altra situació.

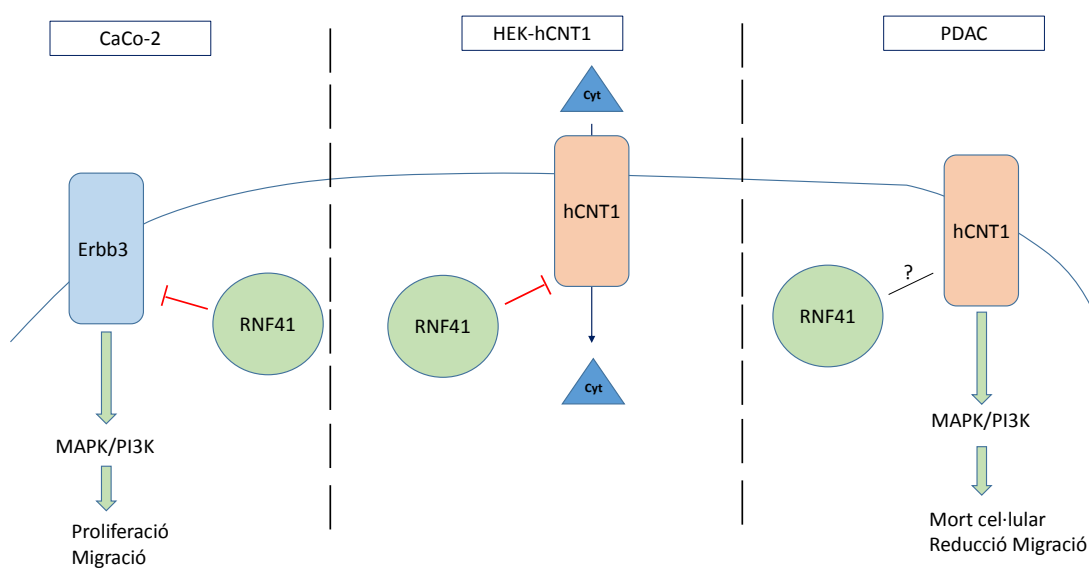


Figura 60. Esquema representatiu de la regulació que exerceix RNF41 sobre Erbb3 i hCNT1 en els diferents models cel·lulars.

En aquesta tesi s'ha fet un treball experimental preliminar amb l'objectiu d'esbrinar la funció cel·lular de les interaccions proteiques d'hCNT1 i aportar coneixement bioquímic bàsic sobre aquesta proteïna. Arran de la relació funcional evidenciada entre hCNT1 i RNF41 s'ha proposat algun tipus d'implicació a nivell fisiològic i algunes estratègies per poder modular aquesta interacció en funció d'interessos mèdics, com pot ser la potenciació de l'activitat d'hCNT1 per a casos clínics concrets. No obstant, som conscients que per tal de poder plantejar hipòtesis més sòlides s'haurà d'estudiar aquesta interacció proteica en models d'estudi més complexos i semblants a la realitat fisiològica de les cèl·lules d'un ésser humà com pugui ser un model de cultius primaris o un model *in vivo*.

DISCUSSIÓ GENERAL

Els transportadors de nucleòsids són els encarregats d'internalitzar els nucleòsids i els seus derivats dintre de la cèl·lula. Aquesta funció els confereix una gran importància fisiològica ja que els nucleòsids són precursors metabòlics imprescindibles per a la viabilitat cel·lular i els derivats sintètics de nucleòsids tenen una acció farmacològica determinant en el tractament d'algunes malalties com diferents tipus de càncer, malalties víriques o inflamatòries. A més, l'expressió d'alguns transportadors de nucleòsids està descrit que es regula en processos oncològics (Lane et al., 2010) o en resposta a diferents estímuls proliferatius o diferenciadors (Aymerich et al., 2004; Soler et al., 2001a). Per tant, l'estudi d'aquestes proteïnes és d'importància notòria a nivell biomèdic. De fet, està descrit que els transportadors SLC són una oportunitat emergent com a dianes terapèutiques (Lin et al., 2015).

D'entre tots els transportadors de nucleòsids, aquesta tesi s'ha centrat en analitzar el paper de la proteïna hCNT1, codificada pel gen *SLC28A1*. Fins fa pocs anys, l'estudi d'aquesta proteïna havia estat centrat en les seves propietats com a transportador de nucleòsids pirimidínics i els seus derivats farmacològicament actius. No obstant, cada cop existeixen més evidències de que aquesta proteïna està realitzant funcions addicionals a la capacitat de transportar els seus substrats dintre de la cèl·lula. Com ja s'ha comentat, la restitució de l'expressió d'hCNT1 en línies d'adenocarcinoma pancreàtic induïx canvis fenotípics importants per a la biologia tumoral com l'alteració del cicle cel·lular i l'activació de vies de senyalització relacionades amb la supervivència cel·lular independentment de la seva capacitat de translocar substrat. Per aquest motiu es considera que hCNT1 pot estar jugant un paper de transceptor (Pérez-Torras et al., 2013). A més, també s'ha descrit que l'expressió d'aquest transportador es veu reduïda en alguns tipus de processos oncològics (Bhutia et al., 2011; Farré et al., 2004; Lane et al., 2010). Aquestes evidències ens van fer plantejar l'estudi de la proteïna hCNT1 des d'un punt de vista on es pogués demostrar el rol del transportador i la seva rellevància fisiològica.

En el transcurs d'aquesta tesi doctoral es va tenir accés a unes dades clíniques que semblarien correlacionar per primer cop una malaltia de fenotip sever amb una nova mutació descrita per a hCNT1, tot i que no podem descartar que la severitat del fenotip sigui causada per una combinació atzarosa amb diferents alteracions en el

mateix gen o en altres gens. Aquesta nova mutació descrita indueix un dèficit en la recaptació de nucleòsids que seria causat per uns nivells d'expressió inferiors de la proteïna mutada respecte a la proteïna *wild type*. Els resultats preliminars suggereixen que aquesta proteïna mutada podria tenir una vida mitja inferior. Aquesta reducció de l'expressió i, en conseqüència, de l'activitat biològica d'hCNT1 podria comportar una desregulació fisiològica que lligaria amb algun dels trets fenotípics que presentava el pacient, com la pèrdua de nucleòsids pirimidínics per orina. A part d'aquest dèficit en la recaptació, no es pot descartar que l'efecte de la mutació pugui ser causat per una alteració de les funcions addicionals a la capacitat de transportar nucleòsids (funcions transceptoras). Si finalment es confirma que les alteracions en el gen *SLC28A1* són les causants d'aquest fenotip tan sever es reforçaria la idea de la importància fisiològica d'hCNT1.

El domini amino terminal dels transportadors de nucleòsids concentratius és una adquisició evolutiva dels transportadors eucariotes respecte dels procariotes, a més, està descrit que no és un domini estrictament necessari per al transport de nucleòsids (Hamilton et al., 2001). Es tracta d'un domini intracel·lular que representa aproximadament el 10% de l'estructura primària per al qual no es coneix cap estructura definida. Aquestes evidències fan pensar que es tracta d'un domini on el transportador pugui interaccionar amb altres proteïnes i portar a terme les funcions accessòries a la captació de nucleòsids. Per tal d'estudiar si la capacitat d'hCNT1 de generar canvis fenotípics en la cèl·lula resideix en aquest domini, ens vam plantejar fer un estudi funcional del mateix. Per aquesta raó es va decidir dissenyar proteïnes quimèriques bescanviant els dominis amino terminal entre els diferents membres de la família gènica *SLC28* i es va comprovar que fossin funcionals i que presentaren una localització subcel·lular correcta. Un cop generades aquestes proteïnes quimèriques en vectors adenovirals es va procedir al seu estudi bioquímic en una línia d'adenocarcinoma pancreàtic. En assajos preliminars, no semblaria que el fet de bescanviar el domini amino terminal d'hCNT1 amb el dels altres hCNTs sigui suficient per a que puguin generar aquestes funcions transceptoras. No obstant, si bescanviem el domini amino terminal a la proteïna hCNT1 pel domini amino terminal d'altres hCNTs aquestes funcions accessòries es perden. Açò ens suggereix que aquest domini per si sol no és capaç de

generar aquesta resposta en altres proteïnes però sí és necessari per a que hCNT1 actui com un transceptor.

La funció transceptora no es pot descartar que pugui ser causada per les proteïnes que estiguin interaccionant amb hCNT1. La primera aproximació per trobar proteïnes d'interacció es va realitzar amb un cribratge de doble híbrid en bacteris on només s'utilitzava el domini amino terminal. Amb aquest mètode es va trobar prosaposina com a possible interacció d'hCNT1 i es va realitzar l'estudi bioquímic i funcional de la interacció. Malauradament els anticossos dels que disposàvem no eren específics i no es va poder concloure la validació bioquímica, tot i que en fer estudis funcionals sí que vam observar que al silenciar prosaposina observàrem una caiguda d'activitat d'hCNT1, intuïnt així una possible regulació funcional entre totes dues proteïnes.

No obstant, donat que les tècniques per detectar proteïnes d'interacció s'han anat millorant en els últims anys, ens vam plantejar realitzar un assaig que ens permetés treballar amb la proteïna sencera i en un model de treball més similar a la cèl·lula humana. Per aquests motius, es va decidir iniciar un cribratge per buscar proteïnes d'interacció mitjançant la tècnica MYTH (*Membrane Yeast Two-Hybrid*), que permet fer l'assaig amb la localització de la proteïna a membrana en un model eucariota com és el llevat. Després de realitzar el cribratge per als tres membres dels transportadors de nucleòsids concentratius es van trobar tres possibles proteïnes d'interacció per a hCNT1 i tres per a hCNT3 que van ser validades per co-immunoprecipitació i co-immunocolocalització. Entre les possibles proteïnes d'interacció obtingudes per a hCNT1, es va iniciar l'estudi de la implicació funcional de la interacció amb RNF41 ja que està descrit que té una relació amb múltiples processos oncològics (Lu et al., 2014; Jiang et al., 2015) i al tractar-se d'una ubiquitina lligasa podia estar regulant els nivells d'expressió del transportador, com ho fa per a altres receptors (Mujoo et al., 2014). Hem pogut constatar que RNF41 sembla estar modulant l'estat d'ubiquitinació d'hCNT1 i que aquest canvi afecta a l'activitat biològica del transportador. Per tant, a partir d'una modulació de l'activitat d'RNF41, bé per mètodes genètics o farmacològics, s'ha obert la possibilitat de modular l'activitat biològica d'hCNT1, la qual cosa permetria

incrementar la sensibilitat de les cèl·lules a fàrmacs derivats de nucleòsids pirimidínics que són emprats per al tractament de diverses malalties.

CONCLUSIONS

-Per primera vegada sembla que es correlaciona el fenotip sever d'una malaltia amb la presència d'una nova mutació descrita per al gen *SLC28A1*. L'estudi molecular de la proteïna mutant mostra una reducció en la captació de nucleòsids respecte a la proteïna *wild type*. Aquest dèficit en el transport de nucleòsids és causat per uns nivells d'expressió més baixos que semblarien ser originats per un vida mitja de la proteïna mutada inferior respecte a la *wild type*.

-L'estudi funcional del domini amino terminal d'hCNT1 suggeriria que aquesta regió és necessària però no és suficient per induir les funcions transceptoras descrites per a hCNT1, ja que al bescanviar aquest domini amb els altres transportadors de la família SLC28 s'evita la inducció de la senyalització cel·lular depenent d'hCNT1.

-La interacció entre hCNT1 i prosaposina sembla estar regulant l'activitat biològica del transportador, tot i que no s'ha pogut validar bioquímicament la interacció per la manca d'eines adequades.

-Mitjançant la tècnica MYTH s'han descobert tres possibles proteïnes d'interacció per a hCNT1 (BBOX1, NFIC i RNF41) i tres per a hCNT3 (QDPR, GABARAPL-2 i GTF3C5) . Totes elles han estat validades bioquímicament per tècniques de co-immunoprecipitació i co-immunocol·localització.

-La interacció entre hCNT1 i RNF41 semblaria condicionar l'estat d'ubiquitinació del transportador així com la seva activitat biològica.

MATERIALS I MÈTODES

1. Cultius cel·lulars

1.1 Introducció

El cultiu cel·lular és el procés pel qual s'aconsegueix mantenir cèl·lules eucariotes en creixement en un entorn artificial (*in vitro*) en el qual hem de mantenir les condicions necessàries per a que les cèl·lules es divideixin. La finalitat d'aquesta tècnica és aconseguir un model de treball aproximat a la situació fisiològica i que és àmpliament utilitzat en l'àmbit de la bioquímica i la biologia cel·lular. El principal avantatge d'aquest model és: la relativa facilitat d'ús i de modificar l'entorn fisicoquímic (temperatura, pH, O₂...) i fisiològic (presència de nutrients, hormones, alteracions genètiques...). D'aquesta manera es redueix l'ús d'animals per a l'experimentació. El principal desavantatge d'aquest model és el canvi que es produeix en les cèl·lules al treure-les del seu entorn natural (*in vivo*). Entre els principals canvis que es donen al cultivar cèl·lules *in vitro* està la desregulació gènica (canvis en perfils d'expressió de gens) que pot comportar múltiples alteracions dintre de la cèl·lula, per aquest motiu, s'ha de ser conscient de la limitació d'aquest model.

Dintre dels cultius cel·lulars, podem diferenciar-los segons el tipus de cèl·lules (animals, vegetals, fúngiques...) o segons la capacitat d'adherència (cultius en monocapa o cultius en suspensió). També distingim entre cultius primaris o línies cel·lulars. Els cultius primaris són aquells obtinguts a partir de la disgregació d'un teixit acabat d'aïllar i tenen una capacitat de divisió limitada ja que les cèl·lules entren en senescència una vegada superen el límit de Hayflick. Quant a les línies cel·lulars establertes o immortalitzades, tenen una capacitat de divisió il·limitada. Entre els mètodes d'establiment d'una línia trobem:

- La immortalització espontània.
- L'aïllament a partir d'un teixit cancerós.
- Inducció viral o química que desregula gens implicats en la divisió cel·lular

En aquest treball s'han utilitzat únicament línies cel·lulars immortalitzades en monocapa.

1.2 Condicions i material per al treball amb cultius cel·lulars

Per tal de garantir que el treball amb els cultius cel·lulars es faci de manera adequada s'han de seguir una sèrie de mesures d'esterilitat per evitar contaminacions (tant microbiològiques com entre diferents línies). Per aquesta raó, tot el material que entri en contacte de manera directa o indirecta amb les cèl·lules ha de ser estèril. Quant al material de plàstic que no es pugui autoclavar, s'ha de comprar material especial que ja sigui estèril. Pel que fa a altres tipus de materials (per exemple: pipetes de vidre, solucions com PBS...) abans d'utilitzar-los s'han d'autoclavar. En el cas de solucions sensibles a la temperatura, per a esterilitzar-les, es filtraran a través d'un filtre de 0,22 μm .

Pel que fa al lloc de treball on es manipulen les cèl·lules, s'ha de fer dintre d'una campana de flux laminar vertical. Totes les superfícies i el material que entri a la campana ha de ser netejat amb una solució d'etanol al 70%. L'usuari/a que estigui treballant a la campana haurà de portar bata i guants.

El material bàsic necessari per a realitzar experiments amb cultius cel·lulars és el següent:

- Campana de flux laminar vertical amb filtre HEPA, sistema de llum UV i bomba de succió.
- Incubador de cèl·lules amb atmosfera controlada (5% CO₂, 37°C, humitat a saturació). Els cultius cel·lulars necessiten el CO₂ per a tamponar el medi de cultiu amb les seves formes en solució (hidrogencarbonat i carbonat), que es comporten com una solució amortidora que neutralitza els àcids produïts durant el metabolisme cel·lular.
- Equipament criogènic: congeladors a -80°C, contenidor amb isopropanol per fer una congelació gradual de les cèl·lules i tancs d'emmagatzemament de cèl·lules amb nitrogen líquid.
- Microscopi invertit
- Bany amb termòstat.
- CountessTM automated cell counter (Invitrogen) o cambra de Neubauer.

-Plaques i flascons estèrils de plàstic per a créixer les cèl·lules i realitzar els assajos corresponents. El plàstic d'aquests instruments ha estat tractat per a millorar l'adherència de les cèl·lules.

1.3 Manteniment dels cultius cel·lulars

Encara que definim les línies cel·lulars com immortalitzades, són un sistema molt sensible als canvis i factors externs i que, si no les mantenim adequadament, poden deixar de créixer o fer-ho de manera anormal. Un cop sembrem o inoculem una quantitat de cèl·lules en una placa tendiran a dividir-se fins ocupar tota la superfície, arribant així a la confluència màxima. Depenent de cada línia, el concepte de confluència màxima és diferent ja que la morfologia difereix i també la tolerància a la confluència varia. En termes generals, mai s'ha de permetre que la placa arribi a confluència total ja que el contacte entre cèl·lules durant un temps prolongat porta a les mateixes a entrar en apoptosi o arrest del cicle cel·lular. Per aquesta raó, per mantenir una línia en constant creixement, en el cas de les línies emprades en aquesta tesi de creixement en monocapa, haurem de canviar constantment el recipient on estan creixent (passatge). Açò consisteix en desadherir les cèl·lules en la placa i inocular certa quantitat en una placa o flascó nou fins que el tornin a emplenar. Mentre omplen la nova placa, s'haurà de recanviar el medi de cultiu cada dos dies per tal de treure els residus cel·lulars i reposar els nutrients necessaris.

Per tal de proporcionar a les cèl·lules els components necessaris per a que creixin i es divideixin les hem de mantenir amb medi de cultiu suplementat amb glutamina, sèrum boví fetal i antibiòtics. Cada línia necessita un tipus de medi de cultiu en funció de la seva fisiologia. La suplementació amb glutamina es fa perquè és l'aminoàcid més inestable i durant el procés d'emmagatzemament del medi pot degradar-se. Pel que fa al sèrum, l'afegim per a proporcionar una barreja de factors de creixement i micronutrients sense els quals les cèl·lules no poden créixer. Els antibiòtics s'afegeixen per evitar les temudes contaminacions microbianes.

1.3.1 Tripsinització i passatge

El procés de passatge de les línies es realitza de forma rutinària dos cops per setmana (dilluns i divendres) per a aconseguir un estat cel·lular constant al llarg de les setmanes i així poder reduir variables experimentals. Per a desadherir les cèl·lules fem una solució que conté EDTA i tripsina. L'EDTA actua com a quelant de Ca^{2+} , aquest ió és necessari per a la unió cèl·lula-cèl·lula, llavors aconseguim debilitar aquesta unió. La tripsina és un enzim proteolític que degradarà les proteïnes que trobi, la incubació amb tripsina pot ser letal per a les cèl·lules si es deixa durant molta estona ja que pot degradar proteïnes imprescindibles per a la viabilitat cel·lular. El temps d'incubació dependrà de la línia cel·lular. En principi, es deixa el temps mínim per a que trenqui les proteïnes d'unio entre cèl·lules i entre les cèl·lules i la placa. Abans de desadherir les cèl·lules, s'han de rentar amb una solució iso-osmòtica com el PBS per tal de eliminar les restes de sèrum, ja que el sèrum conté factors que inhibeixen la tripsina.

Cal ser conscient que el nombre de passatges influirà en l'estat de la línia cel·lular. Amb el temps, les cèl·lules van acumulant alteracions genètiques com tenir un nombre irregular de cromosomes. Per això és important anotar el passatge en el qual es troba la línia en funcionament, si el passatge és molt elevat caldrà renovar-les.

1.3.2 Congelació i descongelació

Com que les línies cel·lulars van canviant amb els passatges, s'ha d'intentar mantenir un *stock* de cèl·lules amb passatge baix. Per aquesta raó i per tal de conservar-les al llarg del temps (durant anys) les cèl·lules són congelades en nitrogen líquid. Per tal de congelar-les i que mantinguin la viabilitat, haurem d'afegir agents crioprotectors com el DMSO o el glicerol. Aquests agents bàsicament el que faran serà penetrar dintre de la cèl·lula e impedir la formació de cristalls d'aigua que trencarien les estructures cel·lulars que reduirien la viabilitat. Cal dir que aquests agents són tòxics per a la cèl·lula i només hauran d'estar en contacte el temps mínim necessari per a realitzar la congelació.

Per tal de descongelar-les, el que farem serà treure el vial del tanc de nitrogen líquid i descongelar-lo el més ràpidament possible: en un bany d'aigua a 37°C. Un cop

descongelades, es treuen i es barregen amb medi de creixement en un tub Falcon per diluir l'agent crioprotector. A continuació es centrifuguen (1200rpm, 4 min) i eliminem el sobrenedant on hi haurà una elevada proporció de DMSO. Finalment resuspenem el pellet de cèl·lules amb medi de creixement suplementat amb un 20% de sèrum (un 10% més del que és habitual per al manteniment) per a incrementar la viabilitat del procés de descongelació i facilitar que les cèl·lules creixin.

Un cop hem amplificat el nombre de cèl·lules i volem congelar-les, el que caldrà es fer el procés invers. Primerament tripsinitzarem les cèl·lules, a continuació les centrifugarem per eliminar les restes de medi i tripsina que poden influir en la congelació. Llavors barrejarem les cèl·lules amb el medi de congelació. En el nostre cas, el medi de congelació està compost per FBS (*Fetal Bovine Serum*) i DMSO en proporció 9:1. La funció del sèrum és proveir a les cèl·lules de totes les molècules necessàries per a la seva viabilitat. Un cop resuspeses en medi de congelació, s'aliquoten en criotubs especials per ser congelats en nitrogen líquid. Aquesta congelació ha de fer-se de manera gradual ja que una congelació instantània redueix la viabilitat cel·lular. Per això, introduïm els criotubs en un recipient que conté una capa externa d'isopropanol. Aquesta capa permet que la temperatura es redueixi gradualment aproximadament 1°C per minut. Aquest recipient es guarda en congeladors de -80°C, on poden estar entre 4h i un mes. Finalment, introduïrem els vials en el tanc de nitrogen líquid on podran ser emmagatzemades durant anys.

1.4 Línies cel·lulars utilitzades

1.4.1 Línia HEK293

La major part de resultats d'aquest treball han estat generats amb aquesta línia o alguna variant de la mateixa. El nom de la línia respon a la seva procedència, en anglès les sigles HEK responen a *Human Embryonic Kidney* (ronyó embrionari humà) i el nombre 293 respon a la nomenclatura experimental que el seu descobridor, Frank Graham, donava als seus assajos. La línia va ser establerta el 1973 a partir de la transformació de cèl·lules humanes amb l'adenovirus 5. La transformació es va aconseguir per la inserció

de 4,5 kb del genoma viral en el cromosoma 19. Les cèl·lules HEK293 tenen un cariotip complex, presentant dos o més còpies de cada cromosoma. L'elecció d'aquesta línia radica en la seva facilitat per a ser transfectada, llavors permet l'estudi heteròleg dels gens d'interès. Un dels factors limitants experimentals d'aquest treball era l'absència de línies cel·lulars que expressessin els hCNTs de manera endògena, llavors s'ha hagut d'utilitzar sistemes d'expressió heteròloga.

Dintre d'aquesta línia hem utilitzat diferents variants genètiques segons el seu ús. El manteniment de cadascuna difereix lleugerament:

1.4.1.1 HEK293

El medi de cultiu utilitzat és DMEM suplementat amb FBS al 10%, glutamina 2mM i 1% de penicil·lina/estreptomicina. La dilució aproximada per a subcultivar-les variava entre 1:8 i 1:12 i el passatge s'havia de realitzar entre el 85-95% de confluència (sense arribar mai a la confluència total).

1.4.1.2 HEK293-hCNT1/pcDNA5

Aquesta variant de la línia va ser generada al laboratori per la Dra. Medina-Pulido amb el sistema Flp-In™, d'aquesta manera la línia expressa de manera estable la proteïna hCNT1 ja que la seqüència ha estat integrada en el genoma. El manteniment d'aquesta línia i el control buit pcDNA5 és idèntic a les HEK293.

1.4.1.3 AD293

Per tal de produir els adenovirus recombinants generats per a un bloc del treball es va haver d'utilitzar aquesta varietat comercial de les HEK293 (Stratagene). Segons la companyia que l'ha generada presenten una major adherència a la placa i són més indicades per a l'amplificació d'adenovirus recombinants. El manteniment d'aquesta varietat difereix de les anteriors: el medi de cultiu era DMEM suplementat amb FBS inactivat al 5%, glutamina 2mM i 1% de penicil·lina/estreptomicina. El canvi respecte a les altres era la confluència al subcultivar-les, segons les instruccions, mai havien de

superar el 50% de confluència a la placa i la dilució havia de ser 1:10. Llavors requerien uns tres passatges per setmana.

1.5 Control de micoplasma

La contaminació dels cultius cel·lulars amb micoplasma es coneix des de fa dècades. Aquest microorganisme pot alterar les cèl·lules dràsticament i interferir en els resultats, especialment quan es treballa amb el metabolisme de nucleòsids i nucleòtids (Voorde et al., 2014). En aquest treball, la presència de micoplasma influïa de manera evident en els assajos de transport de nucleòsids. A causa de la seva petita grandària (100 nm aproximadament, és l'esser viu més petit que es coneix) són indetectables inclús al microscopi i els canvis conformacionals que provoquen a les cèl·lules no sempre són clars, es requereix un coneixement exhaustiu de la línia per evidenciar-ne la contaminació, a més, com que no tenen paret cel·lular no es veuen afectats per antibiòtics com la penicil·lina i la estreptomicina. Per aquesta raó, s'ha seguit un control rutinari de presència de micoplasma cada quinze dies. Aquest control es basa en un anàlisi del medi de cultiu amb PCR. Si alguna línia presentava micoplasma, era deixada d'utilitzar per fer experiments i es procedia a desinfectar-la amb Plasmocin®.

2. Tècniques de manipulació de l'expressió de proteïnes

Per tal de dilucidar la funció d'una proteïna existeixen tècniques que ens permeten introduir (sobreexpressar) aquesta proteïna en els models d'estudi o, si ja hi és present, disminuir la seva expressió (silenciament).

2.1 Sobreexpressió

Entre els mètodes que hi ha per introduir el material genètic que codifica per la proteïna (plasmidis amb el cDNA) en un model experimental, en aquest treball hem utilitzat principalment la transfecció transitòria i la transducció viral.

2.1.1 Transfecció transitòria

Dintre dels procediments de transfecció transitòria, s'ha utilitzat el mètode químic amb fosfat càlcic ja que permet transfectar de manera eficient el principal model d'estudi: la línia HEK293. A més, el protocol és relativament senzill i reproduïble. El mètode es basa en la formació de precipitats de DNA i Ca^{2+} per unions electrostàtiques en una solució salina de diferents formes de fosfats sòdics; el pH s'ha de mantenir a 6,4 per a aconseguir transfeccions eficients per a HEK293. Aquests precipitats són internalitzats per la cèl·lula i llavors el DNA queda a la disposició de la maquinaria cel·lular de transcripció i traducció, generant-se així la proteïna d'interès. El DNA que s'internalitza ha d'estar en forma plasmídica (tots els nostres constructes estan clonats en el vector pcDNA3.1) que queda en forma epicromosòmica i no arriba a entrar al nucli, es per això que s'anomena transitòria, ja que amb les conseqüents divisions cel·lulars es perdrà la informació genètica. El protocol de transfecció que s'ha seguit en la tesi és el següent:

-Tampons (ambdós han de ser preparats amb aigua Milli-Q i després filtrats amb un filtre de 0,22 μM per esterilitzar-ho):

-Calci:

500mM CaCl_2

100mM Àcid N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfonic (BES)

pH= 6.95

-Fosfat:

280mM NaCl

0,75mM Na₂HPO₄

0,75mM NaH₂PO₄

pH= 6.4

El procediment habitual era sembrar les cèl·lules a una densitat adequada (aproximadament 25000 cèl·lules/cm²) per a que al dia següent estiguessin a la confluència òptima de transfecció, que varia entre el 60 i el 90% de confluència segons el tipus d'assaig i la durada del mateix. El procés consisteix en mesclar el DNA en solució aquosa amb el tampó de calci per formar el precipitat (la Taula 8 ens orienta de les quantitats que hem d'afegir de cada reactiu). A continuació s'afegia el tampó fosfat amb cura i es barrejava bombollejant la mostra per acabar de formar els complexos i es deixava reposar durant 15 minuts a temperatura ambient. Finalment s'afegia gota a gota sobre les cèl·lules i s'incubava durant tota la nit. Al dia següent es canviava el medi per medi fresc. Està descrit que el pic d'expressió es dona al voltant de les 40 hores post-transfecció.

	Plaques 96 pous	Plaques 24 pous	Plaques 6 cm	Plaques 10 cm
DNA	0,1 µg	0,5 µg	5 µg	15 µg
Aigua+DNA	2,5 µL	12,5 µL	125 µL	250 µL
Calci	2,5 µL	12,5 µL	125 µL	250 µL
Fosfat	5 µL	25 µL	250 µL	500 µL
Volum total	10 µL	50 µL	500 µL	1000 µL

Taula 8. Quantitats necessàries per a la transfecció transitòria amb fosfat càlcic

2.1.2 Transducció viral amb adenovirus

En funció de la línia cel·lular, la transfecció transitòria pot ser més o menys eficient. Fins i tot, hi ha línies on l'eficiència és nul·la. Per això necessitem altres mecanismes per introduir els gens d'interès en els models experimentals triats, un d'aquests és la transducció viral. Aquest mecanisme es basa en la capacitat dels adenovirus d'infectar les cèl·lules. Per a evitar que el virus completi el seu cicle lític, els

adenovirus emprats són defectius de replicació, ja que s'han tret els gens E1 i E3. El gen E1 és essencial per a l'encapsidació del virus i el gen E3 està relacionat amb l'evasió del sistema immunitari de l'hoste. D'aquesta manera, aconseguim un mecanisme eficient i segur.

El protocol es basa en sembrar les cèl·lules a infectar el dia anterior, llavors es barreja l'adenovirus recombinant amb medi sense sèrum per evitar interferències en la infecció i s'afegeix sobre les cèl·lules en el mínim volum possible. Es deixa durant 4h a l'incubador i finalment s'aspira i es posa medi fresc. L'expressió de la proteïna d'interès s'analitza en funció de l'assaig a realitzar.

2.2 Silenciament

Per tal de reduir l'expressió d'una proteïna hi ha diferents mètodes. En aquesta tesi s'han utilitzat petites molècules d'RNA d'interferència o siRNA (*small interference RNA*). Aquestes molècules s'uneixen a l'RNA missatger del gen en qüestió i es crea una doble cadena d'RNA que és detectada pel complex proteic RISC que automàticament el degrada. Així, podem aconseguir reduir els nivells d'RNA i, consegüentment, de la proteïna del gen que ens interressi.

La introducció del siRNA dintre de la cèl·lula és un procés semblant a la transfecció transitòria per mètodes químics. En aquest cas hem utilitzat un reactiu catiónic lipídic, el TransIT-siQUEST (Mirus®). El procediment es detalla a continuació:

1-Sembrar les cèl·lules el dia anterior de manera que al dia següent estiguin entre un 60 i un 80% de confluència.

2-Atemperar el reactiu, i barrejar-lo amb medi Opti-MEM sense sèrum.

3-A continuació afegim el siRNA, ho barregem i incubem entre 15-30 minuts per a que es formin els complexos.

4-Afegim la barreja a les cèl·lules durant tota la nit. Al dia següent es canvia el medi per medi fresc i s'analitza l'expressió quan convingui.

3. Anàlisi d'expressió de proteïnes

3.1 Obtenció d'extractes proteics

L'obtenció d'extractes proteics es realitza a partir de la lisi de cèl·lules en cultiu o d'un teixit mitjançant tampons específics que mantenen les propietats de les proteïnes de manera òptima. Segons el tipus d'anàlisi, variaran les condicions d'extracció i el tampó emprat. Els tampons emprats en aquest treball han sigut:

-NP40: 50mM Tris (pH=7,4), 250mM NaCl, 1% NP-40, 5mM Pirofosfat sòdic, 50mM NaF, 1mM ortovanadat sòdic i un còctel d'inhibidors de proteases (*Complete Mini*, Roche)

-Fosforilats: 10mM Tris (pH=7,4), 400mM NaCl, 5mM NaF, 10% glicerol, 1mM EDTA, 1mM ortovanadat sòdic, 0,5% NP-50, 4mM ditiotreitòl (DTT), còctel d'inhibidors de proteases i còctel d'inhibidor de fosfatases (*PhosSTOP*, Roche).

El procediment per obtenir els extractes és:

1-Rentar les cèl·lules adherides amb PBS 1X i aspirar bé totes les restes. Seguidament congelar la placa en nitrogen líquid per aturar qualsevol procés cel·lular que pugui comportar un canvi d'expressió proteic. A partir d'aquest moment tot el treball es realitzarà en gel per evitar la degradació de l'extracte.

2-Amb la placa sobre gel afegirem el tampó de lisi sobre les cèl·lules, i amb l'ajuda d'un rascador s'aixequen totes les cèl·lules de la placa fins aconseguir una suspensió.

3-Aquesta suspensió la traslladem a un tub eppendorf i la fem passar per una xeringa de 25G almenys tres cops o fins que la mostra sigui homogènia. D'aquesta manera assegurarem la completa lisi de les cèl·lules.

4- Centrifugarem l'eppendorf a 10000g durant 15 minuts a 4°C per retirar restes de les membranes cel·lulars i restes que no s'hagin extret.

5- Recollim el sobrenedant en un tub nou i aquest serà el nostre extracte proteic.

Per tal de saber la concentració de proteïna present en cada extracte, s'ha utilitzat el mètode Bradford. Aquest mètode colorimètric es basa en el canvi de coloració en medi àcid del reactiu Coomassie G-250 al unir-se als residus bàsics de les proteïnes. Com a proteïna patró s'ha utilitzat l'albumina i s'han extrapolat els resultats d'absorbància als extractes. La sensibilitat d'aquest mètode ens permet detectar concentracions entre 1 i 15 µg de proteïna.

3.2 Electroforesi en SDS-PAGE

Un cop obtinguts els extractes, per determinar l'expressió de la proteïna d'estudi haurem de recórrer a mètodes de separació dels elements de la mostra. El més àmpliament utilitzat per a proteïnes és la electroforesi SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulfate - PoliAcrilamide Gel Electrophoresis*). Amb aquest mètode separarem les proteïnes pel seu pes molecular.

Material i reactius:

-Gels de poliacrilamida: es preparen abans de realitzar l'electroforesi o el dia abans. Dintre d'un gel trobarem dos tipus de gel:

-Gel Concentrador: Aquest gel serveix per a permetre l'entrada simultània de les mostres en el gel resolutiu. El percentatge d'acrilamida és baix (5% d'acrilamida) i el pH és més àcid que el resolutiu, açò provoca un moviment més ràpid de les proteïnes. La composició d'aquest gel, per a 4mL és: 2,7mL aigua, 0.67mL de la barreja d'acrilamida, 0.5mL Tris 1M pH 6.8, 40 µL de SDS al 10%, 40 µL de APS (*ammonium persulfate*) al 10% i 4 µL de TEMED (Tetrametiletildiamina).

-Gel Resolutiu: Aquest és el gel on es donarà la separació de les proteïnes pròpiament dita. La concentració d'acrilamida pot variar entre el 5 i el 20% en funció del pes molecular de la proteïna que estiguem interessats en separar (Taula 9).

% Acrilamida	Rang Pes Molecular (kDa)
7	50-500
10	20-300
12	10-200
15	3-100

Taula 9. Percentatge òptim d'acrilamida que ha de tenir un gel d'electroforesi SDS-PAGE en funció del pes molecular de la proteïna que volem detectar.

-Aparells de PAGE: Sistema Mini Protean 3 (BIO-RAD) i una font d'alimentació.

-Tampó d'electroforesi: Tris-Base 25mM, Glicina 191mM, SDS al 0,1%.

-Tampó de càrrega: Per a preparar-lo 5 vegades concentrat, per cada 20mL hem d'afegir 6,4mL de Tris-HCl 1M a pH=8, 2g de SDS, 10mL de glicerol i 0,2% de blau de bromofenol. Si es volen reduir els ponts disulfur de les cisteïnes, s'ha de suplementar el tampó amb un 5% de β -mercaptoetanol al moment, ja que sinó aquest reactiu es degrada. El SDS conferirà càrrega negativa a les proteïnes i així només migraran en funció del seu pes molecular. El glicerol conferirà densitat a la mostra i al carregar-la caurà dintre del pou i evitarem pèrdues. Pel que fa al blau de bromofenol serà un indicador visual de com avança l'electroforesi.

-Estàndard de pesos moleculars: Per a saber el pes de les nostres proteïnes les compararem amb una barreja de proteïnes amb pesos moleculars coneguts. El que hem utilitzat ha sigut el *Precision Plus Protein TM Standards Dual Color* (BIO-RAD) que conté marcadors entres 10 i 250 kDa.

Procediment:

1-Mesclar la quantitat d'extracte proteic que volem analitzar (entre 5 i 50 μ g) amb tampó de càrrega.

2-Carregar-les en el gel concentrador.

3-Preparar el muntatge de manera que circuli la corrent entre els dos pous i les proteïnes van dirigides cap al pol positiu del sistema. Normalment s'ha utilitzat una corrent a

amperatge constant de 40 mA per cada gel. L'electroforesi s'atura en funció del pes molecular que interressi detectar posteriorment.

3.3 Western Blot

La tècnica de *western blotting* o immunoblot, descrita per primer cop l'any 1981, consisteix en la transferència electroforètica de proteïnes des de gels SDS-PAGE a membranes de nitrocel·lulosa o PVDF per a poder fer una detecció auto-radiogràfica d'una determinada proteïna mitjançant anticossos específics.

3.3.1 Electrotransferència

-Reactius i Materials:

-Tampó de transferència: Tris-Base 25mM, glicina 191mM i metanol al 20%(v/v).

-Metanol

-Paper de filtre Whatman 3mm.

-Membrana de PVDF *Immobilon-P Transfer Membrane* (Millipore)

-Aparell de transferència de gels a membranes: Sistema *Mini Protean* (Bio-Rad)

-Solució Ponceau (0,1% Reactiu Ponceau S i 5% àcid acètic glacial en aigua destil·lada)

-Procediment:

Primerament activarem la membrana de PVDF submergint-la durant 15 segons en metanol. A continuació, la rentarem amb aigua Milli-Q durant 2 minuts per treure l'excés de metanol. Finalment, la deixem amb tampó de transferència fins que comenci l'electrotransferència. Un cop hagi acabat l'electroforesi, muntem el sistema amb el gel i la membrana en l'aparell de transferència evitant que es formin bombolles que puguin

interferir en l'electrotransferència. El sistema ha d'estar completament submergit en tampó de transferència i col·locarem cubetes de gel per a evitar que la temperatura pugi en excés a causa del pas dels electrons. Finalment apliquem un amperatge contant de 180 mA durant 88 minuts (el temps pot variar en funció del pes molecular que desitgem transferir). Un cop ha finalitzat, tenyirem la membrana amb la solució Ponceau, d'aquesta manera tenyirem de manera reversible totes les proteïnes a la membrana i ens servirà per veure que la transferència s'ha donat de manera correcta i homogènia. Per eliminar-la només caldrà rentar la membrana amb aigua destil·lada.

3.3.2 Immunodetecció

Reactius i Materials:

- Solució TBS: Tris-Base 20mM, NaCl 150mM, pH=7.6 amb HCl
- Solució de rentat: TBS-Tween20 al 0,1%
- Solució de bloqueig: TBS-Tween20 al 0,1% amb llet en pols al 5% (p/v) o amb BSA (albúmina sèrica bovina) al 5% (p/v) dependent de l'anticòs que s'hagi d'utilitzar.
- Plàstic
- Segellador
- Agitador orbital

Procediment:

El primer pas serà bloquejar la membrana per recobrir els espais on no hi hagi proteïna transferida, d'aquesta manera evitarem unions inespecífiques de l'anticòs a la membrana. Haurem d'incubar la membrana amb la solució de bloqueig durant 1h a temperatura ambient.

Seguidament incubarem la membrana amb l'anticòs primari diluït en solució de bloqueig, que s'unirà al seu epítop específic. Aquesta incubació dependrà del tipus d'anticòs, normalment es realitza durant tota la nit a 4°C o 1h a temperatura ambient.

Un cop hem acabat, rentarem la membrana per treure l'excés d'anticòs primari. Farem tres rentats de 5 minuts amb la solució de rentat. Després incubarem amb l'anticòs secundari, que s'unirà a les cadenes constants d'una l'espècie (conill, rata, ratolí...) de manera específica. A més, aquest anticòs porta una peroxidasa de rave fusionada que ens permetrà la seva detecció posteriorment. La incubació amb l'anticòs secundari sol fer-se entre 1 i 2 hores a temperatura ambient.

Finalment, realitzarem el revelat de la membrana. Aquest procés consisteix en detectar l'activitat peroxidasa de l'anticòs secundari mitjançant el reactiu ECL (*Enhanced ChemoLuminiscent Method*, Biological Industries). Aquest reactiu conté aigua oxigenada i luminol. La reacció catalitzada per la peroxidasa, dona com a producte llum que es detecta per una càmera fotogràfica d'elevada sensibilitat (Fujifilm) que genera una imatge digital pel software LAS-3000.

Proteïna	Casa Comercial	Reactivitat	Dil·lució	Espècie	Pes Molecular
hCNT1 (N17)	Santa Cruz	Humà	1:2000	Goat	75 kDa
hCNT1	Generació pròpia	Humà	1:1000	Mouse	75 kDa
Prosaposina	Abcam	Humà, rata, ratolí	1:1000	Rabbit	75 kDa
HA	Roche	Humà, rata, ratolí	1:2000	Rat	tag
Nrdp1/RNF41	Santa Cruz	Humà	1:1000	Mouse	36 kDa
Actina	Sigma Aldrich	Humà	1:5000	Rabbit	42 kDa
Tubulina	Sigma Aldrich	Humà	1:5000	Mouse	50 kDa
Akt	Cell Signaling	Humà	1:1000	Rabbit	60 kDa
Fosfo Akt	Cell Signaling	Humà	1:1000	Rabbit	60 kDa
Ubiquitina	Santa Cruz	Humà	1:1000	Mouse	9 kDa
c-MYC	Santa Cruz	Humà	1:500	Mouse	50 kDa

Taula 10. Llistat d'anticossos primaris emprats en la present tesi doctoral

Casa Comercial	Reactivitat	Dil·lució
Bio-Rad	Mouse	1:3000
Bio-Rad	Rabbit	1:3000
Bio-Rad	Rat	1:5000
Dako	Goat	1:5000

Taula 11. Llistat d'anticossos secundaris emprats en la present tesi doctoral

3.4 Immunocitoquímica

Aquesta tècnica ens permet analitzar la localització subcel·lular de les proteïnes d'estudi en cèl·lules fixades. Normalment les detectem a través de la unió d'un anticòs primari específic contra la proteïna d'estudi, i la posterior unió d'un anticòs secundari amb un fluorocrom que al excitar-lo emetrà el senyal. Si la proteïna d'estudi està fusionada a una proteïna fluorescent (GFP, YFP...) no cal afegir cap anticòs per a la seva detecció. També es poden observar certes estructures cel·lulars conegudes com la membrana plasmàtica, els filaments d'actina, l'aparell de Golgi, el nucli, etc... amb marcadors específics.

Procediment:

- 1- Sembrar les cèl·lules en cobreobjectes de 10mm prèviament esterilitzats amb llum UV durant 10 min.
- 2- Un cop han crescut les cèl·lules, les rentarem amb PBS 1X dos cops per treure restes de medi i les fixarem amb PFA (Paraformaldehid) al 4% en PBS 1X. Les incubarem 10min amb la solució de fixació a temperatura ambient. Un cop finalitzat farem dos rentats amb PBS 1X i aquests cobreobjectes es poden guardar a 4°C durant uns dies.
- 3- A continuació permeabilitzarem la membrana per a que els anticossos puguin entrar dintre de la cèl·lula. Incubarem les cèl·lules amb una solució de saponina al 0,05% en PBS 1X durant 10 min. Al acabar, es fan dos rentats amb PBS 1X.
- 4- Seguidament farem el bloqueig del cobreobjectes. Aquest pas consisteix en incubar els cobreobjectes amb una solució de BSA al 1% en PBS 1X durant 20 min.
- 5- Després del bloqueig, tot seguit farem la incubació amb l'anticòs primari. Diluirem l'anticòs (1:50-1:300 depenent de l'anticòs) en solució d'incubació (BSA 1%, saponina 0,025% en PBS 1X) i l'incubarem 1h a temperatura ambient. Per tal de reduir la quantitat d'anticòs a utilitzar, fer la incubació de manera inversa sobre una gota i amb una cambra humida per a que no

s'assequi. Alerta de no perdre la orientació on estan enganxades les cèl·lules al cobreobjectes. Farem tres rentats amb PBS 1X per finalitzar-ho

- 6- L'anticòs secundari s'incubarà de manera similar al primari. La dilució sol ser 1:300 però depèn de la casa comercial. Cal mantenir aquesta incubació protegida de la llum ja que l'anticòs secundari té un fluorocrom i aquest va perdent activitat quan s'excita amb llum. Al acabar fem tres rentats amb PBS 1X.
- 7- Muntar el cobreobjectes sobre la solució de muntatge (*Prolong®Gold antifade reagent*), que segella la mostra i redueix la pèrdua de fluorescència dels fluorocroms. Deixar-ho assecant durant, al menys, una hora a temperatura ambient i després conservar a 4°C.

Entre les tincions específiques, a continuació es detallen algunes de les tincions realitzades al llarg d'aquest treball:

-Tinció nuclis: Després d'incubar amb el secundari i haver fet els rentats, incubar durant un minut el cobreobjectes amb una solució diluïda 1:1000 en PBS 1X del reactiu Hoescht.

-Tinció de membrana plasmàtica: Abans de fixar les cèl·lules, incubar-les amb el reactiu WGA (Sigma) durant 20 min a 4°C. Rentar amb PBS i prosseguir amb el protocol.

-Tinció de filaments d'actina: Es realitza una incubació amb fal·loïdina conjugada amb el fluorocrom 488 com si fos un anticòs. La fal·loïdina és una toxina extreta del bolet *Amanita phalloides*.

Anàlisi:

Per a poder obtenir imatges s'ha de disposar d'un microscopi confocal o de fluorescència. En aquest treball, totes les imatges s'han obtingut utilitzant el microscopi confocal Leica SPE present en el Servei de microscòpia de la facultat de Biologia.

Quant al treball amb les imatges digitals, s'ha realitzat amb el software lliure FIJI (Fiji Is Just ImageJ) que permet treballar amb els diferents canals on s'han obtingut les imatges i al llarg de l'eix vertical.

3.5 Biotinilització

Dintre de les tècniques d'anàlisi d'expressió aquest assaig ens permet observar les proteïnes presents a la cara extracel·lular de la membrana plasmàtica. El mètode es basa en incubar les cèl·lules vives amb el reactiu EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Scientific®). Aquest reactiu s'uneix als grups amino de les proteïnes. Si les cèl·lules estan intactes, només seran accessibles aquells grups amino que tinguin una regió extracel·lular. A continuació, incubarem amb streptavidina conjugada amb agarosa, de manera que podrem precipitar tot el que s'hagi unit al reactiu ja que la unió biotina-streptavidina és molt forta. Per assegurar la fiabilitat de la tècnica cal realitzar controls i comprovar que no s'han biotinilat proteïnes intracel·lulars o que ho han fet en poca quantitat.

4. Tècniques relacionades amb la manipulació de DNA.

4.1 Anàlisi de DNA en gels d'agarosa

L'anàlisi, separació i identificació de fragments de DNA es realitza mitjançant una electroforesi amb gels d'agarosa. L'agarosa, al fondre's, genera un polímer dintre del qual les cadenes de DNA poden migrar. Segons la grandària de la banda de DNA, utilitzarem un percentatge d'agarosa o altre. El tampó utilitzat en aquest per fer l'electroforesi ha estat el TBE (Tris 0,1M; Àcid bòric 0,09M i EDTA 1mM). Pel que fa a la detecció, s'ha realitzat una tinció del gel amb SYBR Safe® (Invitrogen) que s'unirà al DNA i serà observable mitjançant l'excitació amb llum UV. L'estimació del pes del fragment es fa per comparació amb un patró de fragments de diferents pesos moleculars que

s'utilitza com a control. Cal dir que no només el pes influeix en la velocitat de migració, també l'estructura del DNA. Corre més ràpid si està superenrotllat que relaxat, i corre més ràpid si és circular que lineal. Aquesta propietat és de gran utilitat en algunes aplicacions.

4.2 PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o reacció en cadena de la polimerasa és un mètode *in vitro* que permet l'amplificació enzimàtica del DNA (Mullis 1986). Consisteix en l'amplificació d'un fragment de DNA a partir de: DNA motllo, la DNA polimerasa termostable, una parella d'encebadors o *primers*, els dNTPs i el tampó necessari per a la polimerasa, que aportarà els cofactors i les condicions òptimes per dur a terme la reacció. La repetició d'aquesta reacció fa que per cada cicle es dupliqui el material de DNA. Aquest creixement exponencial fa que la tècnica sigui molt sensible, ja que encara que partim de molt poca quantitat de DNA al final de la reacció s'haurà amplificat. Aquesta sensibilitat fa que sigui una tècnica amb la qual s'ha de treballar amb cura per evitar contaminacions amb DNA extern, ja que es corre el risc de que també s'amplifiqui. Per treballar amb aquesta tècnica s'ha d'emprar material autoclavat i solucions filtrades.

La reacció universal de PCR segueix un esquema com el que es mostra en la Figura 61. La fase inicial es una desnaturalització per tal de separar ambdues cadenes del DNA motllo. A continuació, comencen els cicles d'amplificació que consten de

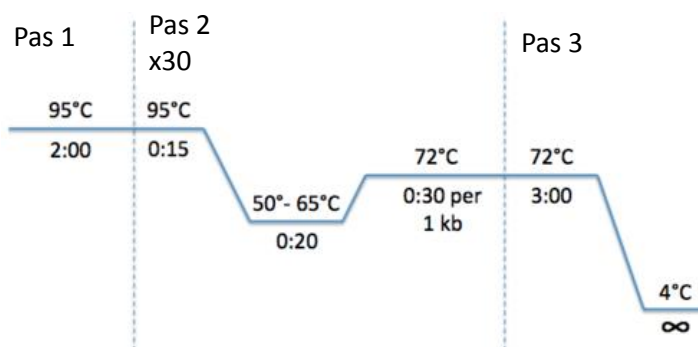


Figura 61. Programa de PCR estàndard

tres fases: desnaturalització, anellament i extensió. La fase de desnaturalització s'encarrega de separar la doble cadena de DNA per a que estigui accessible per als encebadors, això s'aconsegueix per l'elevada temperatura 94-98°C d'aquesta fase. Seguidament es realitza la fase d'anellament, on els encebadors s'uniran al DNA motllo.

Aquesta és la fase més crítica de la PCR ja que segons la temperatura escollida els encebadors s'uniran de manera específica, inespecífica o no s'uniran. La temperatura dependrà de la llargària i composició (%CGs) dels encebadors, existeixen fórmules i programes bioinformàtics que prediuen la temperatura d'anellament que presumiblement funcionarà, encara que sempre s'acaba testant la temperatura fins trobar la idònia. El rang de temperatura pot variar entre 40°C i 72°C, com més elevada sigui la temperatura, més restrictiva serà la fase, és a dir, s'eliminen unions inespecífiques amb la temperatura. No obstant, si la temperatura és molt alta correm el risc que no arribi ni a unir-se. Per aquesta raó hem d'anar variant la temperatura en funció dels resultats obtinguts, si no hi ha cap banda amplificada, el més adient seria reduir la temperatura; si hi ha bandes inespecífiques s'haurà d'incrementar la temperatura fins que s'aconsegueixi la banda del pes esperat. Després d'haver superat la fase d'anellament, comença la fase d'extensió, on s'unirà la DNA polimerasa al complex encebador-DNA motllo i sintetitzarà la nova cadena de DNA. Aquesta fase es realitza a 72°C, que és la temperatura òptima de treball de la polimerasa. És en aquesta fase on la polimerasa pot introduir alguna mutació dintre de la cadena segons la seva taxa d'error. La duració de l'extensió dependrà de la longitud a amplificar. Normalment s'utilitzen 30s per cada kilobase a amplificar. Aquestes tres fases es converteixen en un cicle, normalment una PCR consta entre 20 i 40 cicles. El nombre variarà en funció de l'eficiència d'amplificació. Un cop han acabat els cicles, es fa un últim pas d'extensió de 7 minuts. Així ens assegurem de que totes les amplificacions han estat acabades. Finalment, abaixem la temperatura a 10°C per recollir els tubs.

La PCR és una tècnica àmpliament emprada en els laboratoris de biologia molecular, entre les seves múltiples aplicacions, en aquest treball s'ha utilitzat per a:

4.2.1- Clonació/subclonació

El procés de clonació en biologia molecular consisteix en inserir un gen en un plasmidi d'expressió per tal de poder expressar-lo en el model d'estudi. Per tal d'inserir el gen, s'ha de digerir de manera enzimàtica el plasmidi per tal d'obrir-lo, a continuació, es digerirà el gen de manera que quedin els extrems complementaris per a que puguin

lligar-se posteriorment. Utilitzarem la PCR per a afegir les dianes de restricció que ens interessin als extrems del gen per poder lligar-lo al plasmidi. Per tal d'evitar relligacions del plasmidi i insercions inverses, és convenient afegir una diana diferent per a cada extrem. Per a afegir les dianes, dissenyarem els encebadors per a que s'anellin a la seqüència motllo i afegirem una cua que contindrà la diana de restricció desitjada. Per a dissenyar els encebadors haurem d'afegir entre 15 i 20 parells de bases complementaris al DNA motllo i la grandària de la cua dependrà de la diana de restricció. Caldrà estar alerta de no deixar la diana a l'extrem ja que l'enzim no ho digerirà correctament, per la qual cosa, s'han de posar entre 3 i 5 bases aleatòries a l'extrem (depenent de l'enzim).

4.2.2 Adició d'etiquetes d'expressió

Aquesta aplicació de la PCR és útil quan volem afegir un epítot d'expressió petit com HA, Myc, FLAG... El fonament per a realitzar-ho és el mateix que l'adició de les dianes de restricció amb els encebadors però afegint-hi la seqüència que codificarà per a l'etiqueta. D'aquesta manera podem afegir l'etiqueta a l'extrem que desitgem.

4.2.3 Generació de proteïnes quimèriques

Si volem estudiar la funció d'un domini específic d'una proteïna, una de les aproximacions utilitzades en biologia molecular és la generació de proteïnes quimèriques per a esbrinar la funció del domini d'estudi sobre altra proteïna. El fonament queda descrit en la Figura 62.

S'han d'amplificar els fragments que hagin de formar la proteïna quimera per separat i afegint regions d'homologia entre les dues sense perdre la pauta de lectura. A continuació es realitza un tipus de PCR anomenada *cross-over PCR* on afegirem aquests dos productes que faran la funció de motllo i encebador alhora. El primer pas on es formarà l'híbrid de DNA s'ha de fer a una temperatura d'anellament relativament baixa (uns 50°C) perquè les estructures són poc estables i s'ha d'afavorir la seva unió. Un cop

tenim algunes cadenes d'híbrid (uns 10 cicles), afegim els primers externs per a fer la amplificació pròpiament dita i amb les dianes de restricció externes (30 cicles).

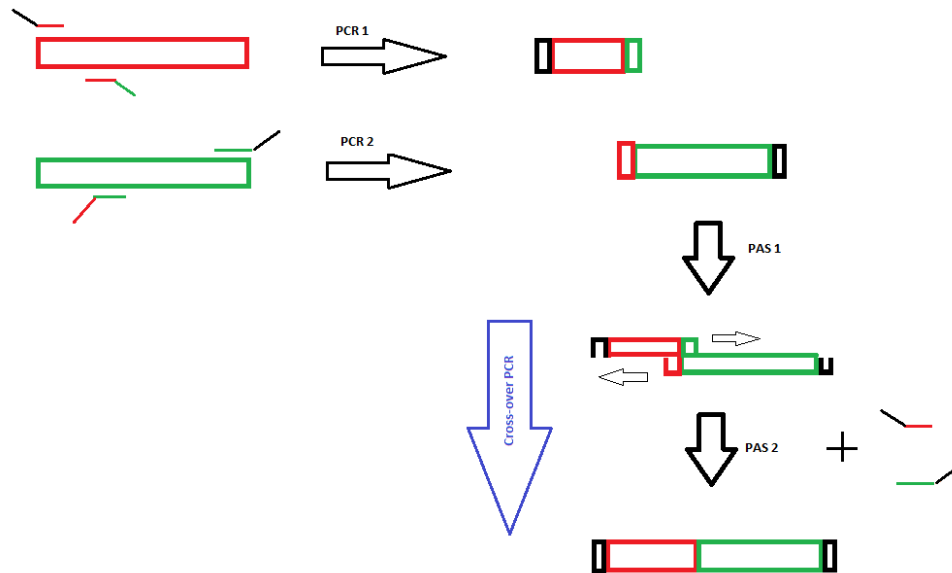


Figura 62. Esquema de generació proteïnes quimèriques pel mètode de *Cross-over PCR*.

4.2.4 Mutagènesi dirigida

Quan s'estudia si el canvi d'un residu dintre d'una proteïna afecta a la seva funció una de les tècniques emprades és generar aquesta mutació a partir de la seqüència de DNA: mutagènesi dirigida. Per a generar-la, haurem de dissenyar encebadors que continguin el canvi de base desitjat per generar el canvi d'aminoàcid, llavors en el segon cicle d'amplificació ja hi haurà la cadena mutada. Els encebadors hauran de tenir unes 15 bases d'homologia amb el DNA motllo a cada costat d'on s'ha introduït la mutació per facilitar la unió encebador-DNA. Per evitar generar encebadors complementaris, la regió d'homologia entre els dos serà lleugerament diferent (Figura 63). Un cop amplificat el fragment amb la mutació, digerirem el producte de PCR amb l'enzim DpnI, que només actua sobre DNA metilat, és a dir, el DNA del qual partim ja que ha estat

amplificat en bacteris. Així s'elimina el DNA que no conté la mutació. Finalment traurem el fragment amb la mutació per digestió enzimàtica i el tornarem a clonar en un plasmidi nou que no hagi passat per una amplificació per PCR.

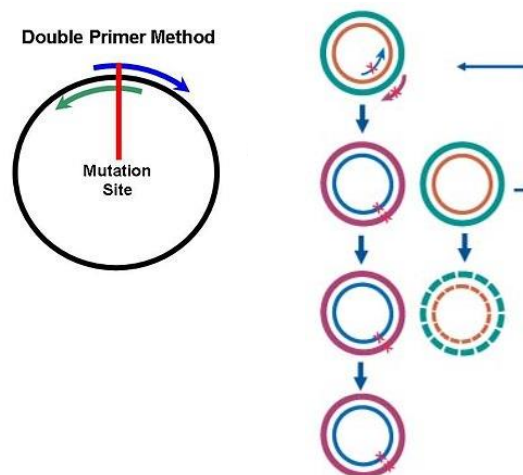


Figura 63. Esquema de generació de mutacions puntuals

4.2.5 Seqüenciació

Per a conèixer les seqüències dels constructes generats utilitzem el mètode de la seqüenciació de Sanger. Aquest mètode es basa en realitzar una PCR amb nucleòtids que aturin la reacció d'extensió: dideoxinucleòtids (impedeixen la unió del següent nucleòtid). Aquests estan marcats amb un fluorocrom que permet diferenciar-los. Llavors, per probabilitat, tindrem cadenes amplificades amb cada nucleòtid de la seqüència, aquestes cadenes són separades per electroforesi capil·lar i llegides per un seqüenciador. D'aquesta manera podem saber la seqüència del constructe.

-Reactius y material:

-ABIPRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit version 3.1 (Applied Biosystems).

-Termociclador (Applied Biosystems)

-Oligonucleòtids

4.3 Digestió enzimàtica de DNA

Aquesta tècnica és àmpliament emprada en biologia molecular. Es basa en tallar el DNA en llocs específics mitjançant enzims de restricció o nucleases. Les nucleases són enzims que es troben en els microorganismes, la funció de les quals és la destrucció de DNA no reconegut com a DNA propi, és a dir, és un mecanisme de defensa vers bacteriòfags i alguns virus. La ciència, altra vegada, utilitza les ferramentes de la natura per al seu interès. La gran varietat d'enzims de restricció fa que puguem tallar el DNA en un ampli espectre de regions i amb elevada especificitat.

El procediment experimental es basa en barrejar la quantitat de DNA a digerir, l'enzim o enzims, el tampó necessari per aportar les condicions òptimes per als enzims i completar amb aigua destil·lada. S'incubarà entre una i dues hores a 37°C (encara que hi ha enzims amb temperatura òptima de treball diferent). La digestió s'haurà dut a terme i s'haurà d'aïllar el DNA. Per cada microlitre d'enzim s'ha de posar un volum mínim de 10 µL ja que al estar dissolts en glicerol necessiten estar diluïts deu vegades per a funcionar correctament.

4.3.1 Digestió parcial

Pot ser que en una seqüència de DNA hi hagi dues dianes de restricció per a un enzim i que només ens interressi tallar una d'elles. Per a aconseguir-ho, el que es fa és realitzar la reacció de digestió i variar el temps de digestió o la concentració d'enzim. El més eficient és fer la digestió durant 15 minuts amb una bateria de concentracions d'enzim. A continuació, correrem el resultat en un gel d'agarosa i escollirem el fragment que tingui el tall que ens interressi.

4.4 Purificació de DNA

Si tenim una solució aquosa de DNA i volem aïllar-lo tenim diferents procediments que s'expliquen breument a continuació:

4.4.1 Purificació en gel d'agarosa

Utilitzarem aquesta tècnica quan tinguem una solució de DNA de diferents fragments i ens n'interessi només un. L'electroforesi en un gel d'agarosa ens permet separar les bandes pel seu pes molecular. Un cop corregut, retallarem la banda d'interès i la purificarem amb el kit Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), que ens permet purificar fragments entre 70pb i 10 kb.

4.4.2 Purificació per columna

Si tenim una solució amb només un tipus de DNA i volem treure restes de la solució com proteïnes, sals... o el volem concentrar més, el mètode més còmode és fer-ho utilitzant el kit *DNA clean and concentrator* (Zymo Research).

4.4.3 Purificació per precipitació

En el cas que tinguem un fragment de DNA molt gran que no pugui ser purificat per columna purificarem el DNA per precipitació amb reactius químics:

-Portar el volum de DNA a 100 µL amb aigua

-Afegir 100 µL d'una solució Fenol : Cloroform : Alcohol Isoamílic (25:24:1) i agitem amb el vòrtex durant 10s. Aquest pas es fa per eliminar les proteïnes.

-Centrifuguem i recollim la fase aquosa (superior) en un tub nou, on afegirem 1/10 volums d'acetat de sodi 3M a pH=5,2 per incrementar l'osmolaritat.

-Afegim 2 volums d'etanol absolut fred i es deixa en gel durant al menys 5 minuts.

-Centrifuguem, descartem el sobrenedant i el pellet blanc serà el DNA purificat.

-Rentem el pellet amb etanol al 70% per treure l'excés de sals i tornem a centrifugar i descartar sobrenedant.

-Deixem assecar el pellet a temperatura ambient i finalment el diluïm en la quantitat d'aigua que ens interessi.

4.5 Lligació de fragments de DNA

Per a lligar dos fragments de DNA que són complementaris o que tenen extrems roms emprarem l'enzim DNA lligasa. Aquest enzim catalitza la reacció de formació d'un pont di-èster entre un grup 5'-fosfat i un 3'-hidroxil. Es recomanable realitzar la reacció amb diferents relacions molars dels fragments a lligar. Normalment es lliga un vector amb el seu insert. Utilitzarem de referència 50 ng de vector (però dependrà del vector) i afegirem la quantitat d'insert seguint la relació:

$$ng\ insert = \frac{ng\ vector \cdot Kb\ insert}{Kb\ vector}$$

Les relacions més habituals són 1:0, 1:1 i 1:3. La condició 1:0 és essencial per saber el nombre de relligats del procés ja que no conté insert. Al afegir insert, des de la meua experiència, les relacions 1:3 o superiors funcionen millor perquè hi ha més insert. No obstant, cada lligació pot ser diferent. La mescla de reacció és:

- 50ng vector
- x µL d'insert
- 0,5 µL de T4DNA Lligasa (Promega)
- 1 µL de tampó 10X (Promega)
- Completar fins a 10 µL amb aigua

La reacció pot fer-se durant dues hores a 37°C o tota la nit a 4°C.

4.6 Tècniques de manipulació de bacteris

4.6.1 Obtenció de bacteris competents

Si es vol introduir DNA plasmídic en els bacteris per tal de que el transcrivin i l'amplifiquin se'ls ha de fer un tractament per tal de fer-los competents. El concepte competents vol dir que són capaços de captar el DNA amb el qual els transformarem. Per a aconseguir-ho es realitza un tractament amb diferents reactius que debiliten la membrana bacteriana:

-Es creix una colònia dels bacteris a tractar en 3mL de medi líquid LB [triptona 1% (p/v); extracte de llevats 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v) pH=7] durant tota la nit(37°C; 180 rpm d'agitació).

-Al dia següent s'inoculen 2mL d'aquest creixement en 100mL de LB i es posa a créixer (37°C; 180 rpm d'agitació) fins que la densitat òptica a 550nm sigui 0,4 (fase de creixement exponencial).

-Es centrifuga el cultiu líquid a 2500rpm durant 5min a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el pellet amb 30mL de tampó TfbI (30mM KOAc, 50mM MnCl₂, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂ a pH=5,8 i un 15% de glicerol).

-Es torna a centrifugar i es resuspèn aquest cop amb 4mL del tampó TfbII (10mM Mops a pH=7, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl i 15% glicerol). Es fan alíquotes de 100 µL i es guarden a -80°C.

4.6.2 Transformació per xoc tèrmic

Per tal d'introduir el DNA als bacteris competents es farà un xoc tèrmic per fer petits trencaments a la membrana i que el DNA pugui entrar. El protocol per fer-ho és el següent:

1-Descongela els bacteris competents en gel. Afegir el DNA a transformar i s'incuba 10 minuts en gel per permetre que el DNA s'uneixi a la membrana.

2-Fem un xoc tèrmic posant el tub a 42°C durant 60 segons.

3-Afegim 1mL de LB a temperatura ambient i el posem a créixer a 37°C amb agitació per a que els bacteris es reposen del xoc tèrmic i tinguin temps de sintetitzar la resistència a l'antibiòtic present en el plasmidi.

4-Centrifuguem el tub, i sembrem en una placa de LB-Agar el pellet resuspès en uns 100 µL de LB.

4.6.3 Obtenció de DNA plasmídic

Un cop tenim els bacteris transformats amb un plasmidi, si volem que s'amplifiqui, haurem de créixer una colònia en medi líquid amb l'antibiòtic per al qual el plasmidi codifica la resistència. Depenent de la quantitat de DNA que necessitem, creixerem un volum més gran o més petit. Picarem una colònia i la farem créixer en 3mL de medi líquid durant tota la nit. Al dia següent utilitzarem el kit Wizard Plus SV minipreps Purification Systems® (Promega) per a aïllar el DNA plasmídic del creixement bacterià.

4.7 Tècniques per a la generació d'adenovirus recombinants

Els adenovirus recombinants són una eina per expressar heteròlogament els gens d'interès. S'utilitza la maquinaria vírica per a que s'internalitzi el DNA que codifica per a la proteïna però, com que els adenovirus han estat modificats genèticament, no poden completar el seu cicle lític. Concretament, no tenen els gens E1 i E3 que estan implicats en l'encapsidació i en la evasió del sistema immunitari respectivament. Aquesta eina és de gran utilitat per a transduir gens a línies cel·lulars (on la transfecció transitòria no és eficient) i a models *in vivo*.

Per a generar aquests adenovirus s'ha emprat el sistema AdEasy™ XL Adenoviral Vector System (Agilent Technologies). El fonament és el següent:

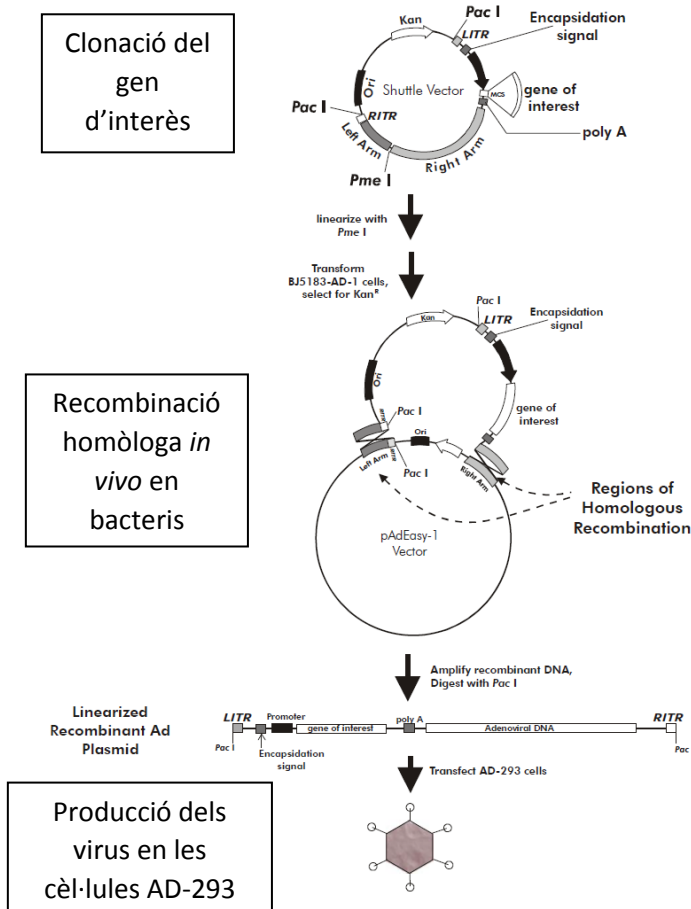


Figura 64. Esquema de generació de vectors adenovirals recombinants. Adaptat de: AdEasy™ XL Adenoviral Vector System. Instruction Manual

Primerament clonarem el gen d'interès en un vector llançadora (pShuttle). A continuació, transfectarem per electroporació aquesta construcció en forma lineal a una soca de bacteris que contenen el plasmidi adenoviral i, per recombinaió homòloga, es generarà el vector adenoviral recombinant. A continuació s'haurà d'amplificar en una línia cel·lular que aporti el gen E1 per tal de que el virus pugui completar el cicle lític.

Detalls experimentals:

Un cop tenim els gens d'interès clonats en el vector pShuttle, els digerirem amb l'enzim de restricció PmeI (que només té un lloc de restricció) per a linealitzar-los. S'ha d'anar alerta per si hi ha una diana d'aquest enzim en el gen ja que sinó no es podrà dur a terme el protocol.

Per transformar el plasmidi digerit als bacteris BJ5183-AD-1 ho farem mitjançant electroporació. L'electroporació es va dur a terme en l'electroporador Micropulser de BioRad amb el programa Ec2, que genera una descàrrega de 2,5 kV. Les quantitats emprades estan descrites en el protocol comercial del kit.

Un cop obtinguts els constructes adenovirals s'amplificaran amb la línia cel·lular AD293. Per a fer-ho, digerirem els constructes amb PacI per a linealitzar-los. A continuació, farem una transfecció transitòria amb el mètode calci/fosfat descrit anteriorment. S'ha de reduir la quantitat de sèrum a l'hora de realitzar la transfecció (del 10% al 2,5% (v/v)), d'aquesta manera el sèrum no interferirà en la infecció. Finalment es deixa fins que aparegui l'efecte citolític, llavors es recull el medi junt amb les restes cel·lulars i es fan tres cicles de congelació/descongelació amb nitrogen líquid. Després ho centrifuguem a 2500 rpm durant 5 minuts i el sobrenedant serà el nostre *stock* primari de virus.

A partir d'aquest *stock* primari amplifiquem el vector adenoviral per tenir suficient quantitat per a treballar. L'amplificació l'aconseguiem mitjançant successives infeccions a plaques de cèl·lules AD293 més grans. Si el nostre *stock* primari és d'uns 3 mL ja que prové del cultiu d'una placa de 6cm, utilitzarem 1 mL per a infectar una placa de 10cm que deixarem lisar totalment. Aquestes infeccions d'amplificació es fan durant una hora a l'incubador i reduint el volum d'infecció al mínim. Després, si l'*stock* secundari és d'uns 10mL, utilitzarem 2 o 3 mL per a infectar una placa de 15cm fins a lisi total. Quant a l'*stock* terciari, emprarem la meitat (uns 7 mL) per a infectar 10 plaques de 15cm. Aquesta lisi no ha de ser total ja que el procés de recollida del virus serà lleugerament diferent. Després de 48h, s'ha d'observar l'efecte citolític però les cèl·lules han d'estar enganxades a la placa. Per tant, el virus quedarà dintre de les cèl·lules, llavors les haurem de rascar i centrifugar. El pellet de cèl·lules de les 10 plaques de 15cm contindrà el virus amplificat. Per a aïllar-lo, resuspendrem el pellet amb PBS²⁺ (PBS 1x, 0.68mM CaCl₂·2H₂O, 0.5mM MgCl₂·6H₂O) amb glicerol al 10% i farem tres cicles de congelació/descongelació amb nitrogen líquid, finalment ho centrifugarem a 2500rpm durant 5 minuts i el sobrenedant serà el nostre extracte víric que haurem de quantificar o titular.

La quantificació o titulació es basa en determinar les unitats de transducció per mL (TU/mL) que hi ha en l'extracte. La determinació es basa en una tècnica d'immunocitoquímica utilitzant un anticòs contra l'exó adenoviral. En el nostre cas hem utilitzat l'hibridoma 2Hx-2. D'aquesta manera, podem saber el nombre de cèl·lules infectades que hi ha. El procediment experimental és el següent:

-Preparar un banc de dilucions seriades de l'stock viral (10^{-4} fins a 10^{-10}) en una placa de 96 pous, on el volum final del pou són 100 μ L i utilitzem medi DMEM (5% FBS inactivat) per fer les dilucions.

-Afegim 50 μ L d'una suspensió cel·lular de HEK293 (10^6 cèl·lules/mL).

-Incubar el virus amb les cèl·lules entre 24 i 48 hores depenent de la línia cel·lular emprada. Per a HEK293 amb 24-36h és suficient.

-Retirem el medi per aspiració i amb compte de no pertorbar la monocapa ja que les cèl·lules estan infectades i presenten una adherència molt baixa.

-Afegir 100 μ L de metanol al 100% (prèviament refredat a -20°C) i incubar-ho durant 10 min a -20°C per a fixar les cèl·lules.

-Rentar les cèl·lules dos cops amb PBS²⁺ (PBS 1x, 0.68mM CaCl₂·2H₂O, 0.5mM MgCl₂·6H₂O) amb BSA 1% .

-Afegir 50 μ L d'anticòs primari diluït en PBS²⁺ amb BSA 1%. En el nostre cas vam diluir l'anticòs 2Hx-2 amb una dilució 1/5. Incubar durant 1-2 hores a temperatura ambient.

-Rentar tres cops les cèl·lules amb PBS²⁺ amb BSA 1%.

-Incubar amb l'anticòs secundari diluït en PBS²⁺ amb BSA 1%. S'ha utilitzat l'anticòs anti-mouse Alexa-488 amb dilució 1/300. La incubació es fa entre 1-2 hores a temperatura ambient i protegit de la llum.

-Rentar tres cops i deixar les cèl·lules en PBS²⁺ amb BSA 1%.

-Quantificar el nombre de cèl·lules infectades per pou mitjançant un comptatge manual en un microscopi de fluorescència. Per a calcular el títol utilitzarem la relació següent:

$$\text{TU/mL} = (\text{mitjana} \times \text{Dil.} \times 1000 \mu\text{L}) / 100 \mu\text{L}$$

Mitjana: mitjana dels comptatges

Dil. : factor de dilució

1000 μL : per a referir-les a 1 mL

100 μL : volum de virus per pou

5. Tècniques relacionades amb la manipulació d'RNA

5.1 Extracció d'RNA total

Els àcids ribonucleics o RNAs són biomolècules molt importants en la transmissió de la informació genètica i que, cada cop més, es coneix que regulen una gran quantitat de processos bioquímics dintre de la cèl·lula. En aquest treball, l'anàlisi de l'RNA s'ha fet com a mesura de l'expressió dels diferents gens estudiats. Com que es tracta d'una biomolècula molt *fràgil* experimentalment s'ha de treballar amb certes pautes. En tot moment s'ha de treballar amb gel i l'emmagatzematge ha de ser, preferiblement, a -80°C. Tot el material que entri en contacte amb l'RNA ha de ser lliure de RNases que el puguin degradar.

En concret, per aïllar l'RNA a partir de cèl·lules en cultiu hem emprat el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega®). Amb aquest kit, s'aconsegueix purificar l'RNA per columnes i eliminar les restes de DNA i proteïnes.

5.2 Quantificació d'RNA per espectrofotometria

Els àcids nucleics presenten un màxim d'absorció a 260nm, mentre que les proteïnes el tenen a 280nm. La relació entre les absorbàncies $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ ha de trobar-se entre 1,8 – 2. Si la relació és inferior, la contaminació per presència excessiva de

proteïnes pot alterar la mostra. Per a llegir l'absorbància de la mostra i utilitzar una mínima quantitat de la mateixa, s'ha utilitzat l'espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000, ja que només necessitem 2 µL de mostra per a la quantificació.

5.3 Síntesi de cDNA: Retrotranscripció.

Un cop aïllat l'RNA, per poder analitzar-lo per RT-PCR l'haurem de transformar a cDNA (DNA complementari). La retrotranscripció es duta a terme per la transcriptasa inversa, un enzim víric que converteix l'RNA en DNA. Només necessita el motllo d'RNA, primers (*random primers*), dNTPs i un buffer per a tenir les condicions de pH i osmolaritat adequades.

La síntesi de cDNA es realitza partint d'1 µg de RNA. El primer pas es la desnaturalització de l'RNA a 65°C durant 5 minuts, seguidament es posa en gel i s'afegeix una mescla amb:

- Tampó per l'enzim
- DTT 10 mM
- dNTPs 500 µM
- Random primers (Promega) 10 µg/mL
- 0,75 U/µL RNAsin (inhibidor de RNAases).
- 7,2 U/µL de Transcriptasa inversa (M-MLVRT).

La reacció s'incuba 2h a 37°C i es finalitza amb una inactivació de l'enzim durant 10 min a 65°C.

5.4 Real-Time PCR (RT-PCR)

A diferència de la PCR convencional, aquesta variant permet detectar l'amplificació del producte a mesura que es va generant. Així ens permet determinar la fase de creixement exponencial que és el punt on l'anàlisi de les dades és òptim. El que

es mesura és el nombre de còpies que hi ha d'un gen específic ja sigui de manera absoluta o relativa.

Entre els diferents sistemes per a realitzar una RT-PCR, en aquest treball s'ha realitzat amb el sistema Taqman de Applied Biosystems, basat en sondes fluorogèniques. Les sondes de Taqman estan formades per un oligonucleòtid amb seqüència específica per a un gen. A més, conté un marcador fluorescent en la posició 3' (*reporter*) i una molècula que bloqueja la fluorescència del marcador en l'extrem 5' (*quencher*). Mentre la sonda està intacta, el *quencher* impedeix que el *reporter* emeti llum. No obstant, si la sonda s'uneix de manera específica a la regió de DNA que és complementària, la polimerasa (mitjançant la seva activitat exonucleasa 5'-3') alliberarà la molècula fluorescent i llavors es podrà detectar. Conforme van avançant els cicles, la senyal s'anirà amplificant. Als primers cicles pràcticament no s'observarà cap canvi, aquesta situació la definirem com a línia basal (*baseline*). Un increment de fluorescència per sobre d'aquesta línia indica la detecció de producte de PCR acumulat. Es fixa un límit de fluorescència per sobre de la línia basal: el *threshold*. D'aquesta manera es denomina Cicle límit (C_T) al cicle en que la fluorescència supera el límit fixat.

Per a fer la quantificació relativa compararem les C_T amb un altre gen endogen que no es vegi modificat per les condicions experimentals. Aquest gens s'anomenen *housekeeping genes*. El gen que s'ha utilitzat per a relativitzar els resultats en aquesta tesi ha estat hGAPDH. Aquesta quantificació no presenta cap unitat, ja que és una comparació relativa front a altre gen. Els càlculs necessaris per a fer aquesta quantificació relativa són els següents:

- 1-Calcular la C_T mitjana de cada mostra i del control.
- 2-Calcular ΔC_T , el resultat de la diferència: $C_T(\text{mostra}) - C_T(\text{control})$.
- 3-Calcular l'error estàndard (SE) de ΔC_T .
- 4-Calcular $\Delta\Delta C_T$, resultat de: $\Delta C_T(\text{mostra}) - \Delta C_T(\text{control})$. L'error estàndard (SE) serà el mateix.
- 5-Calcular l'expressió relativa de la mostra front al control, que es representa per $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

6. Tècniques de cerca i de validació d'interaccions proteiques

Dintre del camp de les interaccions proteiques hi ha diferents mètodes per rastrejar possibles proteïnes d'interacció (doble híbrid, proteòmica...). En aquest treball s'ha realitzat una variant del doble híbrid de llevat especialitzat per a proteïnes de membrana: l'anomenat MYTH (*Membrane Yeast Two-Hybrid*). Un cop s'obtenen les possibles proteïnes d'interacció per a la proteïna d'interès, es procedeix a validar la interacció amb mètodes bioquímics clàssics com la immunoprecipitació i la immunocol·localització. A continuació es descriuen totes tres tècniques:

6.1 MYTH (*Membrane Yeast Two-Hybrid*).

Aquest assaig de cribratge de proteïnes d'interacció s'engloba dintre de les tècniques que s'anomenen *high-throughput screening*. L'avantatge d'aquest tipus de tècniques radica en que es poden analitzar ingents quantitats de candidats en un període temps relativament curt. El mètode, desenvolupat en la Universitat de Toronto, està descrit com una tècnica molt potent per a facilitar la troballa de proteïnes d'interacció (Snider et al., 2010), encara que té alguna sèrie de desavantatges que comentarem més endavant.

Mecanisme:

El MYTH es basa en la capacitat de dividir la ubiquitina, una proteïna de 76 aminoàcids, en dos dominis estables: l'amino terminal (Nub) i el carboxi terminal (Cub). Aquests dos dominis, al re-associar-se *in vivo* formen una molècula de pseudoubiquitina que és reconeguda pels enzims desubiquitinadors, aquests enzims trenquen proteolíticament la pseudoubiquitina. Aquesta unió entre els dos dominis pot veure's pertorbada pel canvi d'aminoàcid en el domini amino terminal de la isoleucina 13 per una glicina: NubG. Llavors la unió entre els dos dominis no és tan forta i necessiten estar propers en l'espai per a que es formi la pseudoubiquitina.

El que és innovador d'aquesta tècnica és utilitzar aquest sistema com a sensor d'interacció de proteïnes. El que es fa es utilitzar la proteïna d'interès que es vol analitzar (*bait*) i se li fusiona l'extrem carboxi terminal de la ubiquïtina (Cub) i un factor de transcripció (TF), que conté el domini d'unió a DNA d'*Escherichia coli* LexA i el domini d'activació transcripcional VP16 del virus d'herpes simple. Les possibles proteïnes d'interacció (*preys*) es fusionen amb l'extrem amino terminal mutat (NubG) i amb una etiqueta d'expressió com HA per a verificar l'expressió. Per a rastrejos d'ampli espectre utilitzarem llibreries de cDNA on cada proteïna *prey* estarà clonada amb aquestes condicions. Un cop tenim ambdues proteïnes fusionades, les expressem en una soca especial de *S. cerevisiae* (NMY41). Si les proteïnes interaccionen, els dominis NubG i Cub s'uniran i formaran la pseudoubiquïtina, aquesta serà proteolitzada i el factor de transcripció quedarà alliberat i es podrà desplaçar a nucli per transcriure els gens que estiguin sota el seu control transcripcional. Aquesta soca ha estat genèticament modificada i conté tres gens de selecció sota el control d'aquest factor de transcripció. Els gens de selecció o gens reporters són gens que ens permeten diferenciar on s'ha donat la interacció bé per la restricció d'algun nutrient essencial (*HIS3* i *ADE2*) o pel color de la colònia (*lacZ*).

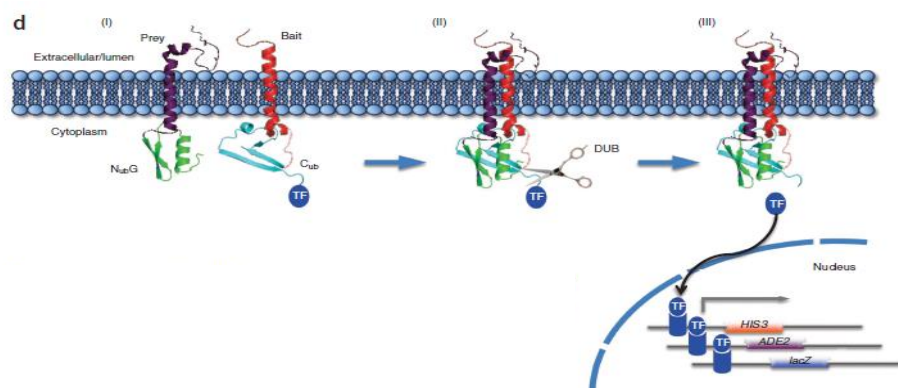


Figura 65. Esquema del mecanisme del sistema MYTH. Adaptat de Snider et al., 2010

La diferència d'aquest mètode amb el doble híbrid clàssic radica en que la interacció no ha de donar-se exclusivament a nucli, pot donar-se en qualsevol regió de la cèl·lula del llevat. Açò és de gran interès per a analitzar les interaccions de les proteïnes de membrana.

Disseny experimental:

Els primers passos a tenir en compte al iniciar aquesta tècnica és la clonació de la proteïna d'interès en un vector que contingui els dominis a fusionar. Cal tenir en compte que aquests dominis han de ser fusionats en un extrem de la proteïna i han d'estar necessàriament en la regió intracel·lular per a que els enzims desubiquitinadors puguin proteolitzar la pseudoubiquitina i el factor de transcripció s'alliberi. També s'ha de decidir el tipus de sistema si es realitza el MYTH tradicional (tMYTH) on s'utilitza l'expressió heteròloga per transfecció de la proteïna d'interès; o bé el MYTH integrat (iMYTH), el qual només és vàlid per a proteïnes endògenes de llevat. En aquest treball s'ha fet servir el tMYTH.

Primerament es van haver de clonar les proteïnes d'interès en els vectors pTLB1 i pBT3N. Només vam poder utilitzar aquests dos plasmidis perquè la fusió havia de ser en l'extrem amino terminal dels *bait*s, ja que només l'extrem N-terminal dels hCNTs és intracel·lular. La diferència entre tots dos és el promotor sota el qual es troba el *bait*, experimentalment es determinarà quin dels dos és més adequat. Un cop clonats, han de ser validats per veure l'expressió i localització dintre de la soca de llevat. Aquest pas s'ha de fer mitjançant la fusió de la proteïna YFP ja que els mètodes d'immunocitoquímica per a llevats no són prou resolutives.

A continuació, es realitza el control d'autoactivació del sistema o test NubG/I, en el qual es transforma la soca de llevat amb el *bait* i *preys* positius (Nubl) i negatius (NubG). Per a aquest test vam utilitzar proteïnes d'interacció prèviament descrites per a cada transportador i proteïnes de localització coneguda en llevat com Ost1 (membrana de reticle endoplasmàtic) i Fur4 (membrana plasmàtica), totes elles fusionades amb el domini Nubl i/o NubG. A més, com que aquesta tècnica té uns nivells elevats d'autoactivació, hem d'afegir un altre element de restricció: el 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole), que és un inhibidor de His3. Llavors necessitem que el sistema s'activi de manera important per tal de que els positius no siguin falsos positius. Científicament, la credibilitat d'aquesta tècnica resideix en la validesa d'aquest test. En la pràctica, les proteïnes que s'utilitzen com a controls (Ost1 i Fur4) sempre donen certa unió, i es creu que és per les elevades quantitats de proteïna que existeixen, ja que al ser una transfecció les quantitats no són fisiològiques ni controlables. Per solucionar aquesta

limitació, un cop fet el cribratge es realitza un altre assaig: el *bait dependency test*. Totes les proteïnes positives passen a ser analitzades amb un *bait* control. Aquest *bait* control està format pel domini transmembrana de la proteïna CD4 i els dominis Cub i TF. Si amb aquest control també s'activa el sistema, es considerarà la proteïna d'interacció o *prey* com un fals positiu.

Pel que fa al cribratge pròpiament dit, un cop tenim les condicions òptimes per realitzar-lo (concentració de 3-AT i plasmidi) es fa una transformació a gran escala de la llibreria de cDNA que conté les proteïnes fusionades amb la regió NubG. En el moment de fer l'assaig, es disposava de dues llibreries comercials que s'havien generat, una a partir de ronyó i altra a partir de sistema nerviós central de fetus. Una vegada transformades, es feien créixer els llevats en un medi sòlid restrictiu: el medi d'interacció -WLAH. Aquest medi no conté triptòfan (W), leucina (L), adenina (A) ni histidina (H). El gen de selecció per sintetitzar triptòfan es troba en el plasmidi del *bait*, el gen per sintetitzar leucina es troba en el plasmidi del *prey*, i els gens de síntesi d'adenina i leucina es troben sota el control del factor de transcripció que s'alliberarà quan es doni la proteòlisi de la pseudoubiquitina el que ens indicarà que hi ha hagut interacció entre les dues proteïnes. Com que és un medi molt restrictiu, les colònies triguen 5 dies a créixer. Després dels 5 dies, seleccionarem només aquelles colònies que tinguin la major grandària, el que indica que el sistema s'ha activat amb major intensitat. Llavors les fem créixer en el medi d'interacció amb X-Gal (que està sota el control del TF). Llavors només seleccionarem aquelles colònies que creixin molt i amb coloració blava. Això ens indicarà que han activat tots tres gens de selecció i, suposadament, la interacció ha estat més forta. Finalment aïllarem el plasmidi del *prey* d'aquestes colònies i realitzarem el *bait dependency test*, és a dir, compararem el creixement de la colònia del *prey* amb el *bait* d'estudi i amb el *bait* control. Només considerarem positives aquelles que només creixin amb el *bait* d'estudi. Llavors es seqüenciarà el plasmidi del *prey* per saber la proteïna que ha donat positiu per al sistema. Com que les llibreries han estat generades amb primers aleatoris (*random primers*) hi ha molts gens que s'han clonat amb la pauta de lectura trencada, llavors s'ha de fer un cribratge bioinformàtic per treure aquests positius *nonsense*.

Finalment, els positius vàlids obtinguts s'hauran de confirmar per altres tècniques per tal de validar la interacció i esbrinar la funció biològica de la mateixa.

6.2 Immunoprecipitació

La immunoprecipitació és un mètode que s'utilitza per a purificar o concentrar una proteïna específica o complex proteic a partir d'una mescla o extracte proteic. Aquesta tècnica és àmpliament utilitzada en estudis proteòmics ja que ens permet determinar informació important com la presència, abundància o regulacions post-transcripcionals de les proteïnes. En aquest estudi hem utilitzat la immunoprecipitació per validar bioquímicament les interaccions proteiques descrites amb altres mètodes. El fonament científic de la immunoprecipitació és el següent:

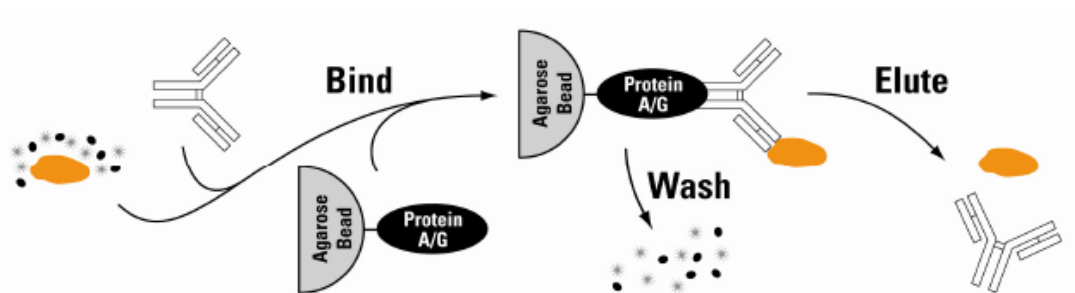


Figura 66. Esquema del mecanisme de la immunoprecipitació. Adaptat de “Thermo Scientific immunoprecipitation technical guide and protocols”.

El mètode es basa en tenir un anticòs que reconegui específicament la nostra proteïna en un extracte proteic. Per a poder purificar el complex anticòs-proteïna emprarem Proteïna A o G unida a boles d'agarosa, d'aquesta manera amb una centrifugació separarem el que està unit del que no. El fet d'utilitzar proteïna A o G dependrà de l'espècie en que està generat l'anticòs. Un cop tenim el complex separat, procedirem amb l'elució, que consisteix a desfer aquest complex i tot el que estigui unit

a ell. Per tal d'analitzar-ho, correrem la mostra en una SDS-PAGE i ho visualitzarem mitjançant un *western blot*.

El procediment experimental emprat en aquest treball ha sigut aquest:

1-En tubs *epENDORF* en gel, afegir 300 µg d'extracte proteic amb un volum final igual per a totes les condicions (aproximadament uns 100 µL).

2-Si es vol fer un pas previ de rentat o *pre-clearing* s'ha de realitzar en aquest moment. Aquest pas pot variar en funció del protocol, però el que s'ha fet en aquesta tesi ha sigut incubar l'extracte amb les boletes d'agarosa (uns 20 µL prèviament rentats amb tampó de lisi) durant 1-2 hores a 4°C. A continuació es centrifuga i el sobrenedant serà l'extracte *net* sobre el qual es farà la immunoprecipitació. El fonament de fer aquest pas és de desfer-nos de possibles unions inespecífiques a les boles d'agarosa.

3-Incubar l'extracte amb l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C.

4-Al dia següent, incubar amb les boletes d'agarosa unides a proteïna A o G. Pipetejarem 20 µL de boletes per condició, seguidament les rentarem tres cops amb el tampó de lisi emprat per fer l'extracte i, finalment, les resuspendrem amb 40 µL de tampó de lisi i ho afegirem a l'extracte.

5-Centrifugar l'extracte a 4°C, a 3000 rpm durant 4 min. D'aquesta manera precipitarem el que s'hagi unit al complex proteïna-anticòs-boles d'agarosa. El sobrenedant el guardem per analitzar l'eficiència de la immunoprecipitació.

6-El pellet amb els complexos el rentem amb tampó de lisi tres cops per desfer-nos d'unions inespecífiques.

7-Finalment resuspenem el pellet amb tampó de càrrega 2x de *western blot*, fem un xoc tèrmic per desfer la unió i l'analitzarem per SDS-PAGE i *western blot*. El xoc tèrmic serà de 5min a 95°C o de 30min a 37°C segons la proteïna a detectar i depenent de si les IgGs donen senyal inespecífica o no.

6.3 Immunocol·localització

La immunocol·localització és una aplicació de la immunocitoquímica (explicada anteriorment) per determinar si dues proteïnes es troben prop en l'espai dintre d'una cèl·lula. Per a analitzar-ho, el que es fa és un marcatge de les dues proteïnes a analitzar amb dos fluorocroms diferents. Si la senyal dels dos fluorocroms coincideix de manera significativa dintre de la cèl·lula és un signe de que ambdues proteïnes poden estar interaccionant.

7. Transport de nucleòsids

El mètode emprat per mesurar l'activitat dels transportadors de nucleòsids és la captació dels substrats radioactius en cèl·lules en cultiu. Consisteix en la incubació simultània de les cèl·lules en presència de substrat fred (no radioactiu) i el substrat marcat radioactivament (amb triti) a una concentració coneguda durant un temps determinat. La radioactivitat incorporada per les cèl·lules, mesura indicativa de la quantitat de substrat internalitzat, s'analitza aturant el transport i lisant el contingut cel·lular i posteriorment solubilitzant-ho amb líquid d'escintil·lació.

En aquest treball, els assajos de transport estan fets amb cèl·lules en cultiu en monocapa sembrades en plaques de 24 pous. Per a realitzar els assajos de transport, s'ha de comparar la incorporació amb diferents medis per veure mitjançant quin transportador està entrant el substrat. Per tal de dissenyar les condicions de l'experiment s'han de tenir en compte aquest factors:

-La concentració de substrat total (marcat i no marcat) sol ser de l'ordre de la K_M del transportadors.

-L'assaig s'ha de realitzar en condicions de velocitat inicial, és a dir, on la quantitat de substrat incorporat és proporcional al temps d'incubació, evitant així fenòmens de saturació.

-La quantitat de substrat ha de ser suficient per a permetre la seva detecció, fet que depèn de la seva activitat específica i de l'activitat del transportador.

7.1 Medis de Transport

-Medi Sodi: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2mM MgSO₄, 10mM Hepes, 100 µL/L de roig de fenol, pH=7.4 amb Tris Base.

-Medi Colina: 137 mM ChoCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2mM MgSO₄, 10mM Hepes, 400 µL/L de roig de fenol, pH=7.4 amb Tris Base

-Medi NMDG: 137 mM NMDG, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2mM MgSO₄, 10mM Hepes, 400 µL/L de roig de fenol, pH=7.4 amb HCl.

-Medi Stop: 137 mM NaCl, 10mM Hepes, 200 µL/L de roig de fenol, pH=7.4 amb Tris Base

-Medi de Transport: Es prepara 250 µL per pou. S'escollirà el medi adient dels anteriors descrits i es suplementarà amb el nucleòsid d'interès marcat i no marcat radioactivament de manera que la concentració final sigui 1 mCi/mL i 1 µM.

7.2 Assaig de transport en cèl·lules en monocapa

1-Aspirem el medi de cultiu del pou i rentem les cèl·lules dos cops amb el medi amb el qual es farà l'assaig.

2-S'incuba les cèl·lules amb el medi de transport durant el temps que s'hagi determinat.

3-Quan hagi transcorregut el temps d'incubació es fan dos rentats amb medi stop fred i s'aspiren les restes. Es poden congelar les cèl·lules en aquest punt per al seu posterior processament.

4-Afegim 100 µL de tampó de lisi a cada pou (0.5% Tritó X-100, 100mM NaOH) i s'incuba durant 30 minuts amb agitació orbital. Després, s'homogeneïtza bé el contingut de cada pou.

5-Dels 100 µL d'extracte lisat, recollim 10 µL per a mesurar la quantitat de proteïna pel mètode del BCA i poder relativitzar els resultats en funció de la quantitat de proteïna.

6-La resta de l'extracte el barrejarem amb 3mL de líquid d'escintil·lació (EcoscintTM H, National Diagnostics) per mesurar la radioactivitat ja que el triti no emet amb suficient energia per si mateix.

7-També hem de mesurar la radioactivitat del medi radioactiu emprat, que serà reflex de l'activitat específica d'aquell medi. Es mesura la radioactivitat que hi ha en 5 µL de medi, el qual també s'ha de barrejar amb 3mL de líquid d'escintil·lació.

7.3 Càlculs

Les mesures realitzades en presència de sodi són indicatives de la taxa total de transport ja que inclou el transport depenent de sodi, l'independent de sodi i la difusió. Les mesures fetes amb medi colina o NMDG proporcionen les taxes de transport independents de sodi. La component depenent de sodi la podem calcular amb la diferència de les dues anteriors.

Un cop tenim les mesures de radioactivitat en forma de dpm (desintegracions per minut) s'han de traduir a pmols de substrat per mil·ligram de proteïna per minut de transport:

$$\text{Activitat mostra} \left(\frac{\text{pmol}}{\text{mg prot} \cdot \text{min}} \right) = \frac{\text{dpm mostra} \cdot 1000}{\text{AE} \cdot \text{volum mostra} \cdot \left[\text{prot} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right) \right] \cdot \text{min}}$$

8. Estadística i representació de dades

En aquest treball s'han analitzat les dades principalment amb el software Microsoft Excel 2013. La representació gràfica i l'estudi estadístic s'han fet amb el software GraphPad Prism 4.0 i amb Microsoft Excel 2013.

Els resultats normalment estan representats com a la mitjana +/- error estàndard. Les diferències estadístiques s'han mesurat amb un test t-Student calculant el p valor. Dos grups es consideren estadísticament diferents quan p<0.05 (*), p<0.01 (**), p<0.001 (***)

BIBLIOGRAFIA

- Acuner Ozbabacan, S. E., Engin, H. B., Gursoy, A., & Keskin, O. (2011). Transient proteinprotein interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(9), 635–648. <http://doi.org/10.1093/protein/gzr025>
- Agarwal, E., Brattain, M. G., & Chowdhury, S. (2013). Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer. *Cellular Signalling*, 25(8), 1711–1719. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.03.025>
- Andreoli, S. (2008). Management of acute kidney injury in children: a guide for pediatricians. *Paedriatic Drugs*.
- Andreoli, S. (2009). Acute kidney injury in children. *Pediatrics Nephrology*.
- Araki, W., Minegishi, S., Motoki, K., Kume, H., Hohjoh, H., Araki, Y. M., & Tamaoka, A. (2014). Disease-Associated Mutations of TDP-43 Promote Turnover of the Protein Through the Proteasomal Pathway. *Molecular Neurobiology*, 1–10. <http://doi.org/10.1007/s12035-014-8644-6>
- Arimany-Nardi, C., Claudio-Montero, A., Viel-Oliva, A., Barril, X., Bidon-Chanal, A., & Pastor-Anglada, M. (2017). Identification and Characterisation of a Secondary Sodium- Binding Site and the main selectivity determinants in The Human Concentrative Nucleoside Transporter 3. *Molecular Pharmaceutics*.
- Arkin, M. R., Wells, J. A., & Francisco, S. S. (2004). SMALL-MOLECULE INHIBITORS OF PROTEIN – PROTEIN INTERACTIONS : PROGRESSING TOWARDS THE DREAM. *Nat Rev Drug Discov.*, 3(April). <http://doi.org/10.1038/nrd1343>
- Austin, W. R., Armijo, A. L., Campbell, D. O., Singh, A. S., Hsieh, T., Nathanson, D., ... Radu, C. G. (2012). Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(12), 2215–28. <http://doi.org/10.1084/jem.20121061>
- Axelrad, J. E., Roy, A., Lawlor, G., Korelitz, B., & Lichtiger, S. (2016). Thiopurines and inflammatory bowel disease: Current evidence and a historical perspective. *World Journal of Gastroenterology*, 22(46), 10103. <http://doi.org/10.3748/wjg.v22.i46.10103>
- Aymerich, I., Foufelle, F., Ferré, P., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2006). Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *Journal of Cell Science*, 1612–1621. <http://doi.org/10.1242/jcs.02865>
- Aymerich, I., Pastor-Anglada, M., & Casado, F. J. (2004). Long Term Endocrine Regulation of Nucleoside Transporters in Rat Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of General Physiology*, 124(November). <http://doi.org/10.1085/jgp.200409086>
- Badagnani, I., Chan, W., Castro, R., & Giacomini, K. M. (2005). Functional analysis of genetic variants in the human concentrative nucleoside transporter 3. *Pharmacogenomics J.*, 157–165. <http://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500303>
- Badoux, X. C., Keating, M. J., Wen, S., Lee, B.-N., Sivina, M., Reuben, J., ... Ferrajoli, A. (2011). Lenalidomide as initial therapy of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 118(13), 3489–98. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-03-339077>
- Baldwin, S. A., Beal, P. R., Yao, S. Y. M., King, A. E., Cass, C. E., & Young, J. D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 735–743. <http://doi.org/10.1007/s00424-003-1103-2>

- Banerjee, A., Chakraborty, S., Chakraborty, A., Chakrabarti, S., & Ray, K. (2016). Functional and Structural Analyses of CYP1B1 Variants Linked to Congenital and Adult-Onset Glaucoma to Investigate the Molecular Basis of These Diseases. *Plos One*, *11*(5), e0156252. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0156252>
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A. D., Chen, W. W., Ottina, K. A., Grabiner, B. C., ... Sabatini, D. M. (2013). A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science (New York, N.Y.)*, *340*(6136), 1100–6. <http://doi.org/10.1126/science.1232044>
- Barnes, K., Dobrzynski, H., Foppolo, S., Beal, P. R., Ismat, F., Scullion, E. R., ... Baldwin, S. A. (2006). Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circulation Research*, *99*(5), 510–519. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000238359.18495.42>
- Basiorka, A. A., McGraw, K. L., De Ceuninck, L., Griner, L. N., Zhang, L., Clark, J. A., ... List, A. F. (2016). Lenalidomide Stabilizes the Erythropoietin Receptor by Inhibiting the E3 Ubiquitin Ligase RNF41. *Cancer Research*, *76*(12), 3531–3540. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1756>
- Bhutia, Y. D., Hung, S. W., Patel, B., Lovin, D., & Govindarajan, R. (2011). CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, *71*(5), 1825–1835. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2736>
- Bicket, A., & Coe, I. R. (2016). N - linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function, *1*, 1–8. <http://doi.org/10.1042/BSR20160063>
- Bicket, A., Mehrabi, P., Naydenova, Z., Wong, V., Donaldson, L., Stagljjar, I., & Coe, I. R. (2016). Novel regulation of Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1) by receptor-stimulated Ca²⁺-dependent calmodulin binding. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *1*, ajpccell.00243.2015. <http://doi.org/10.1152/ajpccell.00243.2015>
- Bone, D. B. J., Robillard, K. R., Stolk, M., & Hammond, J. R. (2007). Differential regulation of mouse equilibrative nucleoside transporter 1 (mENT1) splice variants by protein kinase CK2. *Molecular Membrane Biology*, *24*(4), 294–303. <http://doi.org/10.1080/09687860701210617>
- Buel, G. R., Kim, S. G., & Blenis, J. (2013). mTORC1 signaling aids in CADalyzing pyrimidine biosynthesis. *Cell Metabolism*, *17*(5), 633–635. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.018>
- Campana, W. M., Darin, S. J., & O'Brien, J. S. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase mediate IGF-I- and prosaptide-induced survival in Schwann cells. *Journal of Neuroscience Research*, *57*(3), 332–341. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990801\)57:3<332::AID-JNR5>3.0.CO;2-0](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990801)57:3<332::AID-JNR5>3.0.CO;2-0)
- Cebotaru, L., Rapino, D., Cebotaru, V., & Guggino, W. B. (2014). Correcting the cystic fibrosis disease mutant, A455E CFTR. *PLoS ONE*, *9*(1), 3–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0085183>
- Chen, Z. J., & Sun, L. J. (2009). Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Molecular Cell*, *33*(3), 275–286. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.014>
- Chernoff, Y. O. (2001). Mutation processes at the protein level: Is Lamarck back? *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, *488*(1), 39–64. [http://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00060-0](http://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00060-0)

- Coe, I., Zhang, Y., McKenzie, T., & Naydenova, Z. (2002). PKC regulation of the human equilibrative nucleoside transporter, *517*, 201–205.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Zeebroeck, G. Van, Rubio-texeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *38*, 254–299. <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*.
- Dawany, N. B., Dampier, W. N., & Tozeren, A. (2011). Large-scale integration of microarray data reveals genes and pathways common to multiple cancer types, *2891*, 2881–2891. <http://doi.org/10.1002/ijc.25854>
- De Clercq, E., & Holý, A. (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *4*(November), 928–940. <http://doi.org/10.1038/nrd1877>
- del Santo, B., Valdes, R., Mata, J., Felipe, A., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (1998). Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology*, *28*(6), 1504–1511. <http://doi.org/10.1002/hep.510280609>
- Dianzani, I., De Sanctis, L., Smooker, P. M., Gough, T. J., Alliaudi, C., Brusco, A., ... Cotton, R. G. H. (1998). Dihydropteridine reductase deficiency: Physical structure the QDPR gene, identification two new mutations and genotype-phenotype correlations. *Human Mutation*, *12*(4), 267–273. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:4<267::AID-HUMU8>3.0.CO;2-C](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:4<267::AID-HUMU8>3.0.CO;2-C)
- Donowitz, M., & Li, X. (2007). Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiological Reviews*, *87*(3), 825–872. <http://doi.org/10.1152/physrev.00030.2006>
- Donowitz, M., Mohan, S., Zhu, C. X., Chen, T.-E., Lin, R., Cha, B., ... Li, X. (2009). NHE3 regulatory complexes. *The Journal of Experimental Biology*, *212*, 1638–1646. <http://doi.org/10.1242/jeb.028605>
- Donze, D. (2012). Extra-transcriptional functions of RNA Polymerase III complexes : TFIIC as a potential global chromatin bookmark. *Gene*, *493*(2), 169–175. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2011.09.018>
- Dos Santos-Rodrigues, A., Grañé-Boladeras, N., Bicket, A., & Coe, I. R. (2014). Nucleoside transporters in the purinome. *Neurochemistry International*, *73*(1), 229–237. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.03.014>
- Duflot, S., Calvo, M., Casado, F. J., Enrich, C., & Pastor-Anglada, M. (2002). Concentrative Nucleoside Transporter (rCNT1) Is Targeted to the Apical Membrane through the Hepatic Transcytotic Pathway, *85*, 77–85. <http://doi.org/10.1006/excr.2002.5641>
- Duflot, S., Ferna, S., Casado, V., Norman, R. I., Casado, F. J., Lluís, C., & Franco, R. (2004). ATP-Sensitive K^z Channels Regulate the Concentrative Adenosine Transporter CNT2 following Activation by A₁ Adenosine Receptors, *24*(7), 2710–2719. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2710>
- Einsele, H. (2014). Bortezomib. *Recent Results in Cancer Research*, *201*, 325–45.
- Elwi, A. N., Damaraju, V. L., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (2006). Renal nucleoside transporters: physiological and clinical implications. *Biochem Cell Biol*.

- Errasti-Murugarren, E., Cano-Soldado, P., Pastor-Anglada, M., & Casado, F. J. (2008). Functional characterization of a nucleoside-derived drug transporter variant (hCNT3C602R) showing altered sodium-binding capacity. *Molecular Pharmacology*, *73*(2), 379–86. <http://doi.org/10.1124/mol.107.041848>
- Errasti-Murugarren, E., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2010). Different N-Terminal Motifs Determine Plasma Membrane Targeting of the Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 in Polarized and Nonpolarized Cells □. *Molecular Pharmacology*, *78*(5), 795–803. <http://doi.org/10.1124/mol.110.065920>.
- Errasti-Murugarren, E., Fernández-Calotti, P., Veyhl-Wichmann, M., Diepold, M., Pinilla-Macua, I., Pérez-Torras, S., ... Pastor-Anglada, M. (2012). Role of the transporter regulator protein (RS1) in the modulation of concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia. *Molecular Pharmacology*, *82*(1), 59–67. <http://doi.org/10.1124/mol.111.076992>
- Errasti-Murugarren, E., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2009). A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(1), 172–82. <http://doi.org/10.1096/fj.08-113902>
- Errasti-Murugarren, E., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2010). The human concentrative nucleoside transporter-3 C602R variant shows impaired sorting to lipid rafts and altered specificity for nucleoside-derived drugs. *Molecular Pharmacology*, *78*(2), 157–65. <http://doi.org/10.1124/mol.110.063552>
- Errasti-Murugarren, E., & Pastor-Anglada, M. (2010). Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics J.*
- Farré, X., Guillén-Gómez, E., Sánchez, L., Hardisson, D., Plaza, Y., Lloberas, J., ... Pastor-Anglada, M. (2004). Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *International Journal of Cancer*, *112*(6), 959–966. <http://doi.org/10.1002/ijc.20524>
- Fernández-Calotti, P., Casulleras, O., Antolín, M., Guarner, F., & Pastor-Anglada, M. (2016). Galectin-4 interacts with the drug transporter human concentrative nucleoside transporter 3 to regulate its function, *30*(2), 544–554. <http://doi.org/10.1096/fj.15-272773>
- Fernández-Calotti, P., & Pastor-Anglada, M. (2010). All- trans -retinoic Acid Promotes Trafficking of Human Concentrative Nucleoside Transporter-3 (hCNT3) to the Plasma Membrane by a TGF- β 1-mediated Mechanism * □, *285*(18), 13589–13598. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.055673>
- Foot, N., Henshall, T., & Kumar, S. (2016). Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins. *Physiological Reviews*, *97*(1), 253–281. <http://doi.org/10.1152/physrev.00012.2016>
- Forsberg, H., & Ljungdahl, P. (2001). Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*.
- Galmarini, C. M., Mackey, J. R., & Dumontet, C. (2001). Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia*, *15*(6), 875–890. <http://doi.org/10.1038/sj.leu.2402114>

- Giacomini, K. M., & Huang, S. (2013). Transporters in Drug Development and Clinical Pharmacology, *94*(1), 3–9. <http://doi.org/10.1038/clpt.2013.86>
- Giehl, R. F. H., & von Wirén, N. (2015). Nitrate signalling: Functions of a nitrate transceptor. *Nature Plants*, *1*(March), 15021. <http://doi.org/10.1038/nplants.2015.21>
- Giovannetti, E., Tacca, M. Del, Mey, V., Funel, N., Nannizzi, S., Ricci, S., ... Danesi, R. (2006). Transcription Analysis of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 Predicts Survival in Pancreas Cancer Patients Treated with Gemcitabine, *(7)*, 3928–3935. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4203>
- Gloeckner-Hofmann, K., Guillén-gómez, E., Schmidtgen, C., Casado, F. J., Rüschoff, J., & Pastor-Anglada, M. (2006). Expression of the High-Affinity Transporter hCNT1 Correlates with Decreased Disease-Free Survival in Breast Cancer, 238–244. <http://doi.org/10.1159/000094541>
- Godoy, V., Banales, J., Medina, J., & Pastor-Anglada, M. (2014). Functional crosstalk between the adenosine transporter CNT3 and purinergic receptors in the biliary epithelia. *Journal of Hepatology*.
- Gorzkiwicz, M., & Klajnert-Maculewicz, B. (2017). Dendrimers as nanocarriers for nucleoside analogues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *114*, 43–56. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.030>
- Govindarajan, R., Endres, C. J., Whittington, D., LeCluyse, E., Pastor-Anglada, M., Tse, C.-M., & Unadkat, J. D. (2008). Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative nucleoside transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(3), G570-80. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00542.2007>
- Govindarajan, R., Leung, G. P. H., Zhou, M., Tse, C.-M., Wang, J., & Unadkat, J. D. (2009). Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *296*(4), G910–G922. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.90672.2008>
- Grañé-Boladeras, N., Spring, C. M., Hanna, W. J. B., Pastor-Anglada, M., & Coe, I. R. (2016). Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir. <http://doi.org/10.1007/s00018-016-2288-9>
- Gray, J. H., Mangravite, L. M., Owen, R. P., Urban, T. J., Chan, W., Carlson, E. J., ... Giacomini, K. M. (2004). Functional and Genetic Diversity in the Concentrative Nucleoside Transporter, CNT1, in Human Populations, *65*(3), 512–519.
- Guillén-Gómez, E., Calbet, M., Casado, J., Lecea, D., Soriano, E., Pastor-Anglada, M., & Burgaya, F. (2004). Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain : selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats, 883–893. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02545.x>
- Guillén-Gómez, E., Pinilla-Macua, I., Pérez-Torras, S., Choi, D., Arce, Y., Pastor-Anglada, M., & Díaz-Encarnación, M. (2011). New Role of the Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1) in Transition in Renal Tubular Cells. *Journal of Cell Physiology*, (May), 1521–1528. <http://doi.org/10.1002/jcp.22869>
- Guitart, X., Bonaventura, J., Rea, W., Orrú, M., Cellai, L., Dettori, I., ... Ferré, S. (2016). Neurobiology of Disease Equilibrative nucleoside transporter ENT1 as a biomarker of Huntington disease. *Neurobiology of Disease*, *96*, 47–53.

<http://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.013>

Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1750–1759. <http://doi.org/10.1021/jm030644s>

Hamilton, S. R., Yao, S. Y. M., Ingram, J. C., Hadden, D. A., Ritzel, M. W. L., Gallagher, M. P., ... Baldwin, S. A. (2001). Subcellular Distribution and Membrane Topology of the Mammalian Concentrative Na⁺-Nucleoside Cotransporter rCNT1 *, *276*(30), 27981–27988. <http://doi.org/10.1074/jbc.M100518200>

Hernández-Ramírez, L. C., Martucci, F., Morgan, R. M. L., Trivellin, G., Tilley, D., Ramos-Guajardo, N., ... Korbonits, M. (2016). Rapid proteasomal degradation of mutant proteins is the primary mechanism leading to tumorigenesis in patients with missense AIP mutations. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *101*(8), 3144–3154. <http://doi.org/10.1210/jc.2016-1307>

Holsbeeks, I., Lagatie, O., Nuland, A. Van, Velde, S. Van De, & Thevelein, J. M. (2004). The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device, *29*(10). <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.08.010>

Hong, F., Mohammad Rachidi, S., Lundgren, D., Han, D., Huang, X., Zhao, H., ... Li, Z. (2017). Mapping the Interactome of a Major Mammalian Endoplasmic Reticulum Heat Shock Protein 90. *Plos One*, *12*(1), e0169260. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0169260>

Hu, S., Delorme, N., Liu, Z., Liu, T., Velasco-Gonzalez, C., Garai, J., ... Koochekpour, S. (2010). Prosaposin down-modulation decreases metastatic prostate cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Molecular Cancer*, *9*, 30. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-9-30>

Huber-ruano, I., Pinilla-macua, I., Torres, G., & Casado, F. J. (2010). Link Between High-Affinity Adenosine Concentrative and Energy Metabolism in Intestinal and Liver Parenchymal, (May), 620–630. <http://doi.org/10.1002/jcp.22254>

Hundal, H. S., & Taylor, P. M. (2009). Amino acid transceptors : gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.91002.2008>.

Hyun, J., Chansu, K., Hyun, L., Cheong, S., & Koh, Y. (2016). SLC29A1 (ENT1) polymorphisms and outcome of complete remission in acute myeloid leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *78*(3), 533–540. <http://doi.org/10.1007/s00280-016-3103-x>

Ibáñez, I., Díez-Guerra, F. J., Giménez, C., & Zafra, F. (2016). Activity dependent internalization of the glutamate transporter GLT-1 mediated by ??-arrestin 1 and ubiquitination. *Neuropharmacology*, *107*, 376–386. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.042>

International, T., & Consortium, T. (2010). Membrane transporters in drug development, *9*(MARCh), 215–236. <http://doi.org/10.1038/nrd3028>

Janpipatkul, K., Suksen, K., Borwornpinyo, S., Jearawiriyapaisarn, N., Hongeng, S., Piyachaturawat, P., & Chairoungdua, A. (2014). Downregulation of LAT1 expression suppresses cholangiocarcinoma cell invasion and migration. *Cellular Signalling*, *26*(8), 1668–1679. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.04.002>

Jiang, Y., Meng, Q., & Qi, J. (2015). MiR-497 promotes metastasis of colorectal cancer cells through Nrdp1 inhibition, *1*, 7641–7647. <http://doi.org/10.1007/s13277-015-3489-9>

- Johnson, Z. L., Cheong, C.-G., & Lee, S.-Y. (2012). Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature*, *483*(7390), 489–93. <http://doi.org/10.1038/nature10882>
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, *267*(3), 727–48. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>
- Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F., & Dumontet, C. (2013). Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Publishing Group*, *12*(6), 447–464. <http://doi.org/10.1038/nrd4010>
- Joung, J. K., Ramm, E. I., & Pabo, C. O. (2000). A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(13), 7382–7387. <http://doi.org/10.1073/pnas.110149297>
- Jurecka, A. (2009). Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *32*(2), 247–263. <http://doi.org/10.1007/s10545-009-1094-z>
- Kang, S.-Y., Halvorsen, O. J., Gravdal, K., Bhattacharya, N., Lee, J. M., Liu, N. W., ... Watnick, R. S. (2009). Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1. *Pnas*, *106*(29), 12115–12120. <http://doi.org/10.1073/pnas.0903120106>
- Kanthala, S., Gauthier, T., & Satyanarayanajois, S. (2014). Structure-activity relationships of peptidomimetics that inhibit PPI of HER2-HER3. *Biopolymers*, *101*(6), 693–702. <http://doi.org/10.1002/bip.22441>
- Katsuyama, S., Sugino, K., Sasazawa, Y., Nakano, Y., & Aono, H. (2016). Identification of a novel compound that inhibits osteoclastogenesis by suppressing nucleoside transporters, *590*, 1152–1162. <http://doi.org/10.1002/1873-3468.12146>
- Keeton, A. B., Salter, E. A., & Piazza, G. A. (2017). The RAS-Effector Interaction as a Drug Target. *Cancer Research*, *221*–226. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0938>
- Keller, T., Egenberger, B., Gorboulev, V., Bernhard, F., Uzelac, Z., Gorbunov, D., ... Koepsell, H. (2011). The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(43), 37874–37886. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.289330>
- Kim, T., Bae, C., Yang, S., Park, J., & Cho, E. (2015). Nfic regulates tooth root patterning and growth, 188–194.
- Klein, K., Kullak-ublick, G. A., Wagner, M., Trauner, M., & Eloranta, J. J. (2009). Hepatocyte nuclear factor-4 and bile acids regulate human concentrative nucleoside transporter-1 gene expression. *Am J Physiol Liver Physiol*, *296*, 936–947. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.90678.2008>
- Koepsell, H. (2011). Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biological Chemistry*.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, *37*(Pt 5), 937–53. <http://doi.org/10.1042/BST0370937>
- Koonin, E. V. (2012). Does the central dogma still stand? *Biology Direct*, *7*(1), 1. <http://doi.org/10.1186/1745-6150-7-27>

- Kunze, M., & Berger, J. (2015). The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. *Frontiers in Physiology*, 6(SEP), 1–27. <http://doi.org/10.3389/fphys.2015.00259>
- Kunzelmann, K., & Mehta, A. (2013). CFTR: A hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca²⁺. *FEBS Journal*, 280(18), 4417–4429. <http://doi.org/10.1111/febs.12457>
- Lacoste, C., Nader, M. B., Santos, A. Dos, Moniaux, N., Lacoste, C., Herv, J., & Faivre, J. (2012). Iodide Transporter NIS Regulates Cancer Cell Motility and Invasiveness by Interacting with the Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor LARG, 5505–5515. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0516>
- Lam, M. H. Y., Snider, J., Rehal, M., Wong, V., Aboualizadeh, F., Drecun, L., ... Stagljar, I. (2015). A comprehensive membrane interactome mapping of sho1p reveals Fps1p as a novel key player in the regulation of the HOG pathway in *S. cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 427(11), 2088–2103. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.01.016>
- Lane, J., Martin, T., McGuigan, C., Mason, M., & Jiang, W. (2010). The differential expression of hCNT1 and hENT1 in breast cancer and the possible impact on breast cancer therapy. *J Exp Ther Oncol*.
- Laraia, L., Mckenzie, G., Spring, D. R., Venkitaraman, A. R., & Huggins, D. J. (2015). Review Overcoming Chemical , Biological , and Computational Challenges in the Development of Inhibitors Targeting Protein-Protein Interactions. *Chemistry & Biology*, 22(6), 689–703. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.04.019>
- Leach, M. D., & Brown, A. J. P. (2012). Posttranslational modifications of proteins in the pathobiology of medically relevant fungi. *Eukaryotic Cell*, 11(2), 98–108. <http://doi.org/10.1128/EC.05238-11>
- Lee, H., Lee, D., & Park, J. (2015). Nuclear factor I-C regulates E-cadherin via control of KLF4 in breast cancer. *BMC Cancer*, 1–11. <http://doi.org/10.1186/s12885-015-1118-z>
- Leysen, P., De Clercq, E., & Neyts, J. (2008). Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Research*, 78(1), 9–25. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.01.004>
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Duong, T., Fan, C., Huang, C., ... Jiang, X. (1998). Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 34970–34975. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34970>
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., & Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(8), 543–560. <http://doi.org/10.1038/nrd4626>
- Lu, H., Li, H., Mao, D., Zhu, Z., & Sun, H. (2014). Nrdp1 inhibits growth of colorectal cancer cells by nuclear retention of p27. *Tumor Biol*, 8639–8643. <http://doi.org/10.1007/s13277-014-2132-5>
- Mackay, J. P., Sunde, M., Lowry, J. A., Crossley, M., & Matthews, J. M. (2007). Protein interactions : is seeing believing ? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(12), 2006–2007. <http://doi.org/10.1042/BJ20041096>
- Mateus, C., & Avery, S. V. (2000). Destabilized green fluorescent protein for monitoring dynamic changes in yeast gene expression with flow cytometry. *Yeast (Chichester, England)*, 16(14), 1313–1323. [http://doi.org/10.1002/1097-0061\(200010\)16:14<1313::AID-YEA626>3.0.CO;2-O](http://doi.org/10.1002/1097-0061(200010)16:14<1313::AID-YEA626>3.0.CO;2-O)

- McDowell, G. S., & Philpott, A. (2013). Non-canonical ubiquitylation: Mechanisms and consequences. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(8), 1833–1842. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.026>
- Medina-Pulido, L., Justicia, C., Soriano, E., Burgaya, F., Planas, A. M., & Pastor-Anglada, M. (2013). Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells. *Biochemical Journal*, 445, 437–445. <http://doi.org/10.1042/BJ20130231>
- Milles, S., Mercadante, D., Aramburu, V., Blackledge, M., & Lemke, E. A. (2015). Plasticity of an Ultrafast Interaction between Nucleoporins and Nuclear Transport Receptors. *Cell*, 734–745. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.047>
- Mohelnikova-Duchonova, B., Brynychova, V., Hlavac, V., Kocik, M., Oliverius, M., Hlavsa, J., ... Soucek, P. (2013). The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72(3), 669–682. <http://doi.org/10.1007/s00280-013-2246-2>
- Molho-Pessach, V., Lerer, I., Abeliovich, D., Agha, Z., Libdeh, A. A., Broshtilova, V., ... Zlotogorski, A. (2008). The H Syndrome Is Caused by Mutations in the Nucleoside Transporter hENT3. *Am J Hum Genetics*, 529–534. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.09.013>.
- Molina-Arcas, M., Trigueros-Motos, L., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2008). Physiological and pharmacological roles of nucleoside transporter proteins. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6), 769–778. <http://doi.org/10.1080/15257770802145819>
- Mori, R., Ishikawa, T., Ichikawa, Y., Taniguchi, K., Matsuyama, R., Ueda, M., ... Shimada, H. (2007). Human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with the chemosensitivity of gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma and biliary tract carcinoma cells. *Oncol Rep*, 1201–1205.
- Motta, M., Tatti, M., Furlan, F., Celato, A., Di Fruscio, G., Polo, G., ... Salvioli, R. (2016). Clinical, biochemical and molecular characterization of prosaposin deficiency. *Clinical Genetics*, 90(3), 220–229. <http://doi.org/10.1111/cge.12753>
- Mujoo, K., Choi, B., Huang, Z., & Zhang, N. (2014). Regulation of ERBB3 / HER3 signaling in cancer. *Oncotarget*, 5(21).
- Mukhopadhyay, D., & Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5809), 201–5. <http://doi.org/10.1126/science.1127085>
- Myers, S., Goyal, R., Roy, J., Fairfull, L., Willson, J., & Ferrell, R. (2006). Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. *Pharmacogenetics and Genomics*.
- Nakagawa, H., Toyoda, Y., Wakabayashi-Nakao, K., Tamaki, H., Osumi, M., & Ishikawa, T. (2011). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of ABC transporters: A new aspect of genetic polymorphisms and clinical impacts. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(9), 3602–3619. <http://doi.org/10.1002/jps.22615>
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell*, 130(1), 165–178. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.021>

- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2015). *Principios de bioquímica Lehninger*. Retrieved from http://cataleg.ub.edu/record=b2130489~S1*cat
- Nevola, L., & Giralt, E. (2015). Modulating protein-protein interactions: the potential of peptides. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 51(16), 3302–15. <http://doi.org/10.1039/c4cc08565e>
- Nguyen, M. D., Ross, A. E., Ryals, M., Lee, S. T., & Venton, B. J. (2015). Clearance of rapid adenosine release is regulated by nucleoside transporters and metabolism. *Pharmacol Res Perspect*, 1–12. <http://doi.org/10.1002/prp2.189>
- Nivillac, N. M. I., Bacani, J., & Coe, I. R. (2011). The life cycle of human equilibrative nucleoside transporter 1: from ER export to degradation. *Experimental Cell Research*, 317(11), 1567–79. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.03.008>
- Obrist, F., Manic, G., Kroemer, G., Vitale, I., & Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: Proteasomal inhibitors for anticancer therapy. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(2), e974463. <http://doi.org/10.4161/23723556.2014.974463>
- Owen, R., Gray, J. H., Taylor, T., Carlson, E. J., & Giacomini, K. M. (2005). Genetic analysis and functional characterization of polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter, CNT2. *Pharmacogenetics and Genomics*.
- Parker, W. B. (2009). Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chemical Reviews*, 109(7), 2880–2893. <http://doi.org/10.1021/cr900028p>
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Errasti-Murugarren, E., & Casado, F. J. (2008). SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica*, 38(7–8), 972–994. <http://doi.org/10.1080/00498250802069096>
- Pastor-Anglada, M., Errasti-Murugarren, E., Aymerich, I., & Casado, F. J. (2007). Concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia: from absorption to cell signaling. *Journal of Physiology and Biochemistry*.
- Pastor-Anglada, M., & Pérez-Torras, S. (2015). Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Frontiers in Pharmacology*, 6(FEB), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fphar.2015.00013>
- Pedley, A. M., & Benkovic, S. J. (2016). A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends in Biochemical Sciences*, xx(2), 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.009>
- Pérez-Torras, S., García-Manteiga, J., Casado, F. J., Mercade, E., Pastor-Anglada, M., & Mazo, A. (2008). Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer. *Biochemical Pharmacology*, 76, 322–329. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.011>
- Pérez-Torras, S., Vidal-Pla, A., Cano-Soldado, P., Huber-Ruano, I., Mazo, A., & Pastor-Anglada, M. (2013). Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner. *Cell Death & Disease*, 4, e648. <http://doi.org/10.1038/cddis.2013.173>
- Petschnigg, J., Kotlyar, M., Blair, L., Jurisica, I., Stagljar, I., & Ketteler, R. (2016). Systematic Identification of Oncogenic EGFR Interaction Partners. *Journal of Molecular Biology*, 429(2), 280–294. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.12.006>

- Pimkin, M., & Markham, G. D. (2008). The CBS subdomain of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase regulates purine nucleotide turnover. *Molecular Microbiology*, *68*(2), 342–359. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06153.x>
- Pinilla-Macua, I., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2012). Structural determinants for rCNT2 sorting to the plasma membrane of polarized and non-polarized cells. *The Biochemical Journal*, *442*(3), 517–25. <http://doi.org/10.1042/BJ20110605>
- Puebla, C., Farias, M., Vecchiola, A., Gonzalez, M., Aguayo, C., Krause, B., ... Sobrevia, L. (2008). High D-Glucose Reduces SLC29A1 Promoter Activity and Adenosine Transport Involving Specific Protein 1 in Human Umbilical Vein Endothelium. *Journal of Cellular Physiology*, (October), 645–656. <http://doi.org/10.1002/21347>
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R. R., Mohan, A., Heyen, J. W., ... Iakoucheva, L. M. (2011). Identification, Analysis and Prediction of Protein Ubiquitination Sites. *Proteins*, *78*(2), 365–380. <http://doi.org/10.1002/prot.22555>.Identification
- Regis, S., Filocamo, M., Corsolini, F., Caroli, F., Keulemans, J. L., van Diggelen, O. P., & Gatti, R. (1999). An Asn > Lys substitution in saposin B involving a conserved amino acidic residue and leading to the loss of the single N-glycosylation site in a patient with metachromatic leukodystrophy and normal arylsulphatase A activity. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *7*(2), 125–30. <http://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200266>
- Reyes, G., Nivillac, N. M. I., Karim, M. Z., Desouza, L., Siu, K. W. M., & Coe, I. R. (2011). The Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT1) can be phosphorylated at multiple sites by PKC and PKA. *Molecular Membrane Biology*, *28*(September), 412–426. <http://doi.org/10.3109/09687688.2011.604861>
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., Mcallister, F., ... Leach, S. D. (2012). EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell*, *148*(1–2), 349–361. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025>
- Rigault, C., Borgne, F. Le, & Demarquoy, J. (2006). Genomic structure , alternative maturation and tissue expression of the human BBOX1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1761*, 1469–1481. <http://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.09.014>
- Ritzel, M. W. L., Ng, A. M. L., Yao, S. Y. M., Graham, K., Loewen, S. K., Smith, K. M., ... Young, J. D. (2001). Molecular Identification and Characterization of Novel Human and Mouse Concentrative Na⁺-Nucleoside Cotransporter Proteins (hCNT3 and mCNT3) Broadly Selective for Purine and Pyrimidine Nucleosides (System cib)*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(4), 2914–2927. <http://doi.org/10.1074/jbc.M007746200>
- Rivas, J. D. Las, & Fontanillo, C. (2010). Protein – Protein Interactions Essentials : Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. *PLoS Comput Biol*, *6*(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000807>
- Rodríguez-Mulero, S., Errasti-Murugarren, E., Ballarín, J., Felipe, A., Doucet, A., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2005). Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: Effect of diabetes. *Kidney International*, *68*(2), 665–672. <http://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00444.x>
- Sahasranaman, S., Howard, D., & Roy, S. (2008). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *64*(8), 753–767. <http://doi.org/10.1007/s00228-008-0478-6>

- Schwöppe, C., Winkler, H. H., & Neuhaus, H. E. (2003). Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in Escherichia coli. *Eur J Biochem*, 1457, 1450–1457. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03507.x>
- Scott, D. E., Bayly, A. R., Abell, C., & Skidmore, J. (2016). Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein-protein interaction challenge. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 15(8), 533–550. <http://doi.org/10.1038/nrd.2016.29>
- Shen, M., Schmitt, S., Buac, D., & Ping Dou, Q. (2013). Targeting the ubiquitin - proteasome system for cancer therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets*, 17(9), 1091–1108. <http://doi.org/10.1517/14728222.2013.815728>.Targeting
- Shi, H., Gong, H., Cao, K., Zou, S., Zhu, B., Bao, H., ... Yu, R. (2015). Nrdp1-mediated ErbB3 degradation inhibits glioma cell migration and invasion by reducing cytoplasmic localization of p27Kip1. *Journal of Neuro-Oncology*, 124(3), 357–364. <http://doi.org/10.1007/s11060-015-1851-9>
- Shu, Y., Leabman, M. K., Feng, B., Mangravite, L. M., Huang, C. C., Stryke, D., ... Giacomini, K. M. (2003). Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5902–5907. <http://doi.org/10.1073/pnas.0730858100>
- Slugoski, M. D., Ng, A. M. L., Yao, S. Y. M., Lin, C. C., Mulinta, R., Cass, C. E., ... Young, J. D. (2009). Substituted Cysteine Accessibility Method Analysis of Human Concentrative Nucleoside Transporter hCNT3 Reveals a Novel Discontinuous Region of Functional Importance within the CNT Family Motif (G / A) X K X 3 NEFVA (Y / M / F) * □. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 17281–17292. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.009704>
- Smith, K. M., Ng, A. M. L., Yao, S. Y. M., Labeledz, K. a, Knaus, E. E., Wiebe, L. I., ... Young, J. D. (2004). Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in Xenopus oocytes. *The Journal of Physiology*, 558(Pt 3), 807–23. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.068189>
- Smith, K. M., Slugoski, M. D., Cass, C. E., Baldwin, S. a, Karpinski, E., & Young, J. D. (2007). Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3. *Molecular Membrane Biology*, 24(1), 53–64. <http://doi.org/10.1080/09687860600942534>
- Snider, J., Hanif, A., Lee, M. E., Jin, K., Yu, A. R., Graham, C., ... Stagljar, I. (2013). Mapping the functional yeast ABC transporter interactome. *Nature Chemical Biology*, 9(9), 565–72. <http://doi.org/10.1038/nchembio.1293>
- Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V., & Stagljar, I. (2010). Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nature Protocols*, 5(7), 1281–93. <http://doi.org/10.1038/nprot.2010.83>
- Snider, J., Kotlyar, M., Saraon, P., Yao, Z., Jurisica, I., & Stagljar, I. (2015). Fundamentals of protein interaction network mapping. *Molecular Systems Biology*, 11(12), 848–848. <http://doi.org/10.1525/msb.20156351>
- Soler, C., Valde, R., Casado, F. J., Modolell, M., Nicholson, B., Macleod, C., ... Celada, A. (2001). Lipopolysaccharide-induced Apoptosis of Macrophages Determines the Up-regulation of Concentrative Nucleoside Transporters Cnt1 and Cnt2 through Tumor Necrosis Factor- α -dependent and -independent Mechanisms *. *J Biol Chem*, 276(32), 30043–30049. <http://doi.org/10.1074/jbc.M101807200>

- Soler, C., Valde, R., Pastor-Anglada, M., Celada, A., & Felipe, A. (2001). Macrophages require different nucleoside transport. *FASEB J*, *15*(11), 1979–1988.
- Song, A., Zhang, Y., Han, L., Yegutkin, G. G., Liu, H., Sun, K., ... Jalkanen, S. (2017). Erythrocytes retain hypoxic adenosine response for faster acclimatization upon re-ascent. *Nature Communications*, *8*, 14108. <http://doi.org/10.1038/ncomms14108>
- Sonnhammer, E., von Heijne, A., & Krogh, G. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*.
- Spiegel, R., Cliffe, S. T., Buckley, M. F., Crow, Y. J., Urquhart, J., Horovitz, Y., ... Shalev, S. A. (2010). European Journal of Medical Genetics Expanding the clinical spectrum of SLC29A3 gene defects. *European Journal of Medical Genetics*, *53*(5), 309–313. <http://doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.06.012>
- Spratlin, J., Sangha, R., Glubrecht, D., Dabbagh, L., Young, J. D., Dumontet, C., ... Mackey, J. R. (2004). The Absence of Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Is Associated with Reduced Survival in Patients With Gemcitabine- Treated Pancreas Adenocarcinoma. *Clin Cancer Research*, *10*(780), 6956–6961.
- Srihari, S., Yong, C. H., Patil, A., & Wong, L. (2015). Methods for protein complex prediction and their contributions towards understanding the organisation, function and dynamics of complexes. *FEBS Letters*, *589*(19), 2590–2602. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.026>
- Stagljarić, I. (2016). Biochemical and Biophysical Research Communications The power of OMICs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 9–11. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.095>
- Sun, J., & Zheng, N. (2015). Molecular Mechanism Underlying the Plant NRT1.1 Dual-Affinity Nitrate Transporter. *Frontiers in Physiology*, *6*(December), 1–6. <http://doi.org/10.3389/fphys.2015.00386>
- Sun, L., Wang, S., Hu, C., & Zhang, X. (2010). Regulation of cell proliferation and apoptosis through fibrocystin-prosaposin interaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *502*(2), 130–136. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.08.007>
- Sundaram, M., Yao, S. Y. M., Ingram, J. C., Berry, Z. A., Abidi, F., Cass, C. E., ... Young, J. D. (2001). Topology of a Human Equilibrative , Nitrobenzylthioinosine (NBMPR) -sensitive Nucleoside Transporter (hENT1) Implicated in the Cellular Uptake of Adenosine and Anti-cancer Drugs *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(48), 45270–45275. <http://doi.org/10.1074/jbc.M107169200>
- Tanaka, T., Doe, J. M., Horstmann, S. A., Ahmad, S., Ahmad, A., Min, S., ... Vandivier, R. W. (2014). Neuroendocrine Signaling Via the Serotonin Transporter Regulates Clearance of Apoptotic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(15), 10466–10475. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.482299>
- Thevelein, J. M., & Voordeckers, K. (2009). Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Molecular Biology and Evolution*, *26*(11), 2407–2414. <http://doi.org/10.1093/molbev/msp168>
- Tuite, M. F., & Serio, T. R. (2010). The prion hypothesis: from biological anomaly to basic regulatory mechanism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(12), 823–833. <http://doi.org/10.1038/nrm3007>

- Valdés, R., Elferich, J., Shinde, U., & Landfear, S. M. (2014). Identification of the intracellular gate for a member of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 8799–8809. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.546960>
- Valdés, R., Fernández-Veledo, S., Aymerich, I., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2006). TGF- β transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(21), 2527–2537. <http://doi.org/10.1007/s00018-006-6240-2>
- Vallon, V., Mühlbauer, B., & Osswald, H. (2006). Adenosine and kidney function. *Physiological Reviews*, 86(3), 901–940. <http://doi.org/10.1152/physrev.00031.2005>
- Vaz, F. M., van Gool, S., Ofman, R., Ijlst, L., & Wanders, R. J. (1998). Carnitine biosynthesis: identification of the cDNA encoding human gamma-butyrobetaine hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(2), 506–10. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9343>
- Vellai, T., & Vida, G. (1999). The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 266(1428), 1571–7. <http://doi.org/10.1098/rspb.1999.0817>
- Vickers, M. F., Young, J. D., Baldwin, S. A., Ellison, M., & Cass, C. E. (2001). Functional production of mammalian concentrative nucleoside transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Membrane Biology*.
- Visser, F., Vickers, M. F., Ng, A. M. L., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (2002). Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyridamole. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 395–401. <http://doi.org/10.1074/jbc.M105324200>
- Voet, D., & Voet, J. G. (2004). *Biochemistry*.
- Vogl, D. T., Stadtmauer, E. A., Tan, K. S., Heitjan, D. F., Davis, L. E., Pontiggia, L., ... Amaravadi, R. K. (2014). Combined autophagy and proteasome inhibition a phase 1 trial of hydroxychloroquine and bortezomib in patients with relapsed/refractory myeloma. *Autophagy*, 10(8), 1380–1390. <http://doi.org/10.4161/auto.29264>
- Volonté, C., & D'Ambrosi, N. (2009). Membrane compartments and purinergic signalling: The purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *FEBS Journal*, 276(2), 318–329. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06793.x>
- Voorde, J. Vande, Balzarini, J., & Liekens, S. (2014). Mycoplasmas and cancer: Focus on nucleoside metabolism. *EXCLI Journal*, 13, 300–322.
- Wang, C., Chen, T., Zhang, J., Yang, M., Li, N., Xu, X., & Cao, X. (2009). The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 “preferentially” promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nature Immunology*, 10(7), 744–752. <http://doi.org/10.1038/ni.1742>
- Wang, D., Peng, Z., Ren, G., & Wang, G. (2015). The different roles of selective autophagic protein degradation in mammalian cells. *Oncotarget*, 6(35), 37098–116. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.5776>
- Weber, G., Donohue, J. P., Glover, J. L., Natsumeda, Y., & Prajda, N. (1984). Enzymic Capacities of Purine de Novo and Salvage Pathways for Nucleotide Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues. *Cancer Research*, 44(6), 2475–2479.

- Weidberg, H., Shpilka, T., Shvets, E., Abada, A., Shimron, F., & Elazar, Z. (2011). LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. *Developmental Cell*, 20(4), 444–454. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.02.006>
- Wolpin, B. M., Rubinson, D. a, Wang, X., Chan, J. a, Cleary, J. M., Enzinger, P. C., ... Kimmelman, A. C. (2014). Phase II and Pharmacodynamic Study of Autophagy Inhibition Using Hydroxychloroquine in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *The Oncologist*, 0–3. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0086>
- Xu, C., Deng, F., Mao, Z., Zhang, J., Wang, H., Wang, J., ... Ma, D. (2012). The interaction of the second Kunitz-type domain (KD2) of TFPI-2 with a novel interaction partner, prosaposin, mediates the inhibition of the invasion and migration of human fibrosarcoma cells. *Biochemical Journal*, 441(2), 665–674. <http://doi.org/10.1042/BJ20110533>
- Yamaoka, T., Kondo, M., Honda, S., Iwahana, H., Moritani, M., li, S., ... Itakura, M. (1997). Amidophosphoribosyltransferase limits the rate of cell growth-linked de novo purine biosynthesis in the presence of constant capacity of salvage purine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17719–17725. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17719>
- Yamaoka, T., Yano, M., Kondo, M., Sasaki, H., Hino, S., Katashima, R., ... Itakura, M. (2001). Feedback Inhibition of Amidophosphoribosyltransferase Regulates the Rate of Cell Growth via Purine Nucleotide, DNA, and Protein Syntheses. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21285–21291. <http://doi.org/10.1074/jbc.M011103200>
- Yao, S. Y. M., Ng, A. M. L., Vickers, M. F., Sundaram, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (2002a). Functional and Molecular Characterization of Nucleobase Transport by Recombinant Human and Rat Equilibrative Nucleoside Transporters 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 24938–24948. <http://doi.org/10.1074/jbc.M200966200>
- Yao, S. Y. M., Ng, A. M. L., Vickers, M. F., Sundaram, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (2002b). Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2: Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 24938–24948. <http://doi.org/10.1074/jbc.M200966200>
- Yao, Z., Darowski, K., St-Denis, N., Wong, V., Offensperger, F., Villedieu, A., ... Shalloway, D. (2017). A Global Analysis of the Receptor Tyrosine Kinase-Protein Phosphatase Interactome. *Molecular Cell*, 0(0), e1873-711. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.004>
- Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 529–547. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.007>
- Yuan, L., & Morales, C. R. (2011). Prosaposin sorting is mediated by oligomerization. *Experimental Cell Research*, 317(17), 2456–2467. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.07.017>
- Zafar, M., Naydenova, Z., & Coe, I. R. (2016). Extended exposure to substrate regulates the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*.

- Zhang, J., Wang, Z., Jiang, Y., Niu, Z., Fu, L., Luo, Z., ... He, W. (2015). Nuclear Factor I-C promotes proliferation and differentiation of apical papilla-derived human stem cells in vitro. *Experimental Cell Research*, 332(2), 259–266. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.01.020>
- Zhao, H., French, J. B., Fang, Y., & Benkovic, S. J. (2013). The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. *Chem Commun (Camb)*. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations
- Zheng, L., Zhang, W., Zhou, Y., Li, F., Wei, H., & Peng, J. (2016). Recent Advances in Understanding Amino Acid Sensing Mechanisms that Regulate mTORC1. *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 1–15. <http://doi.org/10.3390/ijms17101636>
- Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., ... Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527(7579), 525–530. <http://doi.org/10.1038/nature16064>
- Zhou, M., Xia, L., Engel, K., & Wang, J. (2007). Molecular determinants of substrate selectivity of a novel organic cation transporter (PMAT) in the SLC29 family. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 3188–3195. <http://doi.org/10.1074/jbc.M609421200>
- Zwanziger, D., Schmidt, M., Fischer, J., Kleinau, G., Braun, D., Schweizer, U., ... Fuehrer, D. (2016). The long N-terminus of the human monocarboxylate transporter 8 is a target of ubiquitin-dependent proteasomal degradation which regulates protein expression and oligomerization capacity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 434, 278–287. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.017>