



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Nuevas implicaciones de los transportadores concentrativos de nucleósidos asociadas a la biología tumoral

Sandra Moro Villa

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

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

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



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

**Nuevas implicaciones de los transportadores  
concentrativos de nucleósidos asociadas a la  
biología tumoral**

**Sandra Moro Villa**

**2018**



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

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR

FACULTAT DE BIOLOGIA

# **Nuevas implicaciones de los transportadores concentrativos de nucleósidos asociadas a la biología tumoral**

Memòria presentada per:

**Sandra Moro Villa**

L'interessat,

Vist i plau dels directors,

**Dr. MARÇAL PASTOR ANGLADA**

Catedràtic de Bioquímica i Biologia  
Molecular

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

**Dra. SANDRA PÉREZ TORRAS**

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



*A mis padres,*

*A David.*



# Índice

INTRODUCCIÓN .....	1
1 Nucleósidos: Papel fisiológico y homeostasis .....	3
2 Transportadores de nucleósidos .....	4
2.1 Transportadores de nucleósidos concentrativos ( <i>SLC28</i> ).....	5
2.2 Transportadores de nucleósidos equilibrativos ( <i>SLC29</i> ) .....	7
2.3 Distribución tisular y expresión de los transportadores de nucleósidos .....	10
2.4 Regulación de los transportadores de nucleósidos .....	12
2.5 Papel farmacológico de los transportadores de nucleósidos.....	14
3 Papel de los transportadores de nucleósidos como transceptores.....	14
3.1 hCNT1 como transceptor .....	17
3.2 hCNT2 como posible transceptor .....	17
4 Metabolismo energético y reprogramación metabólica.....	19
OBJETIVOS .....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
1 Estudio del papel de hCNT2 como regulador del metabolismo energético .....	31
1.1 Identificación de modelos celulares para el estudio de hCNT2 .....	32
1.1.1 Cultivo primario de hepatocitos humanos.....	33
1.1.2 Línea celular THLE-2 .....	37
1.1.3 Líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma humano (BCLC).....	39
1.2 Estudio de la regulación de la proteína hCNT2.....	40
1.2.1 Regulación de hCNT2 por hipoxia .....	40
1.2.2 Regulación de hCNT2 por sustratos glucolíticos .....	44



1.3	Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 en el metabolismo energético de la célula tumoral.....	49
1.3.1	Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 en los niveles de lactato y ATP... ..	49
1.3.2	Efecto de los inhibidores 3PO, Cerulenina y Oxamato.....	55
1.3.3	Análisis mediante <i>microarray</i> de los efectos de la sobreexpresión de hCNT2 .....	57
2	Estudio de hCNT1 en su papel como transceptor .....	62
2.1	Determinación de la función del dominio N-terminal de hCNT1 en el papel de transceptor .....	63
2.2	Validación y estudio funcional de las interacciones de hCNT1 con proteínas previamente identificadas.....	69
2.2.1	Interacción hCNT1-RACK1 .....	70
2.2.2	Interacción hCNT1-RNF41 .....	80
2.3	Efecto del silenciamiento de mCNT1 en un modelo <i>in vivo</i> .....	86
	DISCUSIÓN GENERAL .....	89
	CONCLUSIONES.....	97
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
1	Cultivos celulares.....	103
1.1	Mantenimiento de cultivos celulares .....	103
1.1.1	Tripsinización y replaqueo.....	104
1.1.2	Congelación y descongelación.....	104
1.2	Líneas celulares utilizadas.....	105
1.2.1	Línea celular HEK293 .....	105
1.2.2	Línea celular HEK293T .....	106
1.2.3	Líneas celulares BCLCs .....	106
1.2.4	Línea celular NP-9.....	106

1.2.5	Línea celular THLE-2 .....	107
1.2.6	Hepatocitos humanos.....	107
1.3	Ensayos de viabilidad celular .....	107
2	Técnicas de modificación de la expresión de proteínas.....	108
2.1	Transfección con fosfato cálcico .....	108
2.2	Transfección con Lipofectamina .....	109
2.3	Transfección con TransIT-siQUEST.....	110
2.4	Transducción con adenovirus .....	110
3	Técnicas de análisis de la expresión de proteínas.....	111
3.1	Extracción de proteínas a partir de cultivos celulares.....	111
3.1.1	Valoración de la concentración proteica.....	112
3.2	Electroforesis en SDS-PAGE .....	112
3.3	Western Blot .....	114
3.4	Inmunoprecipitación/Co-Inmunoprecipitación .....	116
4	Ensayos de migración .....	117
5	Transporte de nucleósidos .....	118
5.1	Medios de transporte .....	118
5.2	Transporte de nucleósidos en células en monocapa .....	119
5.3	Cálculos .....	119
5.4	Método del ácido bicinconínico (BCA).....	120
6	Técnicas relacionadas con el metabolismo celular .....	121
6.1	Determinación de los niveles extracelulares de lactato.....	121
6.2	Determinación de los niveles intracelulares de ATP .....	121
7	Técnicas relacionadas con la manipulación de RNA .....	122
7.1	Extracción de RNA total .....	122

7.2	Cuantificación de RNA por espectrofotometría .....	122
7.3	Síntesis de cDNA: retrotranscripción .....	123
7.4	Real-Time PCR .....	123
7.5	DNA <i>microarray</i> .....	125
7.6	RNA <i>sequencing</i> .....	125
8	Técnicas relacionadas con la manipulación de virus adenoasociados.....	126
8.1	Generación de los virus.....	126
8.2	Purificación de los <i>stocks</i> virales.....	127
8.3	Cuantificación de los <i>stocks</i> virales.....	128
9	Técnicas utilizadas en los estudios <i>in vivo</i> .....	128
9.1	Animales de experimentación y condiciones del estabulario .....	128
9.2	Inyección de virus adenoasociados .....	129
9.3	Obtención de plasma y de órganos para posterior análisis.....	129
	BIBLIOGRAFÍA .....	131

# **INTRODUCCIÓN**



## 1 Nucleósidos: Papel fisiológico y homeostasis

Los nucleósidos y nucleótidos son moléculas esenciales para la supervivencia celular y están implicadas en una gran variedad de procesos metabólicos. Estas moléculas son precursoras de los ácidos nucleicos pero participan también en el metabolismo energético, dado que se encuentran en forma de coenzimas, como activadores metabólicos en procesos anabólicos y como moléculas que proporcionan energía en reacciones químicas (Lane & Fan 2015; Aymerich et al. 2005). También se ha descrito su papel como antioxidantes, disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) además de tener un papel en proteger las células contra la radiación (Rose & Coe 2008). Estas moléculas están implicadas en muchos procesos metabólicos por lo que la alteración en sus niveles se asocia a una gran variedad de enfermedades. Entre ellas, enfermedades renales, cáncer, inmunodeficiencia y a una serie de patologías mitocondriales (Aird & Zhang 2015).

La homeostasis de los nucleósidos está altamente regulada y es un proceso finamente coordinado, dado que sus niveles intracelulares son cruciales para mantener la integridad genómica (Pai & Kearsey 2017). En concreto, la correcta síntesis y reparación del daño del DNA y RNA dependen de dichos niveles. Niveles bajos resultan en un aumento de la mutagénesis y de la toxicidad genética mientras que un aumento descontrolado disminuye la fidelidad de la replicación del DNA con el consiguiente aumento de las mutaciones, asociado al desarrollo de células cancerígenas. Muchos tipos de tumores presentan este cambio metabólico en las concentraciones de nucleósidos, que conllevan a una mayor proliferación celular y al descontrol del ciclo celular (Zhang et al., 2013; Kohnken et al., 2015). Es por ello que el metabolismo de nucleósidos es una diana terapéutica y sus niveles en las células tumorales son un parámetro que debe tenerse en cuenta. Por ejemplo, los niveles de ATP intracelulares reflejan el estado energético de los tumores (Zhang et al. 2013). La regulación de los niveles de nucleósidos también viene condicionada por factores de transcripción como son MYC y Rb/E2F. Estas proteínas regulan la síntesis *de novo* de nucleótidos y mutaciones con ganancia de función pueden dar lugar a un incremento en la síntesis de nucleósidos con el consiguiente aumento de la proliferación, hecho estrechamente

relacionado con la aparición de fenotipos tumorales (Lane & Fan 2015). Por último, los transportadores de nucleósidos tienen un papel fundamental en el mantenimiento de dicha homeostasis, permitiendo tanto la entrada como la salida de estas moléculas (Young et al. 2013).

## 2 Transportadores de nucleósidos

Los transportadores de membrana juegan un papel muy importante en la regulación del paso de moléculas hidrofílicas a través de la membrana plasmática. Estas proteínas son esenciales en mantener la homeostasis celular dado que permiten la internalización de diferentes iones y nutrientes esenciales así como la salida de moléculas señalizadoras (Rose & Coe 2008). Se engloban en dos súper familias: *ATP binding cassette transporters* (ABC) y *Solute Carriers* (SLC) (Tóth et al., 2014). Cerca de 400 genes pertenecientes a la súper familia SLC han sido anotadas hasta la fecha en el genoma humano (Hediger et al. 2013). Entre ellos, la familia génica *SLC28* y *SLC29* que codifican para los transportadores de nucleósidos (Dos Santos-Rodrigues et al. 2014).

La familia génica *SLC28* codifica para los transportadores de tipo concentrativos (*Human Concentrative Nucleoside Transporter* o hCNT) y tiene tres miembros (hCNT1, hCNT2 y hCNT3). Estos transportadores tienen una elevada afinidad por los sustratos pero una selectividad más restringida (Pastor-Anglada et al. 2008). La familia génica *SLC29* en cambio, codifica para los transportadores de tipo equilibrativo (*Human Equilibrative Nucleoside Transporter* o hENT) y se han descrito cuatro miembros (hENT1, hENT2, hENT3 y hENT4). Se caracterizan por una baja afinidad pero una amplia selectividad por los sustratos (Molina-Arcas et al. 2009; Young et al. 2013).

Existen dos rutas metabólicas que permiten la biosíntesis de nucleósidos y nucleótidos: la síntesis *de novo* y la ruta de recuperación. La primera conlleva un gran gasto energético y es específica de determinados tipos celulares como los hepatocitos, cuyo aporte global además, es esencial en el mantenimiento de la homeostasis en diferentes tipos celulares (Aymerich et al. 2005). La segunda vía de obtención, que se caracteriza por un menor gasto energético, es la ruta de recuperación y depende de la presencia de los transportadores de nucleósidos. Esta vía está presente tanto en tipos

celulares que pueden realizar la síntesis *de novo* como en aquellos que carecen de ella. Entre estos últimos encontramos las células del cerebro, médula ósea, células del sistema inmune o los enterocitos (King et al. 2006).

Como se verá en esta memoria, el metabolismo de nucleósidos y su transporte se encuentran altamente regulados y sus alteraciones pueden conllevar no solo cambios en el fenotipo celular sino también modificaciones en la asequibilidad de fármacos y en otras funciones que pueden no estar relacionadas con el mero transporte de nucleósidos.

## 2.1 Transportadores de nucleósidos concentrativos (*SLC28*)

Los transportadores concentrativos median el transporte unidireccional de los nucleósidos de manera sodio dependiente y por lo tanto asociado a un gasto energético (Gray et al., 2004). Los transportadores concentrativos presentan una mayor selectividad y afinidad por los sustratos que los equilibrativos, con valores de *K<sub>m</sub>* aparentes en el rango  $\mu\text{M}$  bajo (10-100  $\mu\text{M}$ ). Aunque los hCNTs tengan más afinidad por los nucleósidos que los hENTs, las concentraciones circulantes de nucleósidos son más bajas que sus *K<sub>m</sub>* por lo que no estarán saturados en condiciones normales (Pastor-Anglada et al. 2008). Los tres miembros de la familia difieren en la selectividad hacia los sustratos y en la estequiometría  $\text{Na}^+$ : Nucleósido.

hCNT1 (*SLC28A1*), hCNT2 (*SLC28A2*) como hCNT3 (*SLC28A3*) internalizan uridina pero son selectivos para los demás nucleósidos. hCNT1 transporta pirimidinas, hCNT2 purinas y hCNT3 que presenta una amplia selectividad, transporta tanto purinas como pirimidinas. El transportador hCNT1 presenta una característica especial dado que es capaz de unir adenosina pero no la transporta (Pastor-Anglada et al. 2008). Respecto a la estequiometría del transporte  $\text{Na}^+$ : Nucleósido, hCNT1 y hCNT2 presentan una estequiometría 1:1, mientras que hCNT3 2:1 (Tabla 1) (Pastor-Anglada et al., 2008; Molina-Arcas et al., 2009). Inicialmente la expresión de los hCNTs se delimitó exclusivamente a epitelios polarizados, en concreto a la membrana apical, pero actualmente se piensa que su distribución puede ser más amplia, aunque no ubicua (Pastor-Anglada & Pérez-Torras 2015).



Transportador	Gen	Sustrato ( <i>K<sub>m</sub></i> )	Proporción Na:Nucleósido
<b>hCNT1</b>	<i>SLC28A1</i>	Uridina (38 $\mu$ M) Timidina (27 $\mu$ M) Citidina (3.1 $\mu$ M)	1:1
<b>hCNT2</b>	<i>SLC28A2</i>	Inosina (13.7 $\mu$ M) Adenosina (8 $\mu$ M) Uridina (116 $\mu$ M) Guanosina (8.5 $\mu$ M)	1:1
<b>hCNT3</b>	<i>SLC28A3</i>	Uridina (5.3 $\mu$ M) Timidina (10.6 $\mu$ M) Citidina (3.5 $\mu$ M) Inosina (4.3 $\mu$ M) Adenosina (2.4 $\mu$ M) Guanosina (8.5 $\mu$ M)	2:1

Tabla 1. Sustratos internalizados por los hCNTs y sus propiedades cinéticas. Adaptado de Pastor-Anglada et al. 2018.

La isoforma hCNT1 consta de 648 aminoácidos (71 kDa), hCNT2 de 659 aminoácidos (72 kDa) y hCNT3 de 691 aminoácidos (77 kDa). La homología de hCNT3 con hCNT1 y hCNT2 es de un 48% y 47% respectivamente mientras que entre hCNT1 y hCNT2 es de un 72% (Pastor-Anglada et al. 2008).

La topología de estos transportadores se basó inicialmente en un modelo de trece dominios transmembrana con el dominio N-terminal intracelular y el dominio C-terminal extracelular (Hamilton et al. 2001). Actualmente el modelo predicho consiste en un total de once dominios transmembrana con un amplio dominio N-terminal (Figura 1) que incorpora previsiblemente tres hélices alfa transmembrana y una gran cola citosólica (de entre 82 y 103 aminoácidos). Este modelo se basa en la cristalización del transportador de nucleósidos concentrativo del procarionta *Vibrio cholerae* (vcCNT) dado que existe una elevada homología entre los ortólogos procariontas y los eucariotas (Johnson et al., 2012). Por ejemplo la homología entre hCNT3 y vcCNT es del 39% (Arimany-Nardi et al. 2017).

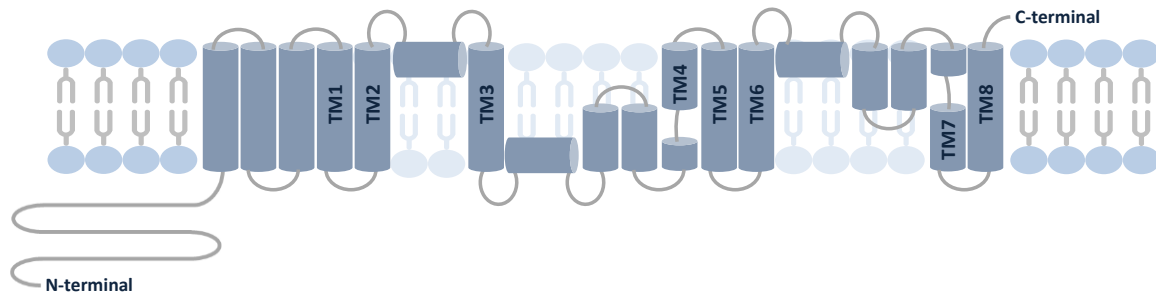


Figura 1. Representación esquemática de la topología de hCNT.

De todas maneras, existe una gran diferencia entre ambas proteínas, que reside en la presencia del gran dominio N-terminal que solo está presente en el ortólogo eucariota. Este dominio ha sido extensamente estudiado con tal de elucidar su posible papel en otras funciones celulares que podrían no estar relacionadas con el mero transporte. Un estudio demuestra como una versión de hCNT1 mutado que carece de los primeros 174 residuos retiene su capacidad transportadora y por ello, ni la cola N-terminal ni los primeros 3 dominios transmembrana son esenciales para su correcta función (Hamilton et al. 2001).

Respecto al dominio C-terminal extracelular, hCNT1 y hCNT2 presentan varios sitios de glicosilación (Pastor-Anglada et al. 2008) que pueden estar modulando la actividad y la localización de estos transportadores.

## 2.2 Transportadores de nucleósidos equilibrativos (*SLC29*)

Los transportadores de nucleósidos equilibrativos, a diferencia de los concentrativos, median un transporte bidireccional a favor de gradiente de manera independiente de sodio. Esta difusión pasiva permite la entrada y salida de los sustratos de manera dependiente de la concentración (Baldwin et al. 2004). La expresión de las proteínas ENTs está ampliamente distribuida en eucariotas pero no está presente en procariontes (King et al. 2006).

Existen cuatro miembros, siendo hENT1 (*SLC29A1*) y hENT2 (*SLC29A2*) los mejor caracterizados. Comparten un 40 % de la secuencia y ambos transportan purinas y pirimidinas. Funcionalmente, se distinguen en su diferente sensibilidad a

nitrobenziltioinosina (NBTI), un análogo estructural de la adenosina, siendo hENT1 más sensible que hENT2 (Yao et al. 2011). Ambas proteínas coexisten en muchas células lo que refleja la importancia de estos transportadores en la asequibilidad de nucleósidos. Los nucleósidos internalizados pueden venir de la dieta o ser producidos por tejidos como el hígado, lo que permite que las células que carecen de la síntesis *de novo* de nucleósidos puedan realizar la vía de recuperación (Young et al. 2008). hENT2 además, juega un papel importante en esta vía dado que es capaz de transportar nucleobases, entre ellas hipoxantina, esencial para la síntesis de purinas por la vía de recuperación (Hyde et al. 2001). En células polarizadas, hENT1 y hENT2 se encuentran en la membrana basolateral y junto con los hCNTs participan en el flujo transepitelial de nucleósidos en epitelios absortivos como el riñón y el intestino (Rose & Coe 2008; Pastor-Anglada et al. 2007).

En la Tabla 2 se muestran los sustratos internalizados por hENT1 y hENT2 y sus afinidades por los sustratos.

<b>Transportador</b>	<b>Gen</b>	<b>Sustrato (Km)</b>	<b>Inhibidor (Ki)</b>
<b>hENT1</b>	<i>SLC29A1</i>	Uridina (240 µM) Timidina (300 µM) Citidina (580 µM) Inosina (170 µM) Adenosina (40 µM) Guanosina (140 µM)	NBTI (1-10 nM) Dipiridamol (5 nM)
<b>hENT2</b>	<i>SLC29A2</i>	Uridina (200 µM) Timidina (710 µM) Citidina (5,6 mM) Inosina (50 µM) Adenosina (140 µM) Guanosina (2,7 mM) Nucleobases (mM)	NBTI (> 10 µM) Dipiridamol (350 nM)

Tabla 2. Sustratos internalizados por hENT1 y hENT2 y sus propiedades cinéticas. Adaptado de Pastor-Anglada et al. 2018.

La localización de ambos transportadores no es exclusiva de la membrana plasmática dado que estas proteínas se han detectado en la membrana nuclear y en el retículo endoplasmático donde pueden estar mediando el transporte entre el compartimento luminal y el citosol (Young et al. 2008).

Esta característica la comparten con el transportador hENT3 (*SLC29A3*), que hasta el momento solo se ha detectado intracelularmente, en concreto en la mitocondria. Esta isoforma es sensible al pH, presenta una amplia selectividad de sustrato, transporta nucleósidos y dideoxinucleósidos pero es relativamente insensible a NBTI. Hasta la fecha es el único transportador relacionado con una enfermedad hereditaria, el síndrome H, asociado a la mutación en el gen *SLC29A3* (Govindarajan et al. 2009).

El cuarto miembro, hENT4 (*SLC29A4*), es el más alejado funcionalmente del resto de miembros de la familia. Transporta adenosina y monoaminas en el cerebro y el corazón además de ser sensible al pH, siendo más activo a pH ácido (Yao et al. 2011).

La estructura propuesta para estos transportadores consta de 11 dominios transmembrana con el extremo N-terminal intracelular y el extremo C-terminal extracelular. Los dominios transmembrana están conectados por regiones hidrófilas cortas a excepción de dos grandes *loops* (Figura 2). El primero es extracelular y se encuentra entre los dominios transmembrana 1 y 2. Contiene sitios de glicosilación esenciales para la actividad de hENT1 y para la correcta localización en membrana de hENT2. El segundo *loop*, localizado entre los dominios transmembrana 6 y 7 es intracelular y contiene residuos fosforilables que pueden estar implicados en la regulación de estas proteínas por quinasas (Dos Santos-Rodriguez et al. 2014).

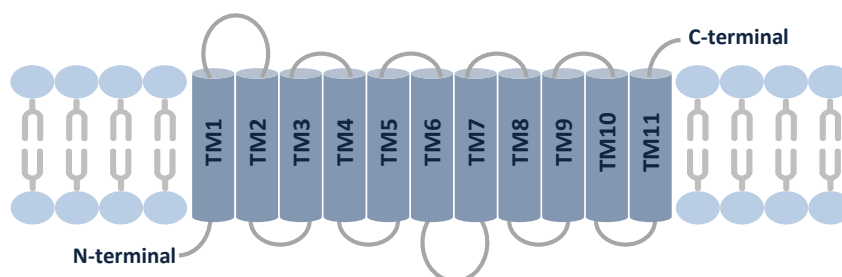


Figura 2. Representación esquemática de la topología de hENT.

### 2.3 Distribución tisular y expresión de los transportadores de nucleósidos

Las dos familias de transportadores de nucleósidos (hCNTs y hENTs) se encuentran ampliamente distribuidas entre los diferentes tipos celulares (Figura 3). Inicialmente se creía que la expresión de los hCNTs se limitaba a epitelios absortivos pero actualmente se sabe que su expresión es mucho más extensa. Ambas familias génicas coexisten en muchas células pudiéndose expresar también en los mismos dominios. Esta coexpresión por ahora solo se entiende en algunos epitelios donde se localizan en diferentes dominios permitiendo el flujo vectorial de nucleósidos (Molina-Arcas et al., 2009).

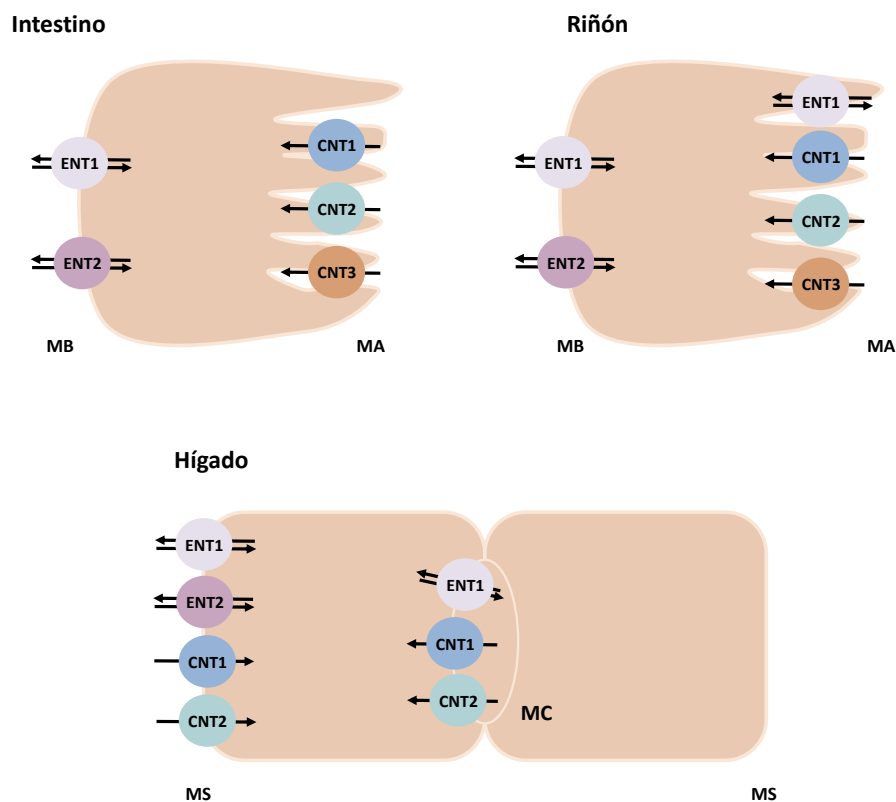


Figura 3. Distribución de los transportadores de nucleósidos en tejidos polarizados. MB: Membrana Basolateral. MA: Membrana Apical. MS: Membrana Sinusoidal. MC: Membrana Canalicular.

Entre los transportadores equilibrativos, hENT1 presenta niveles altos de expresión en eritrocitos, placenta, hígado, corazón, riñón y cerebro mientras que hENT2 se expresa abundantemente en cerebro, corazón, placenta, timo, próstata, páncreas y músculo esquelético (Hyde et al. 2001). hENT3 también se expresa en numerosos tejidos,

aunque es abundante en placenta y hENT4 parece tener una expresión ubicua (Young et al. 2008; Baldwin et al. 2004).

En el intestino los hCNTs se encuentran principalmente en la membrana apical mientras que los hENTs en la membrana basal. De todas maneras, existe una clara distribución asimétrica entre los transportadores concentrativos y los equilibrativos. Mientras los primeros se encuentran principalmente en enterocitos, los segundos se expresan mayoritariamente en las células de la cripta. Estas observaciones revelan como hCNT1 y hCNT2 se expresan en células diferenciadas siendo su expresión variable a lo largo del intestino mientras que hENT1 y hENT2 contribuyen a la recaptación de nucleósidos y nucleobases con fines proliferativos. En el caso de hCNT3, su expresión es constante a lo largo del tracto intestinal pero su expresión es baja (Pastor-Anglada et al., 2018).

El riñón tiene una importante función en la secreción y reabsorción de nucleósidos y sus análogos. hENT1 se encuentra tanto en la membrana apical como basolateral mientras que la localización de hENT2 es exclusiva de la membrana basolateral. Ambos transportadores predominan en el túbulo epitelial distal. Los transportadores concentrativos en cambio, se localizan solo en la membrana apical aunque su expresión es mayor en el túbulo proximal (Young et al. 2013; Govindarajan et al. 2007).

El hígado tiene un papel fundamental en mantener la homeostasis de nucleósidos y es la principal fuente de nucleósidos no derivados de la dieta. hCNT1 y hCNT2 se localizan en la membrana sinusoidal donde facilitan la absorción de nucleósidos desde la sangre y también en la membrana canalicular donde median la recaptación de los nucleósidos desde la bilis. hENT1 y hENT2, localizándose en ambas membranas, también participan en la absorción o secreción dependiendo de la concentración de estas moléculas en los diferentes compartimentos. En la membrana sinusoidal liberan nucleósidos de la síntesis *de novo* (Govindarajan et al. 2008).

Los transportadores de nucleósidos también son importantes en la recuperación de nucleósidos en aquellos órganos que tienen poca capacidad de realizar la síntesis *de novo*, como el sistema nervioso central. En el cerebro, parece que hENT1 se distribuye con un patrón que se correlaciona con la expresión del receptor de adenosina, no

siendo el caso para hENT2. hENT1 está involucrado en modular los niveles sinápticos de purinas relacionados con el sueño y la ansiedad. Además se ha estudiado como los transportadores de nucleósidos están involucrados en recaptar o liberar adenosina después de procesos isquémicos y su modulación de la actividad puede actuar como neuroprotector (Rose & Coe 2008).

La expresión de determinados transportadores de nucleósidos puede verse disminuida en las células tumorales. La primera evidencia de la pérdida de expresión en tumores se determinó en un modelo de hepatocarcinogénesis inducida en rata (Dragan et al. 2000). En humanos, aunque exista una gran variabilidad entre individuos, determinados estudios muestran esta disminución en la expresión en tumores en comparación con los epitelios normales (Pennycooke et al. 2001). Por ejemplo, el análisis inmunohistoquímico de hENT1, hENT2 y hCNT1 en 300 tumores ginecológicos demostró que aunque hubiera una gran variabilidad entre muestras, un gran número eran negativos para hCNT1 mientras que todos retenían la expresión de los transportadores equilibrativos (Farré et al. 2004). De manera general, podemos afirmar que la expresión de hENT1 se considera constitutiva y el aumento de su expresión se relaciona con estímulos de tipo proliferativo, por lo que sus niveles de expresión suelen ser altos en tumores mientras que los transportadores concentrativos se asocian a células diferenciadas (Aymerich et al., 2004).

### **2.4 Regulación de los transportadores de nucleósidos**

El estudio de la regulación de los transportadores de nucleósidos se ha llevado a cabo en varios modelos celulares, siendo el hígado el tejido mayoritario en el estudio de estas proteínas.

Los niveles de expresión de hENT1, hENT2, hCNT1 y hCNT2 en células derivadas de parénquima hepático parecen ser dependientes del estado de diferenciación celular (Del Santo et al. 2001; Pastor-Anglada et al. 2001). Así, los transportadores equilibrativos son los que poseen una mayor expresión en hepatocitos fetales mientras que los concentrativos se asocian a tipos celulares más diferenciados. Un ejemplo es la disminución en la expresión de estos últimos en modelos de hepatocarcinogénesis,

proceso estrechamente relacionado con la desdiferenciación celular (Dragan et al. 2000). Por el contrario, la diferenciación con glucocorticoides de la línea celular IEC-6, derivada de células de la cripta y por lo tanto con un fenotipo desdiferenciado, provoca un aumento en los niveles de expresión y actividad de los transportadores CNT1 y CNT2 (Aymerich et al. 2004).

Además, en la línea celular FAO de hepatoma de rata se ha descrito que TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) es un activador transcripcional de CNT2 (Valdés et al. 2006) mientras que el tratamiento con ácidos biliares aumenta la actividad del transportador, tanto en la línea celular FAO como en células parenquimales hepáticas (Fernández-Veledo et al. 2006). Respecto a hCNT1, la activación transcripcional está mediada por HNF-4 $\alpha$  (*Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) en ensayos realizados en diferentes líneas celulares humanas de hígado, intestino y riñón (Klein et al. 2009).

Respecto a las proteínas ENTs, la activación transcripcional de hENT1 se regula por diferentes factores de transcripción como Sp1 (*Zinc-finger specificity protein-1*) y MAZ (*Myc-associated zinc protein*) (Abdulla & Coe 2007). Además, en la línea IEC-6 el estímulo con TGF- $\alpha$  (*Transforming growth factor alpha*) o EGF (*Epidermal growth factor*) promueve un aumento en los niveles de RNA mensajero de hENT1 (Aymerich et al. 2004). Otro de los factores que regulan este transportador es HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*). Este factor inducido por hipoxia es capaz de reducir los niveles de mENT1 y mENT2 aumentando por lo tanto los niveles de adenosina extracelulares y con ello la activación de los receptores de adenosina. Este mecanismo de regulación posee una gran relevancia dado que tiene un efecto cardio y neuroprotector frente a procesos de hipoxia e isquemia (Chaudary et al. 2004; Eltzhig et al. 2005).

A parte de la regulación transcripcional, existe una regulación de estos transportadores a nivel de proteína por modificaciones post-traduccionales. Así, la glicosilación de hENT1 es necesaria para su correcta localización y función (Bicket & Coe 2016) mientras que su ubiquitinización y degradación vía proteosoma en los eritrocitos es necesaria para llevar a cabo la respuesta adaptativa a bajos niveles de oxígeno en condiciones de alta altitud (Song et al. 2017). Respecto a las proteínas hCNTs, la proteína RS1 regula negativamente la localización en membrana plasmática (Errasti-



Murugarren et al. 2012) y el ácido trans-retinoico (ATRA) promueve el tráfico a membrana del transportador hCNT3 y con ello su actividad en la línea MEC1, un modelo de leucemia linfática crónica (Fernández-Calotti & Pastor-Anglada 2010).

### **2.5 Papel farmacológico de los transportadores de nucleósidos**

Dado el papel fundamental de los nucleósidos y nucleótidos en la fisiología celular se han desarrollado fármacos denominados análogos de nucleósidos que actúan como antimetabolitos (Jordheim et al. 2013). Estas moléculas poseen una estructura molecular muy similar a los nucleósidos naturales por lo que al mismo tiempo están compartiendo los mecanismos de entrada así como las mismas rutas metabólicas. Por ello, estos fármacos necesitan de los transportadores de nucleósidos para internalizarse dado que conservan su naturaleza hidrofílica (Abdulla & Coe 2007).

Una vez en el interior celular se fosforilan y se transforman en su forma activa, todo ello por enzimas del metabolismo de purinas y pirimidinas. Una vez están en su forma activa, pueden inhibir enzimas implicados en la síntesis de DNA o ser incorporados en los ácidos nucleicos, causando daño e induciendo apoptosis (Pastor-Anglada & Pérez-Torras 2015).

Estos fármacos poseen una gran eficacia en el tratamiento de ciertos tumores e infecciones víricas. Por ejemplo, el 20% de los fármacos para tratar el cáncer son análogos de nucleósidos (Parker 2009). Sin embargo, la biodisponibilidad farmacológica y la respuesta al tratamiento están condicionadas por los niveles de expresión de los transportadores que los internalizan (Zhang et al. 2007), que como se ha comentado anteriormente, se pierden en los procesos tumorales. Así pues, las proteínas SLC son a su vez dianas terapéuticas (Lin et al. 2015).

### **3 Papel de los transportadores de nucleósidos como transreceptores**

Las células necesitan comunicarse con el ambiente para obtener nutrientes, dividirse y ser capaces de responder a las señales para adaptarse en condiciones de estrés y en respuesta a cambios fisiológicos. Las proteínas de membrana son la principal

herramienta de comunicación entre el interior y el exterior de las células y esta constante comunicación viene dada gracias a los canales, los receptores y los transportadores. Estas proteínas están presentes en todos los tipos celulares y representan el 10-15% del genoma (Diallinas 2017).

Actualmente existe otro tipo de mecanismo capaz de llevar a cabo las funciones descritas anteriormente, y al cual se le conoce con el nombre de transceptor. La palabra transceptor deriva de la contracción de transportador y receptor lo que significa que determinados transportadores pueden de manera dependiente o independiente de transporte modular diversas funciones celulares (Pastor-Anglada & Pérez-Torras 2018a) (Figura 4). Se cree que evolutivamente algunos receptores derivan de transceptores que con el tiempo han ganado la función de receptor y perdido al mismo tiempo la capacidad transportadora (Thevelein & Voordeckers 2009).

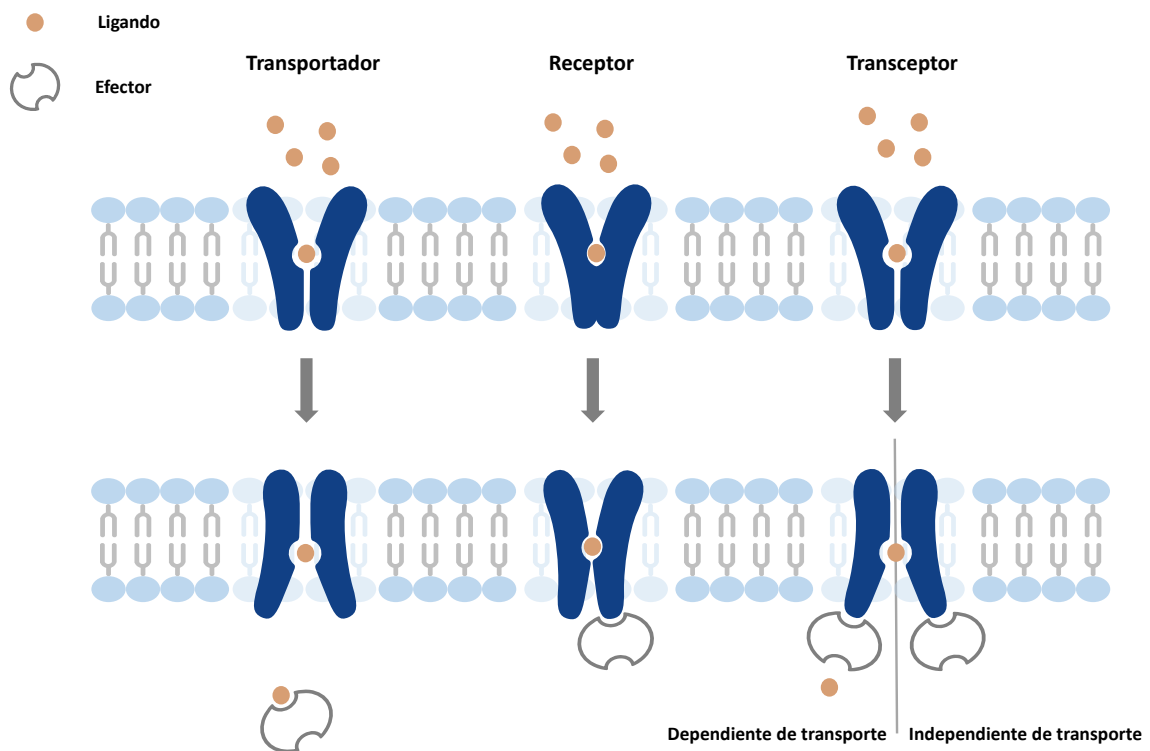


Figura 4. Esquema del funcionamiento de un transportador, un receptor y un transceptor.

El primer transceptor descrito fue Gap1 en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta proteína combina la capacidad de translocar aminoácidos junto con la capacidad de activar la vía de señalización mediada por PKA (*Protein Kinase A*) por lo que posee

adicionalmente la función de receptor (Donaton et al. 2003). Actualmente se han descrito transceptores en otros muchos reinos como en mamíferos (Stolarczyk et al. 2010) y plantas (Giehl & Von Wirén 2015).

Por lo que respecta al estudio en mamíferos, existen varios miembros de la familia de transportadores SLC a los que se les han atribuido nuevas funciones. Un ejemplo es el transportar NIS (*Sodium iodide symporter*), el cual se encuentra sobreexpresado en algunos carcinomas y su localización en la membrana plasmática pasa a ser mayoritariamente intracelular en los procesos tumorales. Este transportador localizado intracelularmente, promueve la migración e invasión celular gracias a la interacción por su dominio C-terminal con la proteína LARG (*Leukemia-associated RhoA guanine exchange factor*). Este efecto se obtiene del mismo modo con una forma mutada del transportador que conlleva la pérdida de su capacidad transportadora, por lo que la activación de la señalización mediada por NIS es independiente del transporte (Lacoste et al. 2012).

Otro claro ejemplo de transceptor es el transportador SMCT1 (*Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*). La expresión de esta proteína se ve disminuida en cáncer y su expresión heteróloga en células tumorales promueve el arresto del ciclo celular y la apoptosis de manera independiente de su función transportadora. Estos efectos vienen mediados por la interacción de esta proteína con la proteína anti apoptótica survivina y por su inhibición al mismo tiempo a nivel transcripcional (Coothankandaswamy et al. 2013).

En nuestro laboratorio también se han podido atribuir nuevas funciones a los transportadores de nucleósidos poniendo de manifiesto la implicación de estas proteínas en diferentes procesos cruciales de la fisiología celular que van más allá de su papel como meros mediadores de la bioequilibrio de sus sustratos. En concreto se han descrito funciones de transceptor para hCNT1 como modulador del crecimiento tumoral (Pérez-Torras et al. 2013) y se postula que hCNT2 podría tener un papel como posible regulador del metabolismo energético tumoral (Huber-Ruano et al. 2010).

### 3.1 hCNT1 como transceptor

La expresión del transportador hCNT1 se pierde en los procesos tumorales siendo su expresión baja o indetectable en tumores ginecológicos, cáncer de páncreas, de mama y colangiocarcinoma (Farré et al. 2004; Gloeckner-Hofmann et al. 2006; Bhutia et al. 2011; Urtasun et al. 2017). Además, en líneas celulares derivadas de tumores la expresión de hCNT1 resulta indetectable del mismo modo que su función transportadora. Por el contrario, en tejidos como el intestino, el hígado y el riñón su expresión es notable y se encuentra estrechamente relacionada con la diferenciación celular (Aymerich et al., 2004; Govindarajan et al., 2007, 2008).

Las funciones transceptoras de este transportador de nucleósidos se evidenciaron por primera vez en un trabajo publicado por nuestro grupo (Pérez-Torras et al. 2013). El estudio se realizó en dos líneas celulares de adenocarcinoma pancreático, NP-9 y NP-29 que carecen de la expresión del transportador. La restitución de hCNT1 en estas líneas es capaz de modular el ciclo celular, inducir la muerte celular, disminuir la migración y modular vías de señalización celular como son las vías de PI3K/AKT/mTOR y MAPK/ERK. Estas funciones son independientes de su capacidad transportadora, dado que la restitución de una variante mutada de hCNT1 (hCNT1S546P) que no transporta pero se localiza correctamente en la membrana plasmática celular (Cano-Soldado et al. 2012) ejerce los mismos efectos (Pérez-Torras et al. 2013). Los efectos descritos anteriormente no pueden deberse a un desequilibrio entre los *pools* de purinas y pirimidinas que pueden dar lugar a efectos genotóxicos (Mathews 2015) sino a sus funciones de transceptor, dado que los mismos resultados se obtienen con la variante mutada. Del mismo modo, la recuperación de la expresión de hCNT1 en xenografts de adenocarcinoma pancreático humano también modula la biología tumoral, en este caso inhibiendo el crecimiento tumoral (Pérez-Torras et al. 2013).

### 3.2 hCNT2 como posible transceptor

La expresión de hCNT2, del mismo modo que para hCNT1, se ve disminuida en los procesos tumorales como también en modelos animales de hepatocarcinogénesis inducida (Dragan et al. 2000) y su expresión parece ser una característica de los

hepatocitos diferenciados (Santo et al. 1998; Dragan et al. 2000) donde se encuentra regulado por glucocorticoides y factores de transcripción específicos del hepatocito (Valdés et al. 2006; Fernández-Veledo et al. 2007).

CNT2 es un transportador de adenosina de alta afinidad que puede activarse por el receptor de adenosina A1 por un mecanismo dependiente de canales de potasio sensibles al ATP y por lo tanto a su vez, regulados por el estado energético celular (Dufлот et al. 2004; Medina-Pulido et al. 2013). Existe también una regulación del transportador en modelos neuronales por procesos de hipoxia/isquemia, donde su expresión se ve disminuida tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. En estos modelos, la disminución de los niveles de CNT2 conlleva a una disminución de los niveles de adenosina y por lo tanto a una menor activación de la vía dependiente de la quinasa de AMP (AMPK) (Medina-Pulido et al. 2013).

La proteína AMPK es un sensor de los niveles de ATP que se activa cuando los niveles de este nucleótido disminuyen y aumentan los de AMP o ADP. En respuesta a esta activación, la célula promueve las vías catabólicas para obtener ATP disminuyendo las vías anabólicas (Mihaylova & Shaw 2012). La activación de AMPK dependiente de la adenosina internalizada por CNT2 se describió por primera vez en nuestro laboratorio por Aymerich y colaboradores (Aymerich et al. 2006), evidenciando la implicación de este transportador en el metabolismo energético. En estos experimentos, la línea celular de intestino de rata IEC-6 tratada a concentraciones fisiológicas de adenosina mostró un aumento en los niveles de AMP y en la fosforilación de AMPK, la forma activa, así como también un aumento en la fosforilación y activación de una de sus dianas, la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Este efecto es dependiente del transporte de este nucleósido mediado por CNT2 dado que la inhibición de la entrada de adenosina con formicina B, un análogo no metabolizable de nucleósidos, no resulta en la activación de AMPK. Este mismo efecto se observó también en un modelo de células de parénquima hepático y en un modelo neuronal (Aymerich et al. 2006; Medina-Pulido et al. 2013).

Para establecer el posible papel de hCNT2 como transceptor, nuestro laboratorio ha llevado a cabo estudios de doble híbrido en levadura y *GST-pull down* utilizando el dominio N-terminal citosólico de hCNT2. Se identificaron dos proteínas, aldolasa B y

GRP58 (*Glucose-regulated protein 58*) como proteínas de interacción con el transportador. Ambas proteínas están relacionadas con el metabolismo energético lo que refuerza el posible papel de este transportador como regulador del metabolismo celular (Huber-Ruano et al. 2010).

La interacción con aldolasa B fue validada mediante la técnica FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) en células HeLa. Aldolasa B es una enzima de gran importancia en el metabolismo de la glucosa y la fructosa, siendo la isoforma B típicamente hepática (Tao et al. 2015). La interacción entre ambas proteínas en hepatocitos se ve favorecida por la presencia de fructosa y glucosa que al potenciar el flujo glucolítico promueven no solo la interacción, sino también el aumento de la afinidad de este transportador por sus sustratos (Huber-Ruano et al. 2010).

GRP58, en cambio, es una tiol oxidoreductasa implicada en múltiples funciones. Se ha descrito la presencia de esta proteína en diferentes localizaciones celulares como el retículo endoplasmático, la mitocondria, el núcleo, así como también cerca de la membrana plasmática. Además, dos de sus cuatro dominios le permiten interactuar con diferentes proteínas y participar en complejos proteicos (Turano et al. 2011). La interacción de GRP58 con CNT2 ha sugerido un modelo de regulación dependiente de la asequibilidad de nutrientes por parte de la célula siendo GRP58 un efector negativo en la función transportadora de CNT2. Concretamente, a niveles bajos de glucosa la expresión de GRP58 se ve incrementada mientras que la expresión y la actividad de CNT2 disminuyen (Huber-Ruano et al. 2010).

#### **4 Metabolismo energético y reprogramación metabólica**

El metabolismo energético es un proceso altamente regulado y estrechamente relacionado con la supervivencia y la proliferación celular. La disponibilidad de nutrientes junto con la homeostasis celular y la señalización hormonal determinan las vías metabólicas que se activan en los diferentes tejidos. El aumento del flujo glucolítico y la disminución del metabolismo oxidativo dan lugar al aumento en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, esenciales para la proliferación celular. En cambio, la privación de nutrientes conlleva a un aumento en la fosforilación

oxidativa que permite la obtención de energía pero a su vez limita la proliferación. A diferencia de las células normales, las células tumorales tienen una capacidad ilimitada de dividirse y proliferar por lo que su anabolismo y su metabolismo energético son diferentes respecto al tejido de origen. La proliferación depende de la señalización ejercida por los factores de crecimiento, por lo que aunque haya disponibilidad de nutrientes las células dependen de estas señales para dividirse. En los procesos tumorales, estas células poseen estas vías de señalización o los propios receptores alterados por lo que tienen la capacidad de proliferar de manera independiente de estos factores de crecimiento (Vander Heiden et al., 2009).

El cambio metabólico en tumores fue descrito por primera vez por Otto Warburg en torno a 1920 (Warburg & Dickens 1926). Este cambio metabólico se caracteriza aunque el oxígeno no sea limitado, por un aumento de la glucólisis aeróbica (también denominado efecto Warburg) y por lo tanto la metabolización de la glucosa a piruvato sin que este último contribuya a la fosforilación oxidativa (OXPHOS), la principal vía para la producción de ATP. Esto provoca que las células tumorales presenten un mayor consumo de glucosa debido a la ineficiencia de la glucólisis para producir ATP y un aumento en la producción de lactato (Bertout et al., 2008; Solaini et al., 2010). El metabolismo anaeróbico de glucosa resulta en una caída drástica en la producción de energía, dado que esta vía produce 2 moles de ATP por mol de glucosa mientras que la oxidación completa de la glucosa produce 38 moles de ATP por mol de glucosa (Gatenby & Gillies 2004) (Figura 5). Cabe destacar que en células normales, el efecto Warburg es un fenómeno reversible estrechamente relacionado con procesos de proliferación por lo que no es exclusivo de procesos de malignidad (Denko 2008).

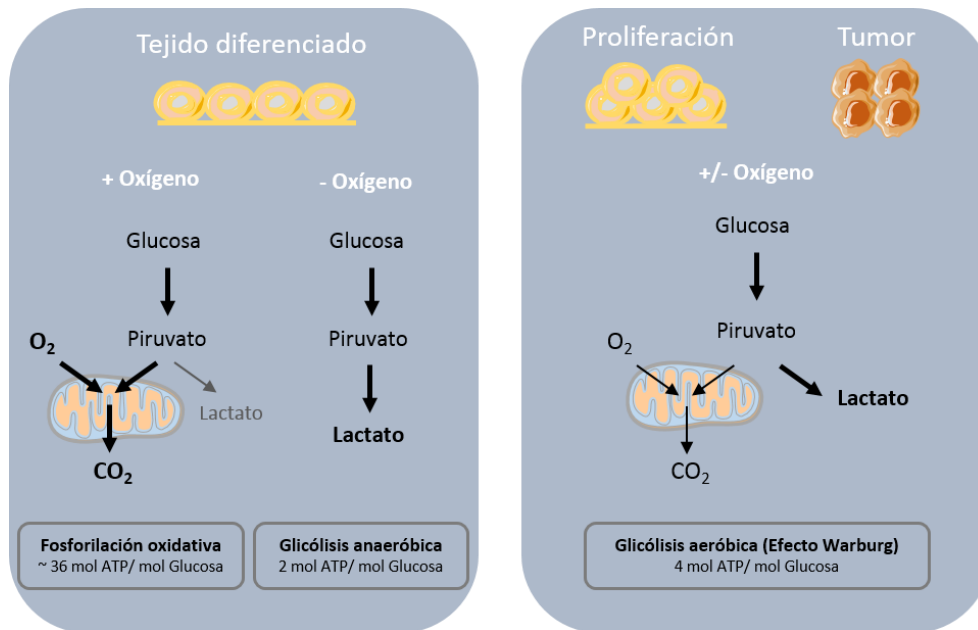


Figura 5. Metabolismo energético en células normales, células en proliferación y tumorales bajo condiciones de normoxia o hipoxia.

En sus estudios, Otto Warburg describió que la disfunción mitocondrial era la causa por la que las células tumorales realizan la glucólisis aeróbica y por lo tanto que esta característica era común en todos los fenotipos tumorales. Actualmente se sabe que la mitocondria es esencial en la viabilidad celular tanto en células normales como tumorales, dado que la eliminación del DNA mitocondrial en células tumorales reduce su crecimiento y tumorigénesis. El DNA mitocondrial posee los 13 genes más importantes de OXPHOS mientras que el nuclear codifica para los restantes y para los genes implicados en el metabolismo mitocondrial y su biogénesis. Aunque mutaciones en estos genes afectan al estado energético de las células y contribuyen a la reprogramación metabólica, la funcionalidad de la mitocondria sigue siendo esencial para la viabilidad celular (Wallace 2012).

Existen muchas evidencias de que el metabolismo energético está regulado por proteínas que pueden actuar como oncogenes o como supresores tumorales. Una evidencia clara que además es una característica de las células tumorales son las mutaciones en genes que dan como resultado una sobreexpresión de los transportadores de glucosa como GLUT1 y GLUT3 y que conllevan a un aumento de los



niveles de glucosa intracelulares con el consiguiente aumento de la glucólisis (Ganapathy-kanniappan & Geschwind 2013).

Además, las células en proliferación se caracterizan no solo por presentar unos niveles proteicos elevados de los transportadores de glucosa sino también de determinados enzimas de la glucólisis. El consiguiente aumento en intermediarios generados por el ciclo de Krebs da lugar a precursores de lípidos, aminoácidos y nucleótidos que resultan esenciales en los procesos proliferativos (Vander Heiden and DeBerardinis 2017). En concreto, esta estrategia promueve un aumento en la energía en forma de ATP y en las moléculas de fructosa-6-fosfato y gliceraldehido-3-fosfato, necesarias para la síntesis *de novo* de los ácidos nucleicos. Por otro lado aumentan los niveles de piruvato, esenciales para el metabolismo de los aminoácidos y por lo tanto el balance global se traduce en un aumento del anabolismo celular (Yalcin et al. 2009).

Una de las consecuencias de este cambio en el metabolismo de las células tumorales es el aumento en los niveles de lactato. El exceso de lactato que acompaña el efecto Warburg parece conllevar un ineficiente uso de los recursos celulares dado que por cada molécula de lactato que la célula excreta se gastan tres moléculas de carbono que podrían utilizarse para la producción de ATP o la biosíntesis de macromoléculas. Posiblemente, esta producción de lactato no interfiera en los niveles energéticos de la célula dado que permite incorporar más rápidamente los carbonos en biomasa lo que permite una división celular más rápida. Todo esto se consigue bajo condiciones en las cuales los nutrientes no son limitados y por lo tanto las células no se ven obligadas a optimizar la producción de ATP (Vander Heiden et al., 2009). El aumento de los niveles de lactato no solo provoca el aumento del pH intracelular sino también del extracelular que promueve la apoptosis de las células adyacentes que poseen p53 funcional favoreciendo por último la invasividad. Parte del lactato producido por las células tumorales es captado por las células normales de alrededor gracias al transportador MCT1 por lo que el consumo de glucosa en dichas células se reduce permitiendo así a las células tumorales tener una completa disponibilidad de este sustrato (Hasawi et al. 2014).

Una característica general de los tumores es su ambiente hipóxico (de 0 a 2% de oxígeno) dado que la tasa de proliferación por lo general excede la tasa de formación

de nuevos vasos sanguíneos. El ambiente hipóxico es un elemento importante en el microambiente tumoral y se encuentra regulando diferentes procesos como la formación del tumor, la angiogénesis y la metástasis así como la actividad metabólica de las células tumorales, induciendo la glucólisis (Ros & Schulze 2013). HIF-1 $\alpha$  es el principal factor de transcripción que permite la adaptación de las células tumorales al ambiente hipóxico.

En las células tumorales HIF-1 $\alpha$  se encuentra expresado de manera estable y no se degrada a diferencia de lo que ocurre cuando las células se encuentran en normoxia. En la mayoría de células de mamífero, la glucólisis se inhibe por la presencia de oxígeno lo que permite que la mitocondria oxide el piruvato a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En muchos tumores, aunque haya presencia de oxígeno, este factor de transcripción es capaz de permanecer estable gracias a mutaciones en ciertos oncogenes como PI3k/Akt, *src* y *ras* o a la inactivación del supresor tumoral VHL (Yalcin et al. 2009). Como resultado, HIF activa la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de glucosa (GLUT1 y GLUT3) o enzimas de la glucólisis como Hexokinasa 1 y 2 (HK1, HK2), Fosfofructoquinasa 1 (PFK1), Aldolasa y la Lactato deshidrogenasa A (LDHA). Este factor de transcripción también regula genes que contribuyen a disminuir la conversión de piruvato a Acetil-CoA así como a potenciar la adaptación de las mitocondrias a la hipoxia (Denko 2008; Kroemer & Pouyssegur 2008).

Este cambio metabólico representa una diferencia entre las células normales y tumorales convirtiéndose en una diana en la terapia anti tumoral. Una de las estrategias es la inhibición de la glucólisis pero los efectos nocivos en células que dependen de esta vía como el cerebro, corazón o retina son notables (Denko 2008). También se han desarrollado inhibidores de la lactato deshidrogenasa o activadores de la piruvato deshidrogenasa, aunque estos fármacos no han superado los ensayos clínicos (Vander Heiden and DeBerardinis 2017).

En algunos casos las terapias que tienen como diana el metabolismo sí que han resultado efectivas. Es así para el tratamiento con Asparaginasa en la Leucemia Linfoblástica Aguda. Dada la alta tasa de síntesis proteica y la baja capacidad de síntesis de Asparagina por parte de estas células tumorales, existe una elevada dependencia de este aminoácido que es transportado por la sangre. El fármaco es una

enzima que es capaz de eliminar los aminoácidos circulantes convirtiéndolos en ácido aspártico y amoniaco (DeBerardinis & Chandel 2016).

Muchos otros fármacos tienen como diana la síntesis de nucleótidos dado que los niveles de estos metabolitos son cruciales para la replicación de los tumores. Un factor importante reside en que, a diferencia de las proteínas y los lípidos, los nucleósidos no son proporcionados en cantidades suficientes por el microambiente tumoral y su metabolismo requiere aminoácidos no esenciales, ribosa y donadores de carbono (Vander Heiden and DeBerardinis 2017). Estos fármacos pueden mimetizar los nucleósidos naturales o inhibir enzimas implicadas en la síntesis como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.5.

## **OBJETIVOS**



Las proteínas hCNT poseen un papel fundamental en la captación de nucleósidos naturales y de sus análogos. En el caso de los hCNT su expresión está limitada a tejidos diferenciados y su expresión se pierde en procesos de dediferenciación y en procesos tumorales. Estas proteínas se han conservado evolutivamente pero los CNTs eucariotas presentan, a diferencia de los CNTs procariotas, en la región N-terminal, la incorporación de tres dominios transmembrana y una gran cola citosòlica. Esta adquisición evolutiva podría ser responsable de la incorporación de nuevas funciones celulares para estos transportadores y ser un lugar de interacción con otras proteínas. Así, la identificación de proteínas relacionadas con el metabolismo celular capaces de unirse al transportador hCNT2 anticipa su posible papel en el metabolismo energético y la identificación de hCNT1 como transceptor evidencia sus nuevas funciones independientes de su función transportadora.

En base a estos antecedentes, nos planteamos como objetivo general el estudio de nuevas funciones de los transportadores concentrativos de nucleósidos hCNT1 y hCNT2.

Para alcanzar este objetivo se propusieron los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar la regulación de hCNT2 y su papel como modulador del metabolismo energético.
2. Estudiar la relevancia del dominio N-terminal de hCNT1 en el papel de transceptor.
3. Validación y estudio funcional de las interacciones de hCNT1 con proteínas previamente identificadas.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## **1 Estudio del papel de hCNT2 como regulador del metabolismo energético**

El metabolismo energético es uno de los factores que se altera en los procesos tumorales y pese a que el efecto Warburg se describió en torno a 1920 (Warburg & Dickens 1926), los cambios en el metabolismo asociados al cáncer no han sido ampliamente estudiados hasta hace poco. Así, inicialmente las características diferenciales de las células tumorales se agrupaban en seis procesos diferentes (proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis, evasión de la muerte celular, replicación ilimitada y ausencia de respuesta a factores supresores) (Hanahan & Weinberg 2000), mientras que actualmente se han incorporado otras dos características que hay que considerar con tal de entender los procesos clave en la transformación celular: evasión del sistema inmune y reprogramación metabólica (Hanahan & Weinberg 2011).

Los mecanismos moleculares que contribuyen a esta reprogramación son diversos y engloban enzimas relacionados con las diferentes vías metabólicas, supresores tumorales y hasta reguladores del ciclo celular (Fajas 2013; Soga 2013). Actualmente, cada vez se identifican nuevos reguladores de este cambio metabólico, aunque algunas de estas proteínas no tengan una aparente relación directa con el metabolismo.

Como se ha introducido previamente, la expresión del transportador CNT2 se ha visto disminuida en un modelo de hepatocarcinogénesis inducida en rata (Dragan et al. 2000) y parece que exista también una disminución de su expresión en tumores humanos. Además, investigaciones de nuestro grupo han demostrado la interacción de hCNT2 con proteínas relacionadas con el metabolismo energético y como el flujo glucolítico modula la actividad del transportador (Huber-Ruano et al. 2010). Todo ello nos ha llevado a evaluar su posible papel en el cambio metabólico durante la transformación neoplásica, utilizando como modelo el hígado. Este órgano tiene un papel clave en numerosos procesos metabólicos contribuyendo a la homeostasis general.

### 1.1 Identificación de modelos celulares para el estudio de hCNT2

Para llevar a cabo este objetivo, es necesario disponer de líneas celulares que retengan la expresión del transportador. La expresión de los transportadores concentrativos de nucleósidos se atribuye a fenotipos bien diferenciados evidenciándose una pérdida de la expresión por ejemplo durante el cultivo primario de hepatocitos. Esto se debe a que las células mantenidas en cultivo, en este caso los hepatocitos, pierden el fenotipo hepático (Fernández-Veledo et al. 2007). Del mismo modo ocurre en las células tumorales, cuyo grado de diferenciación se ve disminuido y con ello los niveles de expresión de los transportadores concentrativos de nucleósidos (Aymerich et al. 2005). Dada la dificultad a la hora de trabajar con un modelo celular concreto que retenga la expresión de hCNT2, se planteó este primer reto con tal de escoger el mejor modelo o la mejor aproximación.

hCNT2 presenta una amplia distribución en los diferentes tejidos, incluido el hígado (Figura 6).

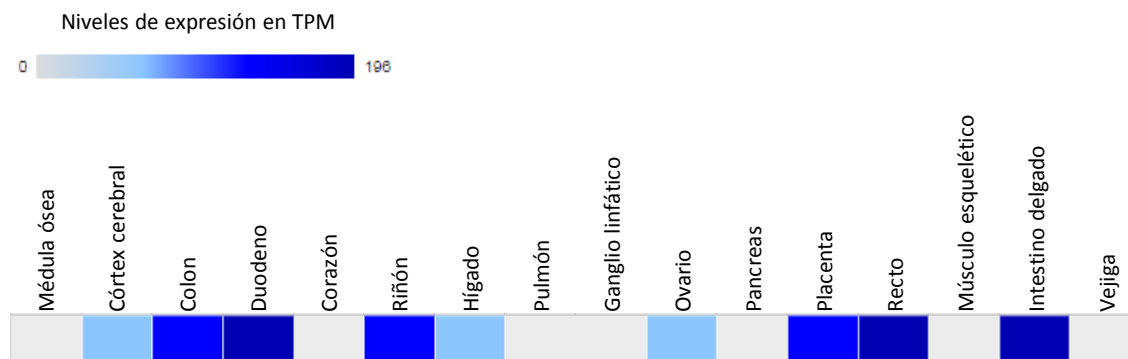


Figura 6. Niveles de expresión en TPM (Transcritos por millón) del gen *SLC28A2* en diferentes tejidos humanos. 122 muestras de diferentes tejidos humanos se analizaron por RNA sequencing. Datos obtenidos de Expression Atlas (Expression Atlas – E-MTAB-2836).

Si bien la expresión relativa de este transportador en el hígado no es la más elevada en comparación con otros tejidos, su función en este órgano junto con el transportador hCNT1 resulta esencial. El hígado constituye una reserva de nucleósidos para aquellos tejidos que carecen de la vía de síntesis *de novo* de nucleósidos por lo que la recaptación de estas moléculas desde los sinusoides hepáticos así como desde la bilis

contribuye a la homeostasis del propio hígado y de los demás tejidos (Young et al. 2013). Además el hígado es el órgano principal del metabolismo intermediario en el que se ubican las principales vías metabólicas por lo que representa un buen modelo en el que estudiar los efectos de hCNT2 en el metabolismo.

### 1.1.1 Cultivo primario de hepatocitos humanos

El cultivo primario de hepatocitos humanos fue establecido a partir de resecciones quirúrgicas de hígado sano de pacientes de cáncer colorrectal con metástasis hepáticas. Se escogió realizar el análisis en este primer modelo al ser un modelo no tumoral que podría ser un buen candidato de expresión de los transportadores de nucleósidos en hepatocitos. En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de los transportadores hCNTs y hENTs a diferentes tiempos de proliferación (desde el día 0 al día 6 después del aislamiento, D0-D6) (Figura 7).

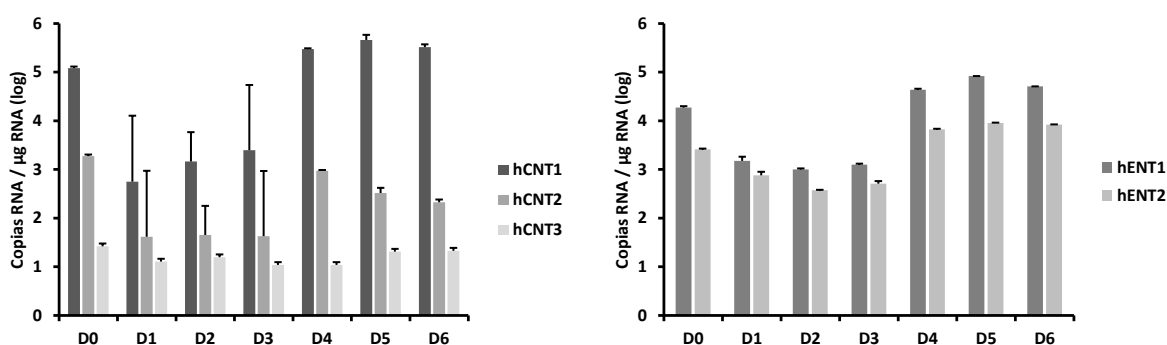


Figura 7. Niveles de expresión de los transportadores hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 y hENT2 determinados por *Real Time PCR* absoluta. Los niveles de estos transportadores fueron determinados a diferentes tiempos, siendo D0 aquellos hepatocitos extraídos directamente del paciente y procesados y los D1-D6 correspondientes al número de días que estuvieron en cultivo antes de ser analizados. Se representa la media  $\pm$  SEM de las dos réplicas analizadas por condición.

Los hepatocitos primarios expresan todos los transportadores de nucleósidos aunque esta expresión es variable a lo largo del tiempo y los niveles varían entre los miembros de la familia. hCNT1 es el transportador que más se expresa, con una disminución de la expresión en los primeros días de cultivo en placa (días 1, 2 y 3) y una recuperación durante los días posteriores. hCNT2, en cambio, presenta niveles más bajos de expresión que hCNT1 y su expresión parece disminuir en el tiempo en comparación

con los niveles detectados a día 0. Respecto a hCNT3, está descrito que su expresión es muy baja en hígado (Govindarajan et al. 2008) y como era esperable los niveles son muy bajos y su expresión no parece modularse durante los días de cultivo de los hepatocitos. En relación a la expresión de los transportadores equilibrativos, hENT1 y en menor medida hENT2 se expresan considerablemente, observándose una disminución de los niveles como en el caso de hCNT1 entre los días 1 y 3 con un aumento a partir del día 4 que se mantiene hasta el día 6 (Figura 7).

Un estudio previo realizado por el grupo en el que se analizó los niveles de expresión de hCNT1 y hCNT2 en hepatocitos primarios humanos demostró una disminución de estos transportadores durante los primeros días de cultivo mientras que se observó una recuperación de la expresión de hCNT1 a partir de las 96 horas, tiempo que correspondería con el día 4 del experimento. Considerando estos resultados, los niveles de los transportadores se decidieron analizar a un tiempo más largo de cultivo y por este motivo se mantuvieron hasta el día 6 (Fernández-Veledo et al. 2007).

A nivel proteico, los hepatocitos humanos presentaron niveles detectables de la proteína hCNT2 a todos los tiempos, con un cambio en el patrón de expresión a día 0, dado que el peso molecular mayoritario detectado en este caso es superior a 75 kDa (Figura 8).

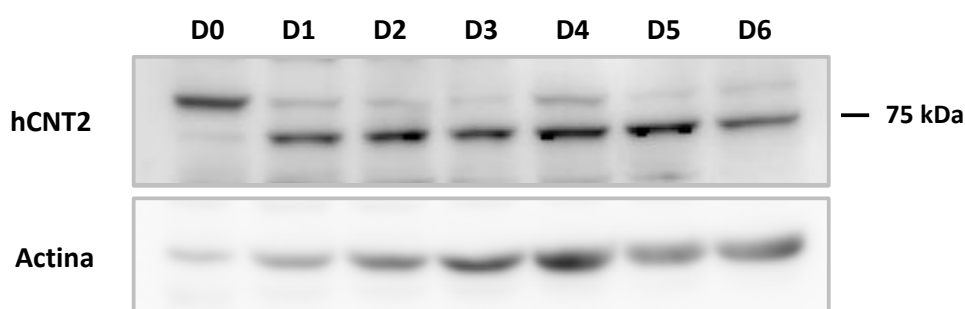


Figura 8. Patrón de expresión de hCNT2 a lo largo del tiempo de cultivo de los hepatocitos primarios. Los niveles proteicos se analizaron por *Western Blot* a diferentes tiempos (D0-D6).

El peso molecular predicho para hCNT2 es de 72 kDa, siendo esta forma la que prevalece entre los días 1 y 6 de cultivo. De todas maneras, se observa que la expresión de esta proteína a un peso molecular superior no es exclusiva del día 0, dado

que en los demás días, aunque en menor manera, se detecta su expresión. Se ha descrito que el transportador CNT2 de rata (rCNT2) posee residuos en el dominio extracelular C-terminal susceptibles de glicosilarse y esta modificación modula la maduración y localización del transportador (Pinilla-Macua et al. 2014). Por lo tanto, este cambio en el patrón de expresión podría deberse a variaciones en las modificaciones post-traduccionales de hCNT2 como glicosilaciones que estuvieran influyendo en la localización y función del transportador.

Para determinar si la proteína hCNT2 detectada a nivel de mensajero y de proteína es funcional, se realizaron ensayos de transporte a los días 4, 5 y 6. Se escogieron estas condiciones dado que en la *Real-time* PCR se observó una inducción de la expresión de los transportadores a estos tiempos.

Los ensayos de transporte se realizaron con uridina, transportada por hCNT1, hCNT2 y hCNT3 o la combinación de este nucleósido con exceso de citidina, sustrato de hCNT1 o exceso de guanosina, sustrato de hCNT2. No se observó una actividad significativa de transporte dependiente de sodio en ninguna de las condiciones analizadas, si bien en todos los casos se detectó transporte asociado a hENTs (Figura 9).

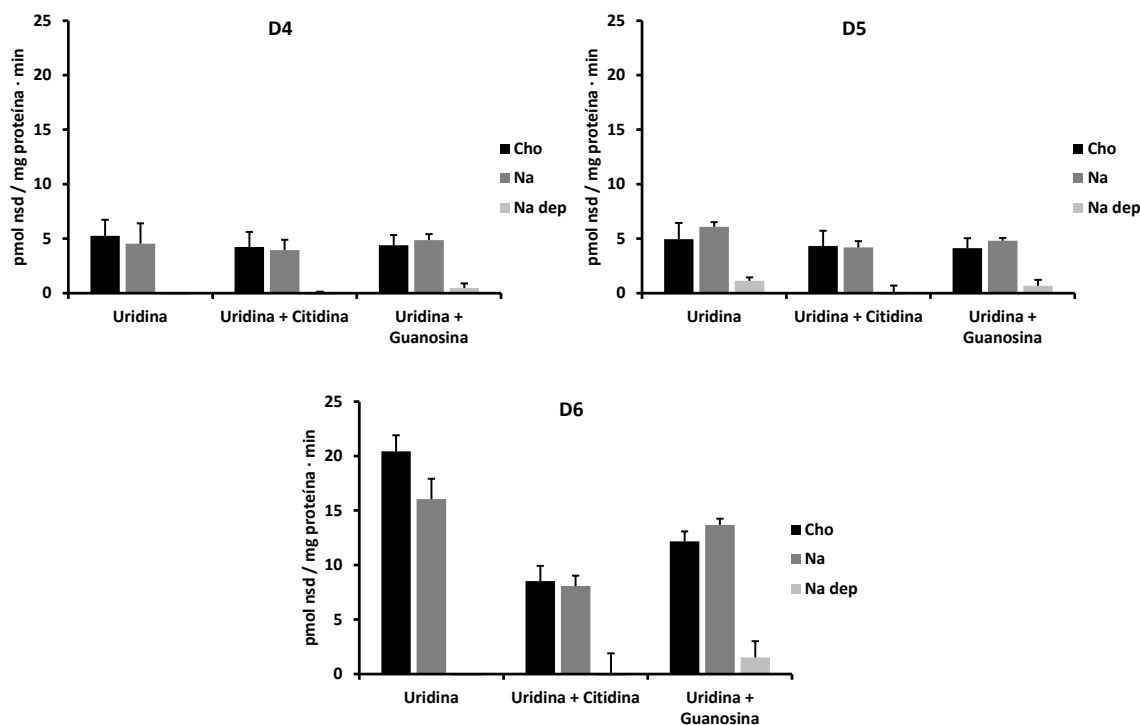


Figura 9. **Actividad de transporte dependiente de sodio en los hepatocitos primarios.** Las células se mantuvieron en cultivo durante 4, 5 y 6 días, tiempos a los que se realizaron los ensayos de transporte a un minuto con uridina tritiada sola o en combinación con citidina (100  $\mu$ M) o guanosina (100  $\mu$ M) en exceso para inhibir la actividad cis del transportador correspondiente. El transporte se realizó en medio colina (Cho) o sodio (Na), siendo la sodio dependencia (Na dep) calculada como la diferencia entre los valores de Na y Cho. Se representa la media  $\pm$  SEM de las cuatro réplicas analizadas por condición. Nsd: Nucleósido.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado que las modificaciones post-traduccionales influyen en la correcta localización y función de hCNT1. En concreto, los niveles de glicosilación del transportador modulan su actividad (manuscrito en revisión). Así, no se puede descartar que el proceso de cultivo de los hepatocitos a lo largo del tiempo tenga un efecto sobre el procesamiento de proteínas de membrana como los transportadores, que pueden estar dependiendo de las modificaciones post-traduccionales para su correcta localización y actividad transportadora.

Con estos resultados, se puede concluir que los hepatocitos primarios humanos parecen ser un buen modelo de expresión de los transportadores, tanto de los concentrativos como de los equilibrativos. En cambio, a nivel de actividad, estas células solo mostraron un transporte equilibrativo mediado por hENTs que en los primeros días resultó ser también muy bajo. Cabe destacar que el mantenimiento de los

hepatocitos primarios conlleva a su desdiferenciación, tanto a nivel morfológico como de las funciones específicas del hígado (Arterburn et al. 1995). Por lo tanto, dada la dificultad para obtener estas células con el hecho de no presentar actividad detectable, se decidió buscar otro modelo con el que poder realizar los diferentes experimentos, utilizando este modelo de manera puntual como prueba de concepto.

### 1.1.2 Línea celular THLE-2

La línea THLE-2 deriva de células de hígado sano inmortalizado con el antígeno T del virus SV40. Los niveles de expresión de los transportadores de nucleósidos se analizaron a diferente densidad celular para determinar si en alguna condición se podía detectar la expresión del transportador hCNT2. Los niveles se compararon con la expresión del transportador en los hepatocitos humanos. La expresión de hCNT2 en la línea THLE-2 resultó ser muy baja en comparación con los hepatocitos humanos y no parecería modularse por la confluencia celular (Figura 10).

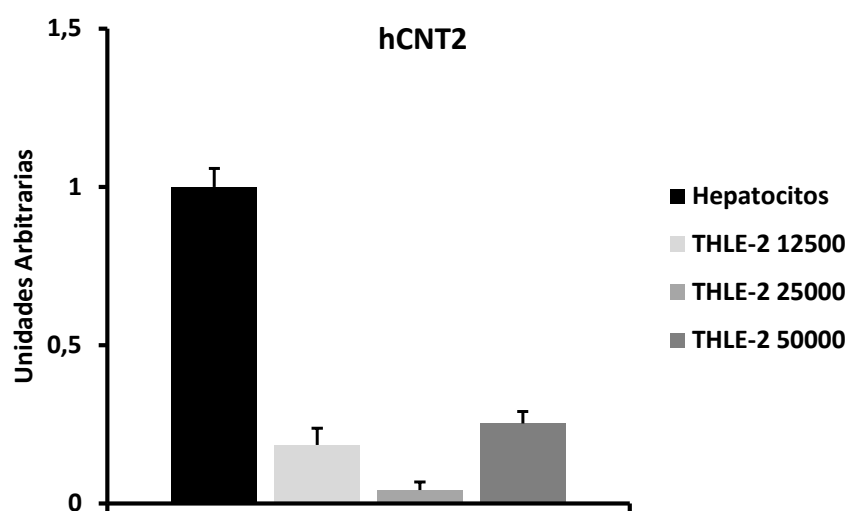


Figura 10. Niveles de expresión del transportador hCNT2 determinados por *Real Time PCR* en la línea celular THLE-2 y en los hepatocitos primarios humanos. Las células THLE-2 se sembraron a baja, media y alta densidad celular (12500, 25000 y 50000 células, respectivamente) y se procesaron las muestras 48 horas después. Los hepatocitos humanos corresponden a las células en cultivo a día 6. Se representa la media  $\pm$  SEM de las dos réplicas analizadas por condición.



Con tal de analizar la actividad de los transportadores en esta línea celular y en estas condiciones, se realizaron los siguientes ensayos de transporte (Figura 11). Solo se observó una ligera actividad de transporte con guanosina mientras que con uridina y citidina el transporte fue nulo. Esto indicaría que la actividad de transporte observada estaría mediada por hCNT2 aunque los valores obtenidos considerando el error no fueron significativos como para considerarlos positivos.

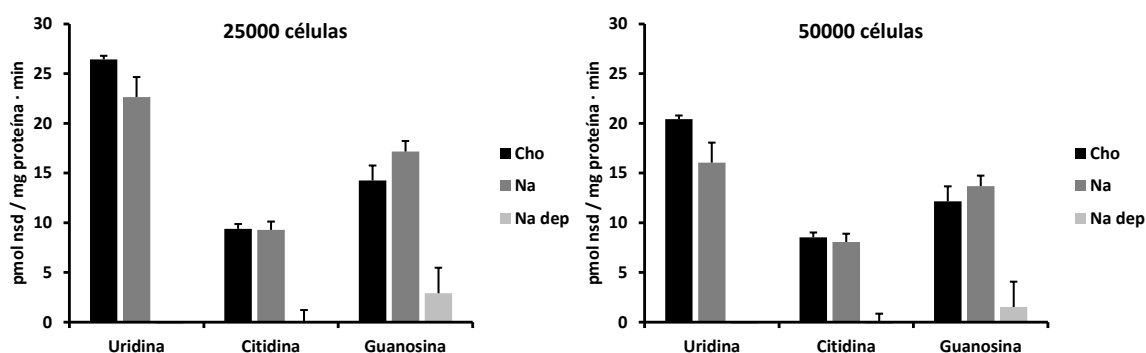


Figura 11. **Actividad de transporte dependiente de sodio en la línea THLE-2.** Se sembraron 25000 o 50000 células y 48 horas después se realizaron los ensayos de transporte a un minuto con uridina, citidina o guanosina tritizadas. El transporte se realizó en medio colina (Cho) o sodio (Na), siendo la sodio dependencia (Na dep) calculada como la diferencia entre los valores de Na y Cho. Se representa la media  $\pm$  SEM de las seis réplicas analizadas por condición.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió realizar otros ensayos de transporte, en este caso una vez que las células llegaron a confluencia. La confluencia celular ha demostrado ser un factor determinante en la diferenciación celular de líneas de hepatocarcinoma (Butura et al. 2004) y además existen varios ejemplos de proteínas que se modulan por los niveles de diferenciación, factor que se altera en procesos tumorales o de cultivo en placa. Un ejemplo son los hCNTs pero existen otros casos como la proteína GLUT2, siendo su expresión específica de células parenquimales diferenciadas (Del Santo et al. 2001). Se escogieron tres tiempos diferentes, 2, 4 y 7 días post-confluencia y los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores. En este caso tampoco se consiguieron niveles de actividad de hCNT2 altos (Figura 12).

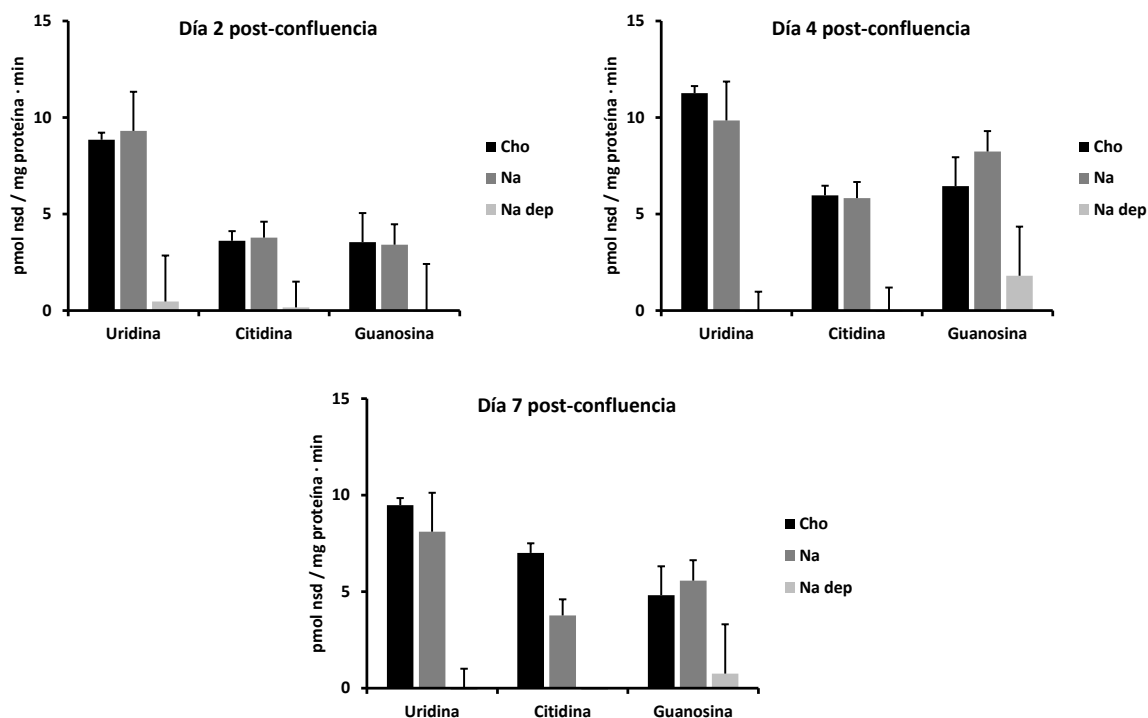


Figura 12. **Actividad de transporte dependiente de sodio en la línea THLE-2.** Se realizaron los ensayos de transporte a 2, 4 y 7 días post-confluencia a un minuto con uridina, citidina o guanosina tritadas. El transporte se realizó en medio colina (Cho) o sodio (Na), siendo la sodio dependencia (Na dep) calculada como la diferencia entre los valores de Na y Cho. Se representa la media  $\pm$  SEM de las seis réplicas analizadas por condición.

La actividad del transportador hCNT2 parecería ser dependiente de la confluencia celular pero en ninguna condición se consiguieron niveles relativamente altos y estables como para que esta línea celular sea un buen modelo representativo de la actividad de hCNT2.

### 1.1.3 Líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma humano (BCLC)

Las líneas tumorales BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) fueron establecidas a partir de hepatocarcinomas humanos y gentilmente cedidas por el Dr. Jordi Bruix (Hospital Clínic-IDIBAPS & CIBERehd). Los experimentos realizados en esta tesis se han llevado a cabo con dos líneas BCLC, en concreto la líneas BCLC-3 y BCLC-5. Ambas presentan una morfología epitelial, la capacidad de formar esferoides y son negativas para c-myc y no tienen p53 mutado. No retienen la expresión de hCNT2 ni a nivel de mensajero ni de proteína además de no tener actividad de transporte concentrativo (Tesis doctoral

Lorena Medina Pulido) por lo que resultan ser un buen modelo en el que restituir la expresión del transportador y analizar sus efectos en el metabolismo tumoral. Experimentos previos en estas líneas mostraron diferencias en metabolitos concretos implicados en la glucólisis después de restituir la función de hCNT2 con un vector adenoviral (Tesis Lorena Medina Pulido). Estas diferencias podían sugerir un metabolismo tumoral más acoplado a la fosforilación oxidativa cuando hCNT2 se expresa en comparación con las células que carecen de dicha expresión, en las cuales predominaría un mayor efecto Warburg. Por todo ello los experimentos relacionados con el metabolismo celular se han llevado a cabo en estos modelos celulares, restituyendo la expresión de hCNT2 por medio de vectores adenovirales.

### **1.2 Estudio de la regulación de la proteína hCNT2**

Los transportadores de nucleósidos se encuentran regulados por diferentes factores tanto a nivel transcripcional como post-traducciona. El estudio de la regulación de hCNT2 se ha centrado en dos principales aspectos que regulan el metabolismo celular: los niveles de oxígeno y las vías metabólicas de producción de energía a partir de los sustratos glucolíticos a los que las células tienen acceso (Denko 2008). Estos factores condicionan el cambio metabólico durante la transformación celular y pueden estar regulando la actividad o expresión del transportador. Además, estas condiciones experimentales serán necesarias más adelante para modular el metabolismo energético y evaluar el posible papel que juega el transportador hCNT2 en el metabolismo tumoral.

#### **1.2.1 Regulación de hCNT2 por hipoxia**

Por lo general, los niveles de oxígeno a los que las células tumorales tienen acceso son realmente bajos por lo que se considera que la proliferación y supervivencia de estas células se da en condiciones de hipoxia (Denko 2008). La ausencia de oxígeno regula una amplia variedad de genes y a su vez condiciona el metabolismo energético tumoral con la disminución de la fosforilación oxidativa y aumento de la glucólisis (Ros & Schulze 2013). Para analizar si la expresión y actividad de hCNT2 es susceptible de

regularse por los niveles de oxígeno, se analizaron los niveles de expresión y actividad de este transportador en las líneas BCLC-3 y BCLC-5.

En primer lugar, se quiso analizar si los niveles endógenos del transportador podían verse afectados por los niveles de oxígeno, analizando su expresión en condiciones de hipoxia (1% oxígeno) en comparación con aquellas células que se mantuvieron en condiciones de normoxia (21% oxígeno). Cabe destacar que, como se ha mencionado anteriormente, los niveles de expresión de los transportadores de nucleósidos concentrativos en este modelo celular son realmente bajos. Aun así, la expresión de hCNT2 parece verse modulada en la línea BCLC-5 por los niveles de oxígeno, observándose un aumento en la expresión basal del transportador en condiciones de hipoxia (Figura 13).

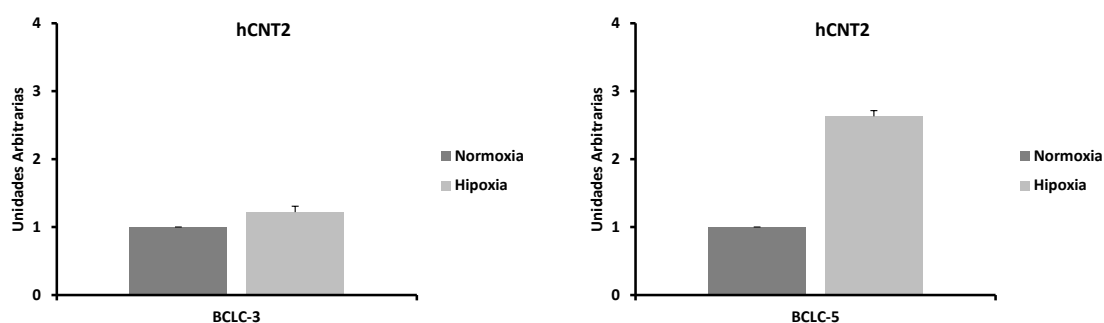


Figura 13. **Modulación de la expresión endógena del transportador hCNT2 por los niveles de oxígeno en las líneas celulares BCLC-3 y BCLC-5.** Las células se sembraron y 24 horas después se mantuvieron en presencia de 21% de oxígeno (Normoxia) o 1% de oxígeno (Hipoxia) durante 48 horas, momento en el que se analizaron las muestras por *Real Time* PCR. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes.

A continuación, se analizaron en estas mismas condiciones los niveles de expresión de hCNT2 restituido por medio de un vector adenoviral. La expresión de este último se encuentra bajo un promotor fuerte y no se espera que se regule a nivel transcripcional. En el control de transducción (AdControl), donde solo se detecta la expresión endógena de hCNT2, se observó de nuevo un aumento de la expresión del transportador en ambas líneas celulares mantenidas en hipoxia mientras que los niveles obtenidos con AdhCNT2 mostraron unos valores similares entre condiciones (Figura 14).

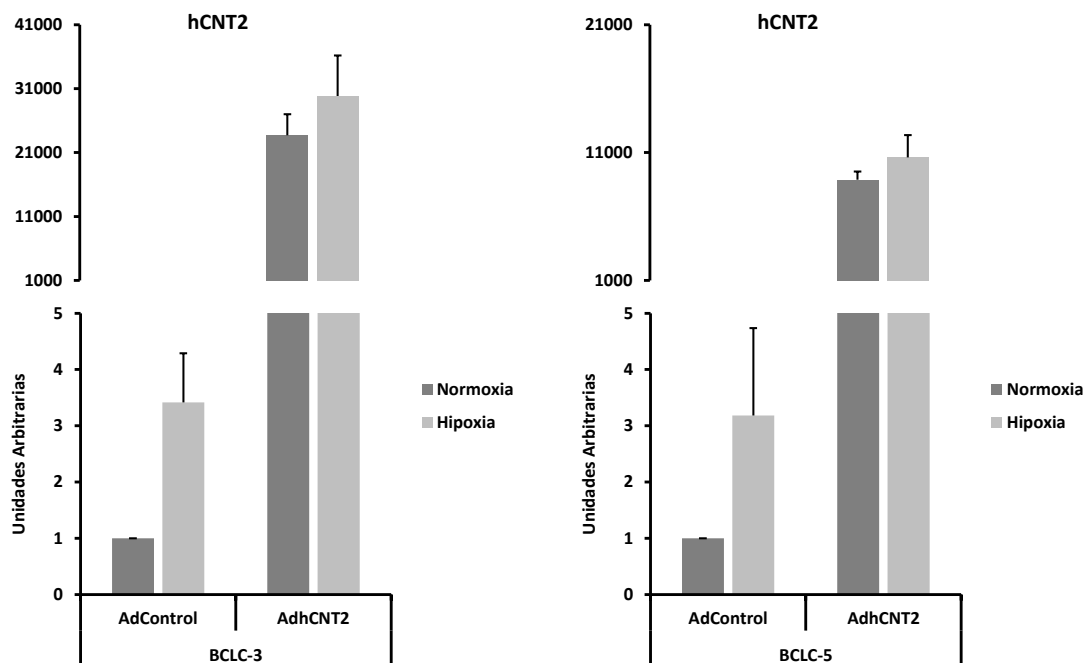


Figura 14. **Modulación de la expresión del transportador AdhCNT2 por los niveles de oxígeno en las líneas celulares BCLC-3 y BCLC-5.** Las células se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector de hCNT2 (AdhCNT2) y se mantuvieron en presencia de 21% de oxígeno (Normoxia) o 1% de oxígeno (Hipoxia) durante 48 horas, momento en el que se analizaron las muestras por *Real Time* PCR. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes.

Para comprobar si esta regulación se traduce en cambios a nivel de actividad del transportador, se realizaron ensayos de transporte a dos tiempos diferentes de cultivo en condiciones de hipoxia, durante 90 minutos o 48 horas. Se escogió un tiempo corto para analizar los posibles cambios rápidos sobre la actividad del transportador a nivel de proteína y un tiempo más largo, donde los efectos de la hipoxia podrían ser tanto a nivel de proteína como a nivel transcripcional. La actividad basal del transportador en la condición AdControl tanto a 90 minutos (Figura 15A) como a 48 horas (Figura 15B) resultó ser extremadamente baja por lo que el aumento observado anteriormente en los niveles de mensajero de hCNT2 a 48 horas no se tradujo en un aumento de actividad. Por lo tanto, se podría interpretar que los efectos que se observaron en estos ensayos son debidos exclusivamente a cambios en la actividad de la proteína transducida con el adenovirus. Así, en el cultivo bajo condiciones de hipoxia durante 48 horas, se observó una disminución de la actividad de transporte en comparación con las células mantenidas en presencia de oxígeno (Figura 15B).

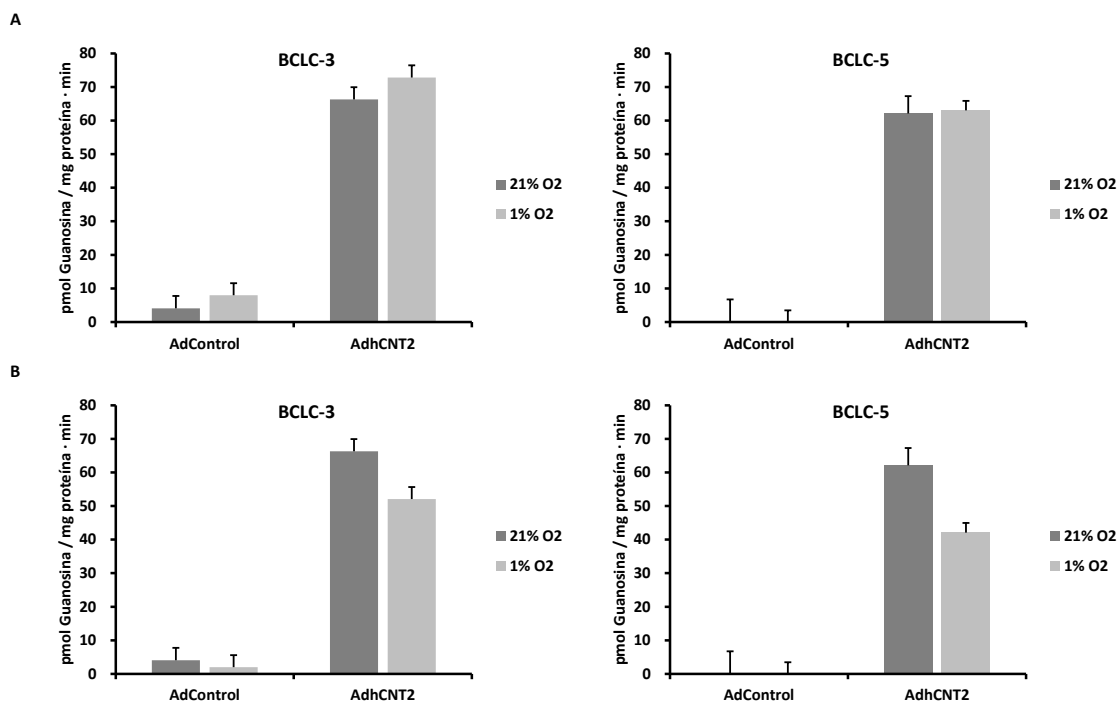


Figura 15. **Modulación de la actividad de hCNT2 por hipoxia.** Las células BCLC-3 y BCLC-5 se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral de hCNT2 (AdhCNT2) durante 48 horas momento en el cual se realizaron los ensayos de transporte a un minuto con guanosina tritiada en medio colina (Cho) o sodio (Na). Pevio al ensayo, las células se incubaron durante 90 minutos (A) o 48 horas (B) en presencia de 21% de oxígeno (Normoxia) o 1% de oxígeno (Hipoxia). Se representa la sodio dependencia (Na dep) como la diferencia entre los valores de Na y Cho. Se representa la media  $\pm$  SEM de las seis réplicas analizadas por condición.

Con estos resultados, parecería que los niveles de oxígeno tuvieran un efecto sobre la actividad de la proteína transducida con el adenovirus así como sobre la expresión de la proteína endógena. Teniendo en cuenta los cambios a nivel de expresión, no podemos descartar que hCNT2 no posea en su promotor elementos de respuesta a hipoxia y que la ausencia de oxígeno esté modulando la expresión del gen. En relación a la modulación de la actividad del transportador, está descrito que en condiciones de hipoxia e isquemia existe una disminución del transporte equilibrativo mediado por hENT1 y hENT2, siendo este un mecanismo de protección celular frente a la disminución de los niveles de oxígeno. Esta regulación de los transportadores provoca un aumento en la adenosina extracelular que a través de los receptores de adenosina tiene un efecto protector frente a estos procesos (Pastor-Anglada & Pérez-Torras 2018b). Además, en modelos neuronales se ha observado una regulación del

transportador de rCNT2 también en estas condiciones, donde su expresión se ve disminuida tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. En este caso, la disminución de los niveles de rCNT2 conlleva una disminución de los niveles de adenosina y con ello una menor activación de la vía dependiente de la quinasa de AMP (AMPK) (Medina-Pulido et al. 2013). hCNT2 es un transportador de purinas, entre ellas adenosina, por lo que la disminución en la actividad que se observa después de mantener las células 48 horas en condiciones de hipoxia podría ir relacionada con el aumento de la adenosina extracelular para contrarrestar los efectos de la ausencia de oxígeno.

### **1.2.2 Regulación de hCNT2 por sustratos glucolíticos**

Como se ha comentado en la introducción, hCNT2 interacciona con proteínas relacionadas con el metabolismo celular como Aldolasa B y los sustratos glucolíticos como la fructosa y glucosa aumentan la afinidad del transportador por sus sustratos (Huber-Ruano et al. 2010). Además, el estado energético celular se encuentra regulando la actividad de rCNT2 a través de la activación purinérgica del receptor de adenosina A1 que activa los canales de potasio sensibles a ATP que a su vez activan el transportador. Así, un aumento en los niveles extracelulares de ATP inhibiría los canales de potasio y por consiguiente también el transportador (Duflo et al. 2004). De este modo, estos resultados evidencian como el estado energético celular y por consiguiente la disponibilidad de sustratos como la glucosa se encuentra modulando la actividad de esta proteína.

Con estos antecedentes, nos planteamos analizar en nuestro modelo celular el efecto de diferentes sustratos glucolíticos sobre la actividad de hCNT2. Restituyendo la expresión del transportador, se realizaron ensayos de transporte en las dos líneas de hepatocarcinoma humano BCLC-3 y BCLC-5 en presencia de diferentes sustratos glucolíticos, o como en el caso de la glucosa, a concentraciones diferentes. Se escogió una concentración alta (25 mM) y otra baja (5,5 mM) para modular el estado energético celular, considerando el hecho de que por lo general las células se cultivan a altas concentraciones de glucosa mientras que los tumores tienen acceso a niveles menores de este sustrato. La concentración de fructosa se fijó a 2 mM porque concentraciones superiores pueden estar modificando los niveles de algunos

metabolitos, entre los que se encuentra una disminución de ATP (Huber-Ruano et al. 2010). Por último, se eligió el estímulo con galactosa a 10 mM para forzar las células a realizar fosforilación oxidativa dado que la metabolización de este sustrato por la vía de la glucólisis no produce ninguna molécula de ATP (Aguer et al. 2011). Las incubaciones se realizaron a dos tiempos diferentes, durante 90 minutos y 48 horas. Otra vez en este caso, se escogieron estos dos tiempos para poder analizar cambios rápidos a nivel post-traducciona (cambios en localización, glicosilación) así como cambios a nivel transcripcional sobre la expresión endógena del transportador o cambios a nivel proteico que requieran de más tiempo para ser llevados a cabo por la célula.

En la línea BCLC-3 transducida con el adenovirus y mantenidas en presencia de estos sustratos durante 90 minutos, se observó una disminución significativa del transporte mediado por hCNT2 en las condiciones de cultivo con 10 mM de galactosa y 2 mM de fructosa en comparación con las células en presencia de ambas concentraciones de glucosa. Esta tendencia es similar en la línea BCLC-5 pero las diferencias no fueron significativas (Figura 16A). Respecto al mantenimiento de estas células con los sustratos glucolíticos durante un total de 48 horas, las células BCLC-3 mostraron la misma tendencia que a tiempos cortos, siendo solo significativa la disminución del transporte con 2mM de fructosa en comparación con la condición de baja glucosa. En el caso de las BCLC-5, se observó una disminución significativa de la actividad de hCNT2 en presencia de 10mM de galactosa en comparación con ambas concentraciones de glucosa (Figura 16B). La actividad basal de hCNT2 en las células BCLC no se vio en ningún caso regulada por los sustratos glucolíticos (Figura 16).



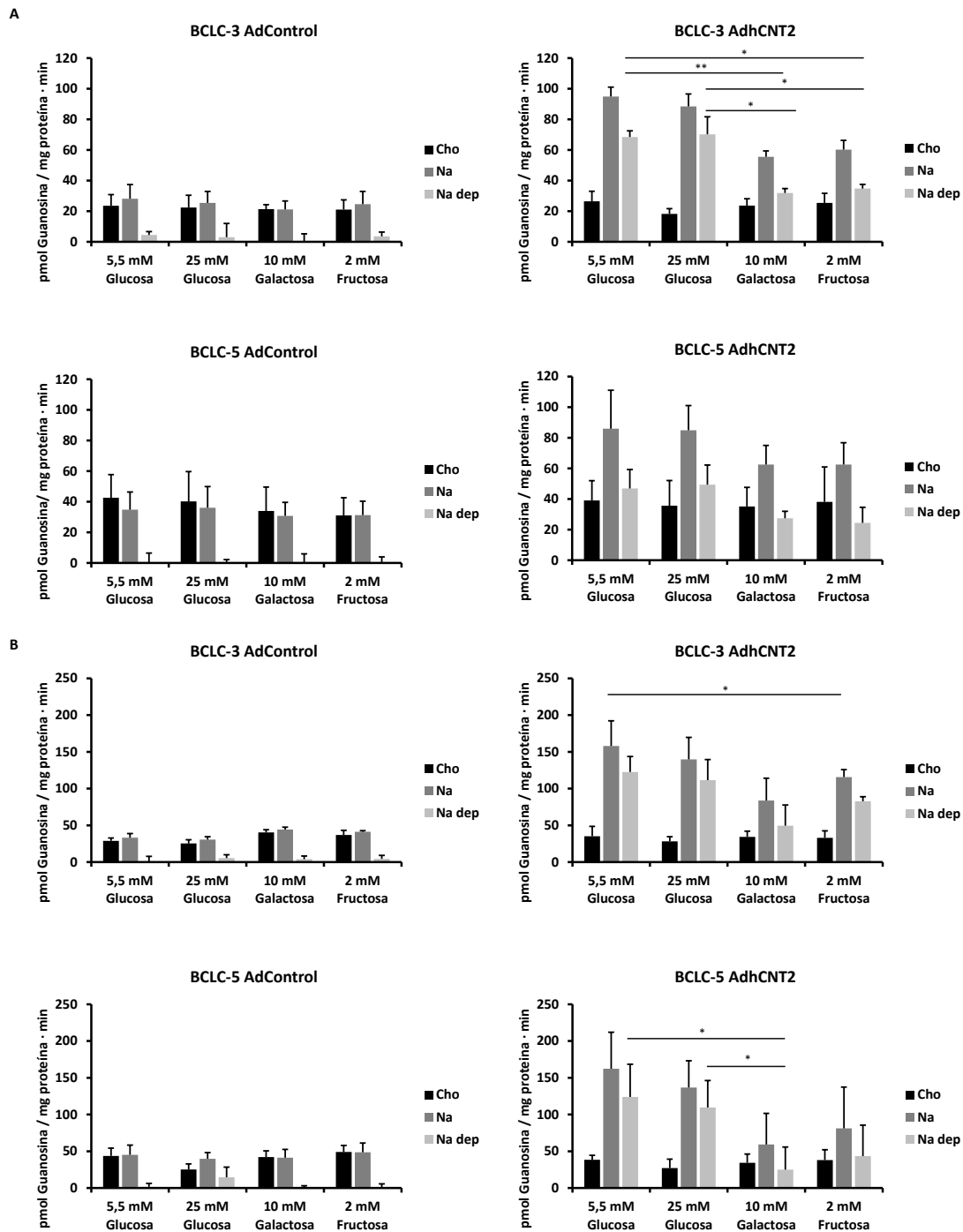


Figura 16. **Modulación de la actividad de hCNT2 por diferentes sustratos glucolíticos.** Las células BCLC-3 y BCLC-5 se sembraron y 24 horas después se infectaron con AdControl o AdhCNT2 durante 48 horas momento en el cual se realizaron los ensayos de transporte a un minuto con guanosina tritiada en medio colina (Cho) o sodio (Na). Pevio al ensayo, las células se incubaron durante 90 minutos (A) o durante 48 horas (B) con 5,5 mM de glucosa, 25 mM de glucosa, 10 mM de galactosa y 2 mM de fructosa. La sodio dependencia (Na dep) se calculó como la diferencia entre los valores de Na y de Cho. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. La significatividad estadística está valorada mediante la t-Student, siendo \*\*\* $P \leq 0,005$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$ .

Los sustratos glucolíticos pueden estar modulando la actividad del transportador por cambios a nivel transcripcional y post-traducciona l o por el contrario, esta regulación podría ser solo a nivel post-traducciona l y que el efecto se mantuviera durante el tiempo. La regulación a nivel post-traducciona l cobraría importancia debido a que los cambios observados empiezan a los 90 minutos y además, dado que el cDNA que codifica para hCNT2 expresado por el adenovirus se encuentra bajo un promotor fuerte, su expresión no estaría directamente modulada por factores de transcripción de la propia célula infectada. Por lo tanto, las diferencias solo podrían ser atribuidas a la expresión del gen de hCNT2 endógeno, y como se ha comentado anteriormente, esta expresión es realmente baja y no se ve modulada por estos factores.

Por todo esto, se decidió analizar los niveles de proteína de hCNT2 en las diferentes condiciones y además se trataron los extractos con PNGase F, un compuesto utilizado para eliminar las N-glicosilaciones de las proteínas. Los diferentes sustratos glucolíticos pueden estar modulando los niveles de glicosilación del transportador y con ello su tráfico a membrana y su actividad. Existe una disminución de los niveles proteicos de hCNT2 en las células BCLC-3 que se incubaron con fructosa y galactosa en comparación con aquellas que se mantuvieron en presencia de glucosa. Además, una vez que los extractos proteicos se trataron con PNGase F, el peso molecular de la proteína se vio disminuido, pasando de tener un peso superior a los 75 kDa a estar en torno a los 55-60 kDa (Figura 17).

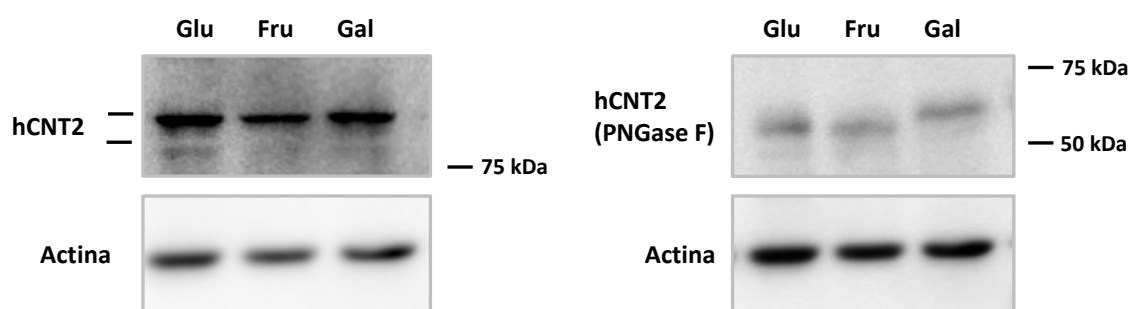


Figura 17. **Modulación de la glicosilación de la proteína hCNT2 en la línea BCLC-3 por diferentes sustratos glucolíticos.** Las células se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT2 (AdhCNT2). Se mantuvieron con 25 mM de glucosa, 10 mM de galactosa y 2 mM de fructosa durante 48 horas. Después, se procesaron las muestras y se trataron con PNGaseF. Glu: Glucosa. Fru: Fructosa. Gal: Galactosa.

Este cambio en el peso molecular nos evidenció el hecho de que hCNT2 presenta residuos susceptibles de N-glicosilarse. De todas maneras, no se puede descartar que existan otro tipo de modificaciones dado que el peso molecular de la proteína en las diferentes condiciones no resulta ser igual, teniendo un peso molecular ligeramente superior a 55 kDa en el tratamiento con galactosa (Figura 17). Es por ello que no se descarta que la proteína esté sufriendo otras modificaciones, como la O-glicosilación.

Por lo general, las proteínas necesitan modificaciones post-traduccionales para llevar a cabo su correcta función. En concreto, la glicosilación es una modificación que regula el correcto plegamiento de las proteínas así como su correcto tráfico y actividad (Helenius & Aebi 2017). Defectos en estas funciones son los responsables de muchas enfermedades genéticas (Jaeken & Matthijs 2007). Utilizando dos programas de predicción de N y O-glicosilaciones (NetNGlyc 1.0 Server y NetOGlyc 4.0 Server, respectivamente), se identificaron diferentes residuos extracelulares de la proteína que son susceptible de sufrir estas modificaciones. Además, recientemente se ha descrito que la N-glicosilación del residuo Asn<sup>48</sup> de hENT1 es necesario para la correcta función, localización y oligomerización del transportador (Bicket & Coe 2016) y que la actividad transportadora de hCNT1 se ve modulada por las N-glicosilaciones que presenta la proteína (manuscrito en revisión). En base a lo expuesto, parece ser que la actividad del transportador hCNT2 se ve modulada por diferentes sustratos glucolíticos y además estos tienen un impacto sobre las modificaciones post-traduccionales de la proteína. Este cambio en los niveles de glicosilación puede estar interfiriendo en el correcto tráfico de la proteína hacia la membrana plasmática celular con la consiguiente disminución de su actividad.

### **1.3 Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 en el metabolismo energético de la célula tumoral**

Los antecedentes mencionados previamente que parecen indicar una relación entre el transportador y el metabolismo energético nos llevaron a evaluar su probable papel como regulador del metabolismo considerando que la disminución de la expresión en tumores humanos podría estar contribuyendo al cambio de fenotipo metabólico tumoral durante la transformación neoplásica.

Las células tumorales presentan elevadas tasas de glucólisis que permiten el aumento de la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, esenciales para la proliferación celular (Vander Heiden & DeBerardinis 2017). Así, su metabolismo energético reside principalmente en la conversión del piruvato hacia la formación de lactato, con la consiguiente disminución de la fosforilación oxidativa y de los niveles de ATP (Solaini et al. 2010).

Dada la amplia versatilidad metabólica de las células parenquimales hepáticas (hepatocitos) y la pérdida de expresión y actividad de esta proteína en las líneas celulares derivadas de tumores, se decidió analizar el impacto metabólico de la restitución de hCNT2 en las líneas celulares BCLC-3 y BCLC-5.

#### **1.3.1 Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 en los niveles de lactato y ATP**

Los niveles de lactato producido por las células así como la concentración intracelular de ATP son un reflejo del estado energético celular y de la actividad de las vías glucolíticas. De este modo, el aumento en los niveles de lactato junto con la disminución de los niveles de ATP son un indicador del efecto Warburg (Naifeh & Bhimji 2018). Las células tumorales se caracterizan por presentar elevadas tasas de glucólisis que permiten la biosíntesis de macromoléculas y lípidos a expensas de la disminución de la fosforilación oxidativa (Vander Heiden & DeBerardinis 2017).

En base a nuestra hipótesis, la presencia de hCNT2 junto con la interacción con Aldolasa B estaría favoreciendo un metabolismo más acoplado a la fosforilación oxidativa y por tanto una disminución del efecto Warburg. Aldolasa B se expresa

preferentemente en hepatocitos por lo que estas líneas celulares son un buen modelo para llevar a cabo los experimentos de sobreexpresión. Los niveles de expresión para esta proteína parecen ser diferentes dependiendo del origen celular, presentando niveles mayores los hepatocitos no tumorales humanos y niveles indetectables la línea BCLC-12 (línea celular derivada de colangiocarcinoma humano). En cambio, las células BCLC-3 y BCLC-5 presentaron niveles inferiores respecto a los hepatocitos pero todavía mantuvieron niveles perfectamente detectables de mRNA para esta proteína (Figura 18).

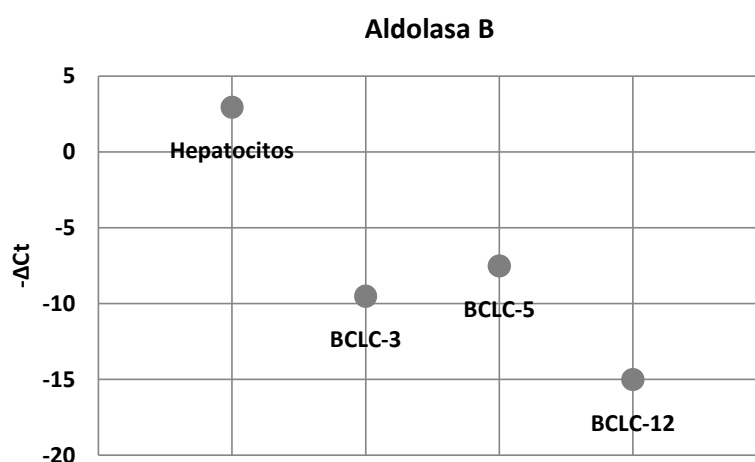


Figura 18. Niveles de expresión de Aldolasa B determinados por *Real Time* PCR en hepatocitos humanos, las líneas BCLC-3 y BCLC-5 y la línea BCLC-12. Los valores de Ct obtenidos han sido normalizados respecto al control endógeno (GAPDH) y relativizados a los niveles de expresión de los hepatocitos. Se representa la media ± desviación estándar de las dos réplicas analizadas por condición.

Los experimentos de producción de lactato y ATP se realizaron con diferentes sustratos glucolíticos que se utilizaron por un lado para analizar el efecto del transportador en diferentes contextos energéticos celulares y por otro para modular la actividad de hCNT2. En primer lugar, se determinó el impacto de estos sustratos sobre la viabilidad celular a tiempos largos. Así, se incubaron las células BCLC en su medio de mantenimiento DMEM F12 (17,5 mM de glucosa) y se comparó la viabilidad celular con las células incubadas en medio DMEM, medio que nos permite variar los niveles de los sustratos glucolíticos. El cultivo entre la condición control y el medio más parecido a este, DMEM+17,5 mM de glucosa, no reveló diferencias significativas entre condiciones en ninguna de las dos líneas celulares. Por otro lado, la línea BCLC-3 no

mostró ninguna diferencia clara entre los diferentes sustratos glucolíticos mientras que en la línea BCLC-5 se observó una ligera disminución de la viabilidad celular en las células mantenidas con galactosa (Figura 19). La galactosa estaría provocando un cambio en el perfil de las vías para la obtención de energía, dado que su metabolización por la vía de la glucólisis no produce ninguna molécula de ATP y la energía solo se puede obtener por la fosforilación oxidativa (Aguer et al. 2011). De este modo las células BCLC-5 parecerían ser más dependientes de la glucólisis o menos eficientes en dirigir la fosforilación oxidativa hacia la producción de ATP.

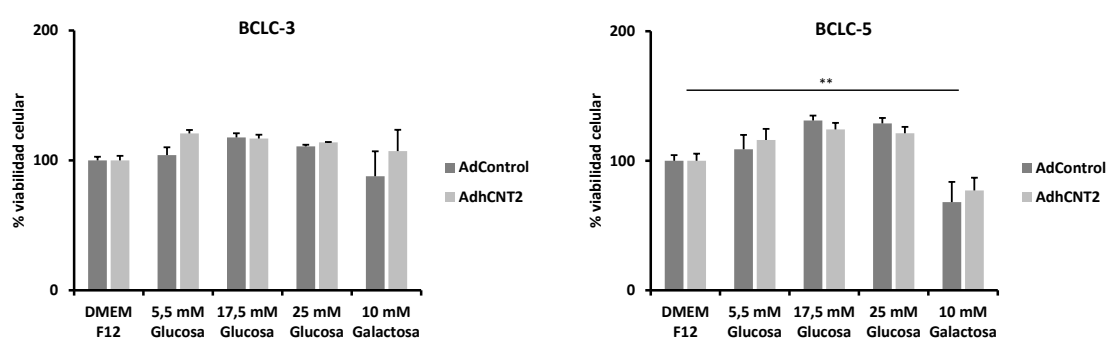


Figura 19. **Efecto sobre la viabilidad celular de los diferentes sustratos glucolíticos.** Las células BCLC-3 y BCLC-5 se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector de hCNT2 (AdhCNT2) y se incubaron en medio control (DMEM F12), medio a baja (5,5 mM), media (17,5 mM) o alta (25 mM) concentración de glucosa o con galactosa (10 mM). Después de 72 horas se realizó el ensayo de MTT. Se representa la media  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad estadística está valorada mediante la t-Student, siendo \*\*\* $P \leq 0,005$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$ .

Los niveles de lactato se determinaron mediante ensayos enzimáticos con o sin adición de sustratos glucolíticos y se determinaron a dos tiempos diferentes de acúmulo, un tiempo corto de 90 minutos y uno más largo de 24 horas. Estos tiempos permiten que el sistema no se vea saturado por la concentración de lactato y que se maximicen las diferencias entre condiciones. Además el tiempo de estímulo con los diferentes sustratos glucolíticos coincide con los tiempos de acúmulo.

Se observó una tendencia a la disminución de los niveles de lactato cuando se restituyó la expresión de hCNT2 en las células BCLC-5 a 90 minutos de acúmulo (Figura 20A) en las condiciones de alta glucosa, galactosa y fructosa mientras que no se observaron diferencias en la línea BCLC-3. Respecto al acúmulo de lactato durante 24 horas, se

observó una disminución de los niveles de lactato en las células transducidas con el vector de hCNT2 en la condición de baja concentración de glucosa (Figura 20B). Además, mientras que las células BCLC-3 disminuyeron la producción de lactato en presencia de galactosa, no fue así para las células BCLC-5, las cuales mantuvieron los mismos niveles que en las demás condiciones a excepción de las células con AdhCNT2, donde se observó una disminución (Figura 20B). Este resultado concuerda con el análisis de viabilidad celular y parecería que estas células control en presencia de galactosa no son capaces de reducir los niveles de lactato y dirigir su metabolismo hacia la fosforilación oxidativa.

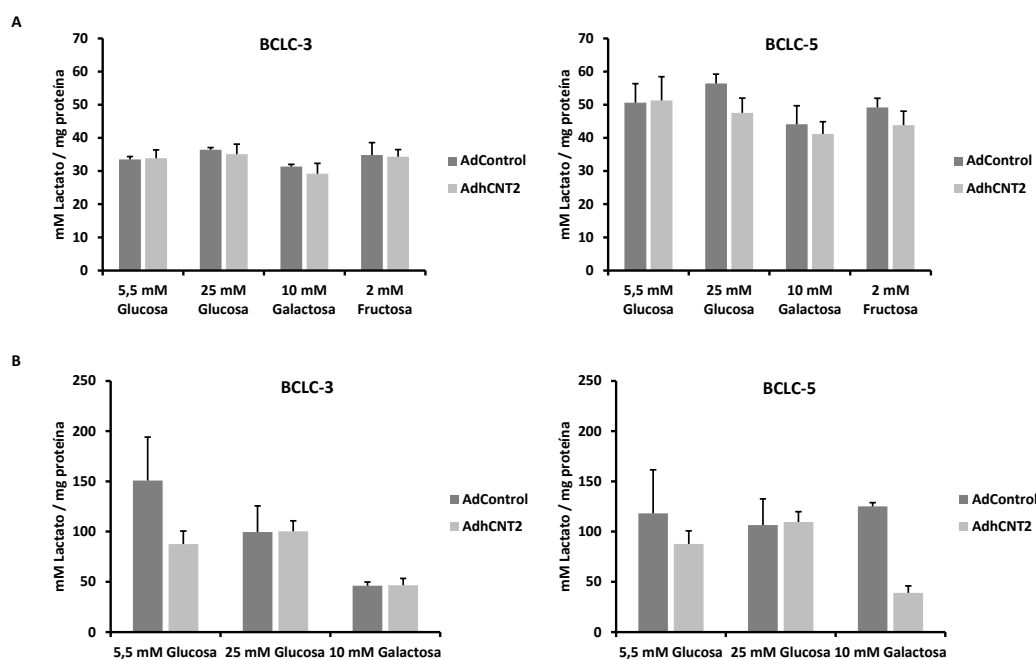


Figura 20. **Efecto de hCNT2 en la producción de lactato.** Las células BCLC-3 y BCLC-5 se sembraron y 24 horas después se infectaron con AdControl o AdhCNT2. 48 horas después se incubaron con los diferentes sustratos glucolíticos (5,5 mM, 25 mM de glucosa, 10 mM de galactosa o 2 mM fructosa) durante 90 minutos (A) o 24 horas (B) y se analizó durante estos tiempos el acúmulo de lactato. Se representa la media  $\pm$  SEM (n=3, A; n=2, B).

Las células en cultivo derivadas de tumores mantienen los cambios metabólicos porque estos vienen dados de manera estable por cambios génicos o epigenéticos. Así, en condiciones de normoxia las células tumorales siguen realizando la glucólisis aeróbica. En base a estos resultados y a la vista de que estas células parecen no tener un metabolismo exclusivamente glucolítico, se decidió analizar los niveles de lactato

bajo condiciones de hipoxia con el fin de potenciar el efecto Warburg, esta vez en ausencia de sustratos glucolíticos. En estos experimentos preliminares, se observó un aumento en la producción de lactato en las células cultivadas en hipoxia a tiempos largos en comparación con las células que crecen en normoxia (Figura 21B, C). Esto nos evidenció el aumento esperado de la glicólisis en respuesta a la disminución de oxígeno. De todas maneras, no se observó ningún efecto significativo de las células infectadas con AdhCNT2 en relación a la disminución de la producción de lactato en las diferentes condiciones (Figura 21). El experimento también se realizó a un tiempo más corto, incubando las células 90 minutos en hipoxia pero en este caso no se evidenció un aumento en la producción de lactato en comparación con las células cultivadas en normoxia (Figura 21A).

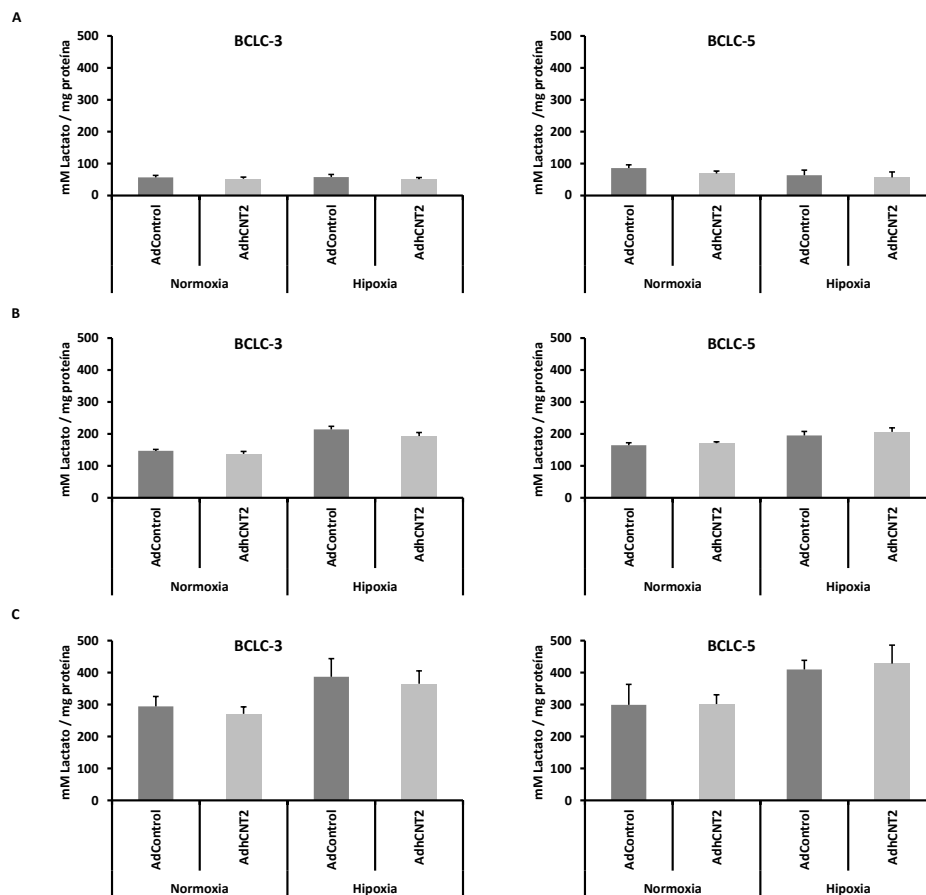


Figura 21. **Efecto de hCNT2 en la producción de lactato bajo condiciones de hipoxia.** Las células BCLC-3 y BCLC-5 se sembraron y 24 horas después se infectaron con AdControl o AdhCNT2. 48 horas después se mantuvieron en hipoxia durante 90 minutos (A) o 24 horas (B) o después de la infección se mantuvieron en hipoxia durante 48 horas (C), tiempo en el que se midió el acúmulo de lactato. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de las cuatro réplicas analizadas por condición.



Los tumores y sus líneas celulares derivadas presentan diferentes fenotipos metabólicos siendo más o menos dependientes de la glucólisis (Jose et al. 2011). Además, la tasa glucolítica de las células en cultivo es un reflejo de su capacidad de invasividad. Por ejemplo la línea MCF-7 de cáncer de mama no invasivo posee un menor consumo de glucosa en condiciones aeróbicas en comparación con la línea MDA-MB-231 derivada de cáncer de mama invasivo (Gatenby & Gillies 2004). En nuestro modelo celular, el cultivo en hipoxia causó un aumento en la producción de lactato, reflejo de que estas líneas presentan un metabolismo no solo basado en la glucólisis cuando se cultivan en normoxia.

Respecto a los niveles de ATP intracelulares, en la línea BCLC-3, el estímulo con galactosa y fructosa aumentó los niveles de ATP, hecho que se relaciona con el aumento de la fosforilación oxidativa. En cambio, estos dos sustratos glucolíticos no tuvieron ningún efecto en la línea BCLC-5. Además, parecería que hCNT2 no tuviera un efecto claro en modular el estado energético celular (Figura 22).

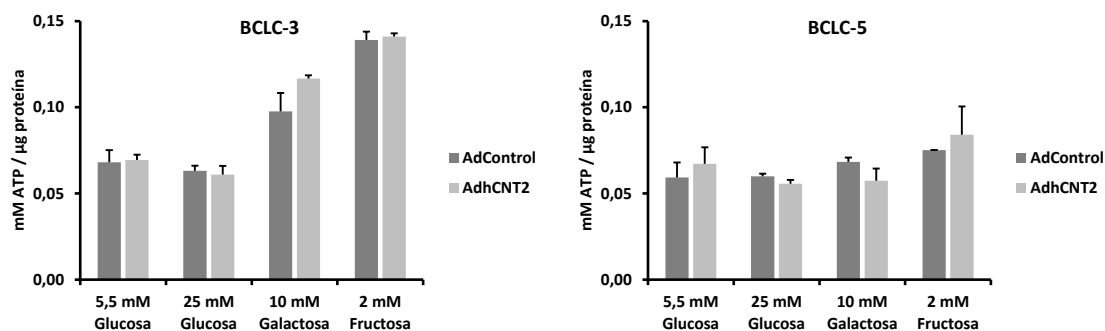


Figura 22. **Efecto de hCNT2 en los niveles intracelulares de ATP.** Las células BCLC-3 y BCLC-5 se sembraron y 24 horas después se infectaron con AdControl o AdhCNT2. 48 horas después se incubaron con los diferentes sustratos glucolíticos (5,5 mM, 25 mM de glucosa, 10 mM de galactosa o 2 mM fructosa) durante 90 minutos momento en el que se determinó la concentración de ATP intracelular. Se representa la media  $\pm$  SEM (n=3).

Se analizaron por último los niveles de ATP intracelulares durante un estímulo corto de hipoxia (90 minutos) y un tiempo más largo (48 horas). No se observaron diferencias entre los niveles de ATP en las células mantenidas en condiciones de normoxia o hipoxia así como tampoco se observaron diferencias entre las células en las que se restituyó la expresión del transportador hCNT2 o las células que carecen de dicha expresión (Figura 23).

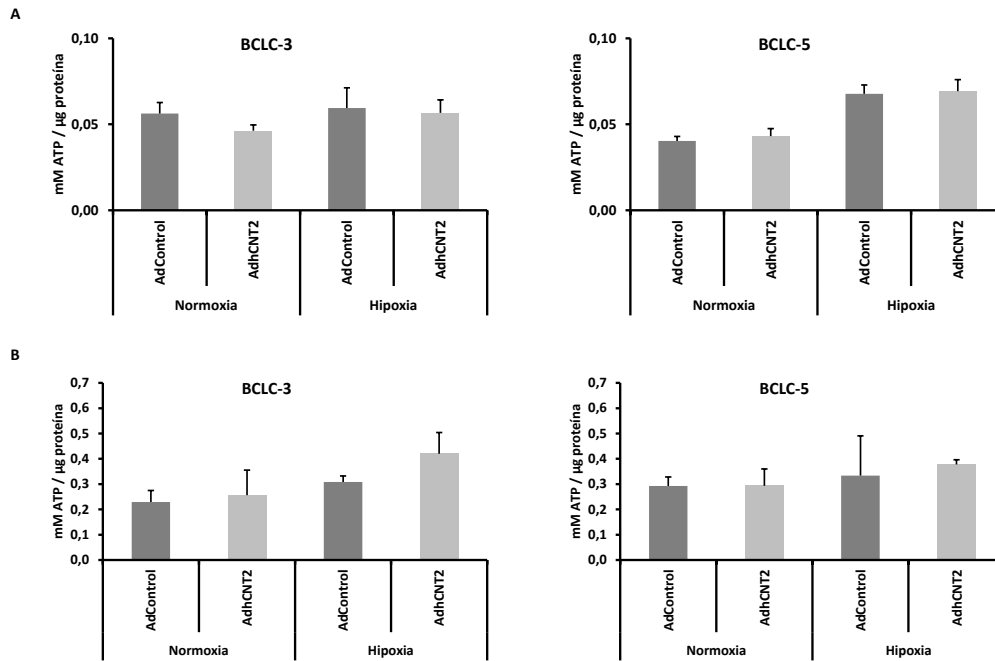


Figura 23. **Efecto de hCNT2 en los niveles intracelulares de ATP.** Las células BCLC-3 y BCLC-5 se sembraron y 24 horas después se infectaron con AdControl o AdhCNT2. 48 horas después se mantuvieron en hipoxia durante 90 minutos (A) o después de la infección se mantuvieron en hipoxia durante 48 horas (B), tiempo en el que se determinó la concentración de ATP intracelular. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de las cuatro réplicas analizadas por condición.

Dado que estas dos líneas celulares no tienen un metabolismo exclusivamente glucolítico, se esperaría una caída en los niveles intracelulares de ATP cuando estas células se cultivan en condiciones de hipoxia. En cambio, en la línea BCLC-5 se observó una pequeña tendencia al aumento de los niveles de ATP cuando las células se someten a un estímulo corto de hipoxia. De todas maneras, los cambios producidos por los niveles de oxígeno, como se ha visto en el caso del lactato, parecen darse a tiempos más largos. Aun así, los niveles de ATP detectados durante 48 horas, no sugieren ningún cambio entre condiciones.

### 1.3.2 Efecto de los inhibidores 3PO, Cerulenina y Oxamato

Los subtipos de adenocarcinoma ductal pancreático se han podido clasificar en base a su perfil metabólico y por lo tanto a la respuesta de las células a diferentes inhibidores de la glucolisis, inhibidores de la síntesis de lípidos así como del metabolismo de la glutamina (Daemen et al. 2015). Cogiendo como referencia esta estrategia, se decidió

analizar el efecto del compuesto 3PO, inhibidor del enzima de la glucólisis Fosfofructoquinasa/fructosa-bifosfatasa 3 (PFKFB3), del Oxamato, inhibidor de la lactato deshidrogenasa (LDH) y de la Cerulenina, inhibidor de la Acetil CoA carboxilasa (ACC) en las dos líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma humano BCLC comparando el efecto en la viabilidad celular de estos inhibidores cuando las células expresan hCNT2 en comparación con aquellas que carecen de dicha expresión. En estos experimentos de viabilidad celular no se vieron diferencias entre estas dos condiciones lo que sugeriría que la presencia de hCNT2 no confiere una ventaja frente a la inhibición de la glucólisis aeróbica (Figura 24).

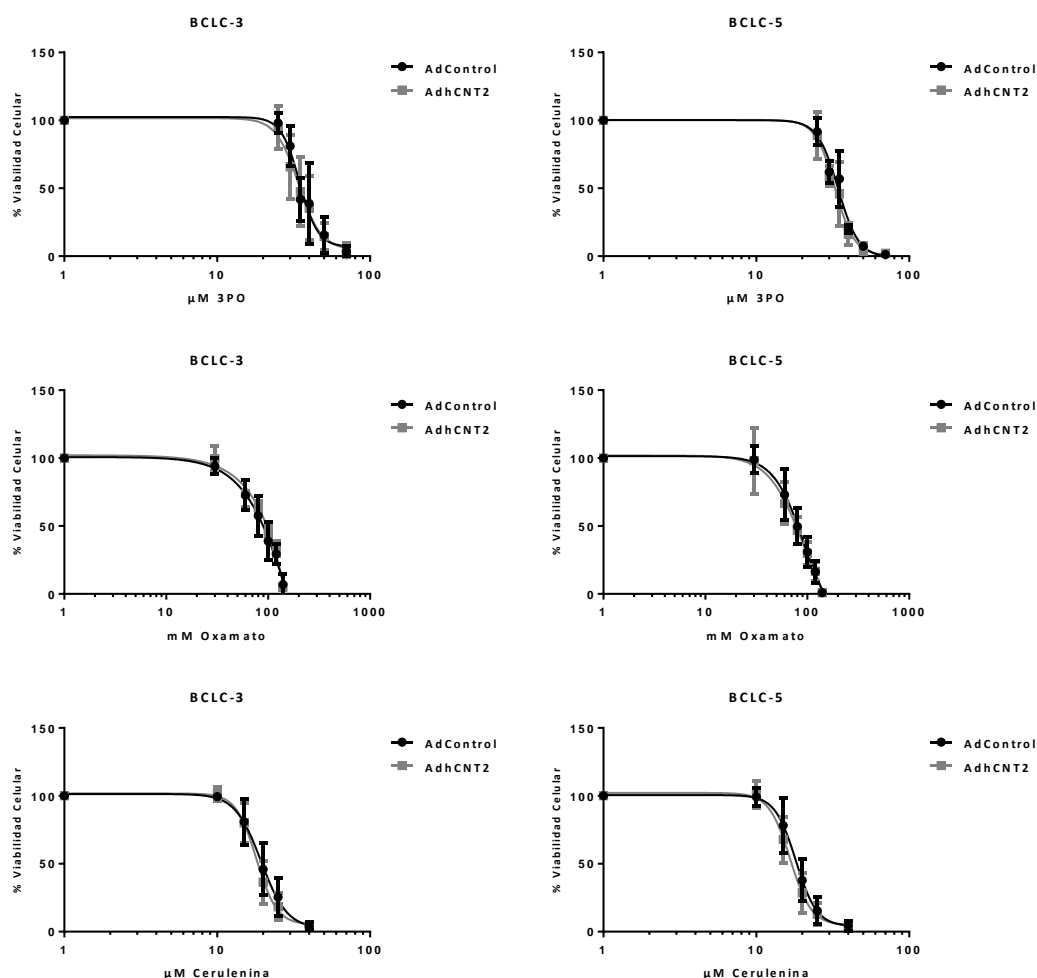


Figura 24. Efecto sobre la viabilidad celular de los inhibidores 3PO, Oxamato y Cerulenina. Las células BCLC-3 y BCLC-5 se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT2 (AdhCNT2) y se trataron a diferentes concentraciones de 3PO, Oxamato y Cerulenina durante 72 horas. Después de 72 horas se realizó el ensayo de MTT. Se representa la media  $\pm$  SEM (n=3).

### 1.3.3 Análisis mediante *microarray* de los efectos de la sobreexpresión de hCNT2

Como hasta el momento los cambios observados no eran concluyentes decidimos llevar a cabo un estudio más general del impacto de la restitución de la expresión del transportador hCNT2 en las líneas BCLC-3 y BCLC-5 y para ello se analizaron los efectos de dicha restitución a nivel transcripcional mediante un análisis de *microarray*. Las células BCLC se infectaron con AdhCNT2 o AdControl durante 48 horas y por Real Time PCR se confirmó la eficiencia de la transducción (Figura 25). En los tres experimentos independientes se obtuvieron unos niveles altos de expresión del transportador, siendo la sobre-expresión relativa ligeramente superior en las células BCLC-5. Esto puede ser debido al hecho de que las células BCLC-3 presentan niveles basales más altos respecto a las células BCLC-5.

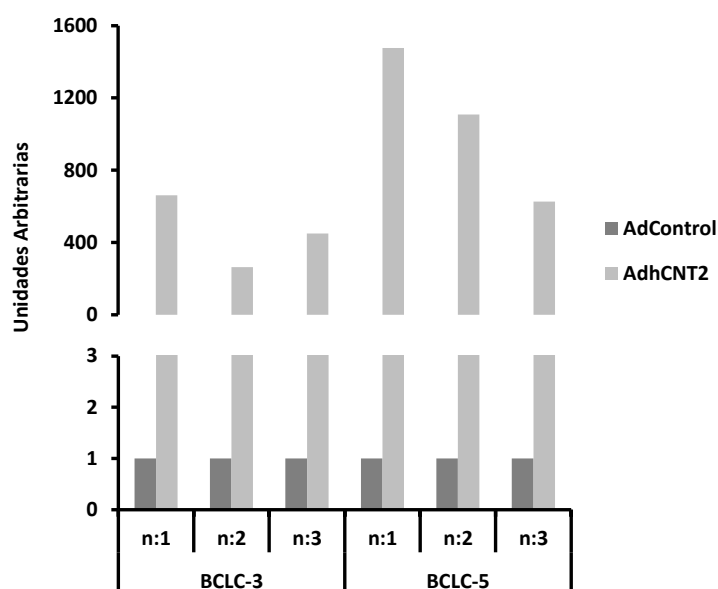


Figura 25. Niveles de expresión de hCNT2 obtenidos después de la transducción con AdhCNT2 en las líneas celulares BCLC-3 y BCLC-5. Las células se sembraron y 24 horas después se infectaron con AdControl o AdhCNT2 a 10 MOI durante 48 horas. Después, se procesaron las muestras y se analizaron por *Real Time* PCR. Se representan 3 experimentos independientes (n:1, n:2, n:3).

Posteriormente, se realizó el análisis de las muestras por *microarray* utilizando el *array* de Illumina *Human HT-12 V4 Bead Chip* y se realizó el análisis computacional de los resultados obtenidos. El análisis demostró un ligero impacto por la restitución de hCNT2 a nivel transcripcional, con aproximadamente cambios en alrededor de 100

genes. Cabe destacar que el mismo experimento se realizó con AdhCNT1, donde se obtuvieron cambios de expresión en alrededor de 2000 genes.

En la Figura 26 se muestra el *heatmap* de los 50 genes con mayores cambios en sus niveles de expresión. El análisis se llevó a cabo teniendo en cuenta un valor de significatividad de  $p < 0.005$  y un FC (*Fold Change*)  $> \pm 1.1$ .

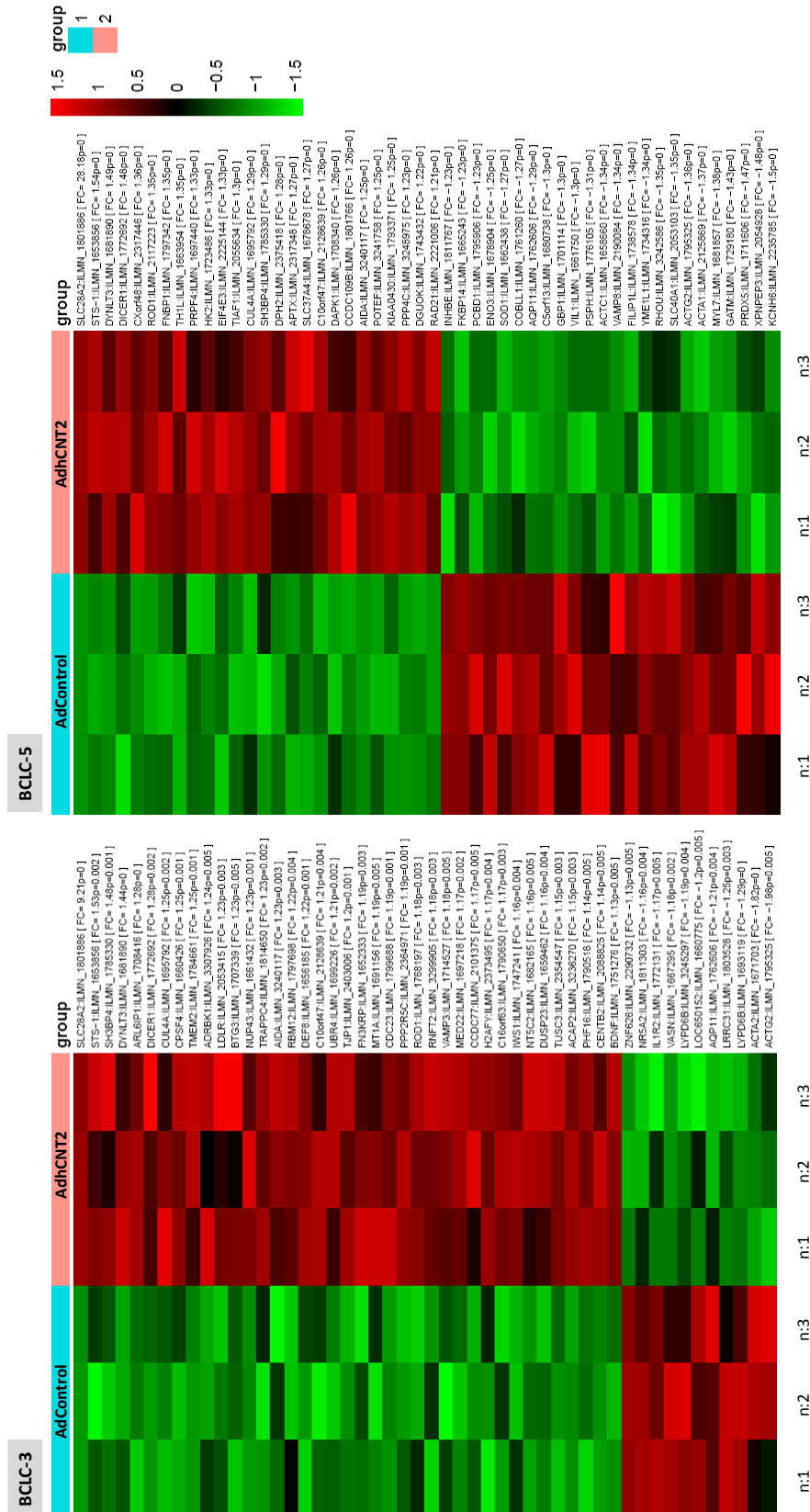


Figura 26. **Heatmap** de los primeros 50 genes con cambios significativos en su expresión después de la restitución de la expresión de hCNT2 en las líneas BCLC-3 y BCLC-5. La intensidad de los colores refleja el grado de cambio. Cada columna corresponde con uno de los 3 experimentos independientes.

En el caso de las BCLC-3, se observó un mayor número de genes regulados positivamente por la restitución de la expresión de hCNT2 mientras que en las células BCLC-5 el impacto fue similar entre los genes regulados negativa y positivamente (Figura 26).

Un análisis más restrictivo de los cambios considerando un  $FC > \pm 1.25$  demostró un total de 24 genes significativamente regulados en la línea BCLC-3 y 97 en la línea BCLC-5, de los cuales 12 fueron comunes entre ambas (Figura 27). La sobre-expresión de hCNT2 no tuvo un gran impacto a nivel transcripcional y los mayores cambios se observaron en la línea BCLC-5, en la cual se consiguieron los valores más altos de expresión del transportador.

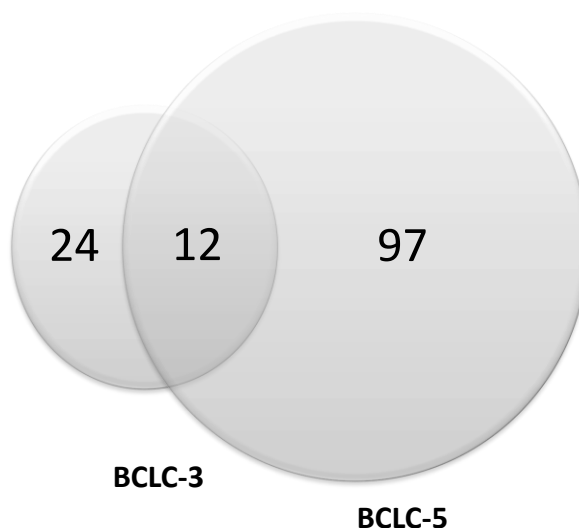


Figura 27. **Diagrama de Venn de los cambios génicos significativos en las líneas BCLC-3 y BCLC-5.** Se muestran los genes significativamente regulados con un  $p$ -valor  $< 0.005$  y un  $FC > \pm 1.25$ .

Debido a que los cambios observados englobaban pocos genes y las vías de señalización analizadas se encuentran enriquecidas por un número pequeño de genes, se analizaron los cambios a través de la herramienta bioinformática GO (*Gene Ontology*), la cual permite analizar los cambios asociados a procesos biológicos.

Los procesos biológicos que se encuentran modulados de manera más significativa por la restitución de la expresión de hCNT2 estarían relacionados con el metabolismo

celular y engloban el metabolismo de glucosa, lípidos y purinas. En la línea BCLC-3, además, se encuentran reguladas positivamente vías relacionadas con el ciclo celular, la reparación y replicación del DNA.

Respecto al metabolismo de glucosa, la línea BCLC-3 tiene regulados positivamente genes relacionados con su transporte y metabolización. Entre estos encontramos los genes *SLC2A1* y *SLC2A2* que codifican para las proteínas GLUT1 y GLUT2 respectivamente. GLUT1 es la isoforma más ubicua y presenta una gran afinidad por la glucosa. Además, es el transportador de glucosa que más se expresa en los tejidos fetales y su expresión decae después de nacer, con el consiguiente aumento de otras isoformas, como GLUT2 en el hígado o GLUT4 en el músculo. La expresión de GLUT1 se ha visto aumentada en las células tumorales las cuales dependen de un mayor aporte de glucosa (Navale & Paranjape 2016; Karim et al. 2012). Además existe un aumento en la expresión del gen que codifica para la Hexoquinasa 2 (HK2) en las células donde se restituyó la expresión del transportador, enzima sobreexpresada en algunas células tumorales como las de hepatocarcinoma y que da lugar a un aumento en la metabolización de la glucosa (Patra et al. 2013; Ahn et al. 2009). Para la línea BCLC-5, se observó un aumento significativo en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de glucosa que además son comunes con la línea BCLC-3. Es así para el enzima HK2 y para los transportadores GLUT1 y GLUT2.

En relación al aumento del metabolismo de purinas, se vio un aumento de la expresión del gen *PAICS* que codifica para el enzima ADE2 y del enzima GART, ambos implicados en la síntesis *de novo* de purinas. Además la expresión del gen *GMPS* encargado de la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanina también se vio aumentado. Del mismo modo se obtuvieron cambios en el caso de la adenosina quinasa (ADK) que fosforila adenosina y de la deoxicitidina quinasa (DCK) que fosforila desoxirribonucleósidos.

Respecto a las vías de señalización con una disminución significativa de la expresión en la línea BCLC-5, estas revelaron una disminución de la síntesis de ácidos grasos insaturados y del metabolismo lipídico peroxisomal.



## 2 Estudio de hCNT1 en su papel como transceptor

La estructura de los hCNTs consiste en 11 dominios transmembrana con un dominio C-terminal extracelular y un amplio dominio intracelular N-terminal (Arimany-Nardi et al. 2017; Johnson et al. 2012). Este dominio N-terminal intracelular y los siguientes 3 dominios transmembrana no están presentes en los organismos procariotas y no son esenciales para la función transportadora (Hamilton et al. 2001). De hecho, se piensa que puedan ser una adquisición evolutiva que podría estar confiriendo a estos transportadores nuevas funciones (Pérez-Torras et al. 2013).

El dominio N-terminal de los hCNTs, según predicciones bioinformáticas, oscila entre 82 y 103 aminoácidos siendo un dominio relativamente grande dado que representa aproximadamente el 12% de los residuos de la proteína. Además este dominio no presentaría una estructura clara, tiene residuos polares y con carga lo que le confiere una relativa flexibilidad y una elevada solubilidad. Gracias a estas características, este dominio puede ser un lugar de unión con otras proteínas como es el caso de la interacción de hCNT2 con Aldolasa B y GRP58 (Huber-Ruano et al. 2010). Estas interacciones se traducen en efectos biológicos que son específicos de la unión entre ambas proteínas y que pueden ser independientes de la capacidad de internalizar sustratos por parte del transportador. Por otro lado, este dominio podría tener funciones reguladoras sobre la misma proteína, determinando su localización y distribución celular dependiendo de las modificaciones post-traduccionales que este dominio pueda sufrir (Errasti-murugarren et al. 2010; Pinilla-Macua et al. 2012).

Para el caso de hCNT1, esta proteína posee un papel clave como modulador de la biología tumoral y estas funciones son independientes de su capacidad transportadora (Pérez-Torras et al. 2013). Con el objetivo de analizar el papel del dominio N-terminal en la regulación de estos efectos biológicos y determinar si es suficiente para que la proteína ejerza de transceptor, se han llevado a cabo experimentos con proteínas quiméricas que a continuación se detallan.

## 2.1 Determinación de la función del dominio N-terminal de hCNT1 en el papel de transceptor

El Dr. Albert Viel en su trabajo de tesis doctoral creó como herramienta una serie de proteínas quiméricas que pueden permitir elucidar si las funciones adicionales de hCNT1 residen en el dominio N-terminal o si por el contrario, se necesita la proteína completa para obtener sus efectos de transceptor. Está descrito que estas proteínas quiméricas son de gran utilidad en el estudio funcional de dominios concretos de la familia SLC (Zhou et al. 2007), dentro de la cual se encuentra la familia de proteínas hCNT. Por un lado, se creó la proteína hCNT1 unida al *tag* HA y la proteína quimérica con el dominio N-terminal de hCNT1 y el cuerpo de hCNT2. Por otro lado, se crearon las proteínas quiméricas con el dominio N-terminal de hCNT2 o hCNT3 y el cuerpo de hCNT1. Además, también se creó una proteína únicamente con la región N-terminal de hCNT1 pero por el contrario, se decidió no generar la proteína hCNT1 sin su dominio N-terminal, dado que se ha visto que la información de localización de las proteínas hCNTs se encuentran en esta zona (Pinilla-Macua et al. 2012; Errasti-murugarren et al. 2010). Todos los constructos contienen un *tag* HA en el dominio C-terminal para poder detectar su expresión y localización y se han introducido en vectores adenovirales (Figura 28).

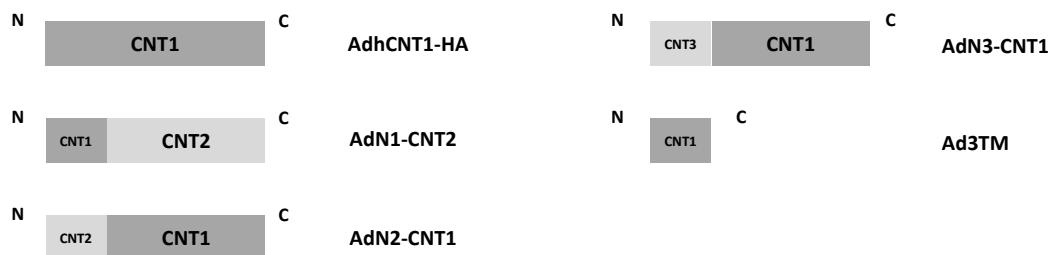


Figura 28. Esquema de las distintas proteínas quiméricas generadas y su nomenclatura.

En un trabajo previo publicado por el grupo, se evidenció que el efecto de la restauración de hCNT1 causaba un aumento en los niveles de fosforilación de AKT (en S473 y T308) y en la fosforilación de ERK (Pérez-Torras et al. 2013). Además, como ya se ha introducido, la restitución de hCNT1 induce una disminución de la viabilidad celular por efectos sobre el ciclo celular y muerte. Estas características nos permitieron

plantear una aproximación experimental para analizar la importancia del dominio N-terminal analizando estos parámetros relacionados con el papel de transceptor de hCNT1.

En primer lugar, para determinar la eficiencia de infección de los adenovirus codificantes para las proteínas quiméricas, se analizaron los niveles de expresión del vector adenoviral de hCNT1, comúnmente utilizado en el laboratorio para sobreexpresar esta proteína, con el vector adenoviral de hCNT1-HA después de la infección a diferentes MOI (Multiplicity Of Infection) en la línea de adenocarcinoma pancreático NP-9. Los niveles de expresión de hCNT1 aumentaron en AdhCNT1 y AdhCNT1-HA a medida que aumentaron las MOI, en comparación con la condición control del adenovirus (AdShuttle) que no presentó niveles detectables de mRNA para hCNT1 (Figura 29A). De todas maneras, los niveles de expresión de hCNT1 resultaron ser diferentes para los dos adenovirus, obteniendo con AdhCNT1 niveles de expresión más altos en las condiciones 25 y 50 MOI en comparación con AdhCNT1-HA (Figura 29A). A nivel de expresión proteica, las células transducidas con AdhCNT1HA mostraron niveles detectables de HA y la expresión de esta proteína parecería ser dependiente de dosis aunque el peso molecular de la proteína resultó ser menor de lo esperado (Figura 29B).

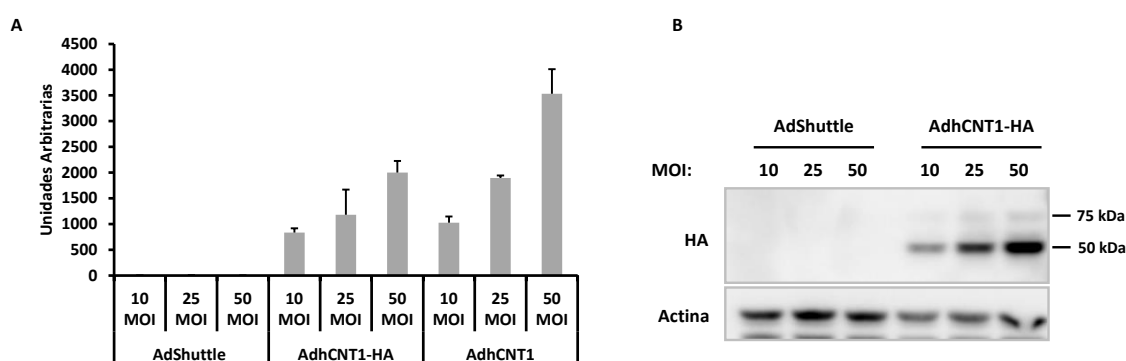


Figura 29. Niveles de expresión de hCNT1 determinados por *Real Time PCR* (A) y por *Western Blot* (B) en la línea de adenocarcinoma pancreático NP-9 después de la infección con AdShuttle, AdhCNT1 y AdhCNT1-HA a diferentes MOI. Las células se sembraron y 24 horas después se infectaron con un vector adenoviral control (AdShuttle), el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) y el vector adenoviral que expresa hCNT1HA (AdhCNT1-HA) a 10, 25 y 50 MOI. Después de 48 horas se procesaron las muestras. Los valores de Ct obtenidos han sido normalizados respecto al control endógeno GAPDH y se representa la media  $\pm$  SEM de las dos réplicas analizadas por condición (A) Como control de carga en el *Western Blot* se ha analizado los niveles de Actina (B).

El peso molecular detectado mediante *Western Blot* para la proteína hCNT1-HA nos indicaría que la forma mayoritaria de esta se encuentra alrededor de los 55 kDa mientras que existe una menor expresión a 71 kDa, siendo este el peso predicho para hCNT1. Este resultado es un factor a tener en cuenta para los experimentos realizados *a posteriori* dado que el cambio de peso molecular podría sugerir un cambio en las modificaciones post-traduccionales de estos constructos o la posibilidad de que estos constructos estén sufriendo algún tipo de proteólisis por la presencia del *tag* HA.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los efectos de la restauración de la expresión de hCNT1 es la reducción en la viabilidad celular. Con el fin de analizar si este efecto se consigue con las proteínas quiméricas y si es específico del transportador hCNT1, las células NP-9 fueron transducidas con las diferentes proteínas quiméricas así como con los transportadores hCNT2 y hCNT3. La infección con AdhCNT1 resultó ser capaz de reducir la viabilidad celular de manera significativa en comparación con la condición AdControl y el efecto resultó ser dependiente de dosis, siendo la disminución de hasta un 80% a altas MOI. Por el contrario, ni los transportadores hCNT2 y hCNT3 ni las proteínas quiméricas presentaron el mismo efecto (Figura 30).

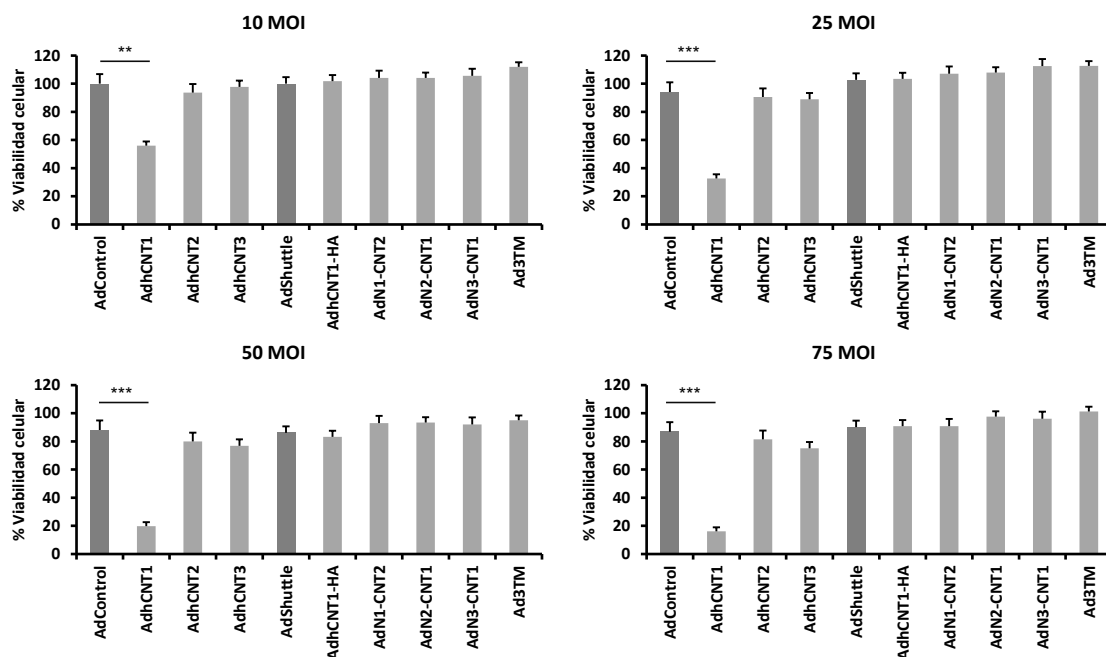


Figura 30. **Efecto sobre la viabilidad celular de los transportadores de nucleósidos o las proteínas quiméricas.** Las células NP-9 se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl o AdShuttle) o los vectores adenovirales que expresan los transportadores hCNT1, hCNT2 y hCNT3 (AdhCNT1, AdhCNT2, AdhCNT3) o las proteínas quiméricas (AdhCNT1-HA, AdN1-CNT2, AdN2-CNT1, AdN3-CNT1 y Ad3TM) a 10, 25, 50 y 75 MOI. Después de 72 horas se realizó el ensayo de MTT. Se representa la media  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo \*\*\* $P \leq 0,005$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ; \* $P \leq 0,05$ .

Por lo tanto, el efecto sobre viabilidad celular es exclusivo para AdhCNT1 y no como sería de esperar para las demás proteínas quiméricas. El constructo AdhCNT1-HA, que solo incorpora el *tag* HA y por lo tanto es el más similar a AdhCNT1, tampoco fue capaz de reducir la viabilidad celular.

Con el objetivo de analizar el efecto en la fosforilación de las proteínas AKT y ERK, se realizó la transducción de la línea NP-9 con los diferentes virus a dos tiempos diferentes (24 y 48 horas) (Figura 31). AdhCNT1 a 24 horas post-infección provocó un ligero aumento en la fosforilación de AKT y ERK, proceso que se vio aumentado a las 48 horas en comparación con su condición control (AdControl) (Figura 31A). En las proteínas quiméricas AdhCNT1-HA y AdN1-CNT2, únicamente se observó un ligero aumento en p-AKT a 48 horas, en comparación con su control (AdShuttle) (Figura 31B).

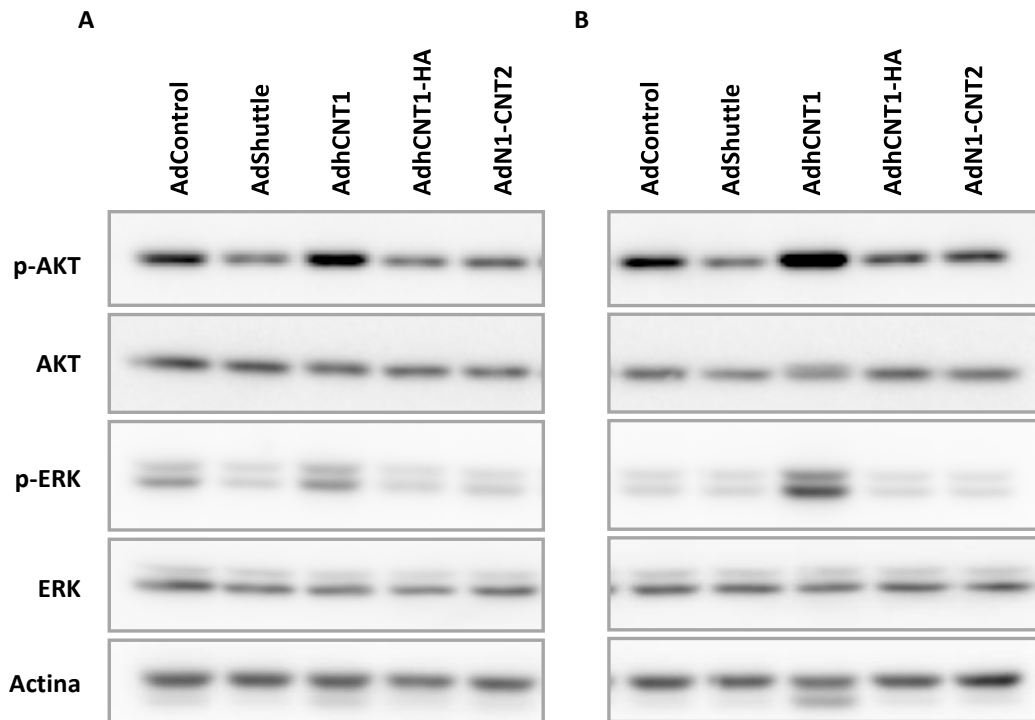


Figura 31. **Efecto de AdhCNT1 o las proteínas quiméricas AdhCNT1-HA y AdN1-CNT2 sobre las proteínas p-AKT, p-ERK, AKT, ERK.** Las células NP-9 se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl o AdShuttle) o los vectores adenovirales que expresan hCNT1 (AdhCNT1) o las proteínas quiméricas (AdhCNT1-HA y AdN1+CNT2) a 10 MOI. Después de 24 horas (A) o 48 horas (B) se procesaron las muestras.

Dado que a 10 MOI no se vieron grandes cambios, se decidió realizar el mismo experimento forzando las condiciones. Para ello se usaron un número mayor de MOI, 50 y 75, durante un total de 48 horas (Figura 32). En estas nuevas condiciones, como era de esperar, la expresión de hCNT1 causó un aumento en la fosforilación de AKT y ERK y para el caso de las proteínas quiméricas, AdhCNT1-HA y AdN1-CNT2 fueron también capaces de provocar un aumento en la fosforilación de AKT cuando las células se infectan a 75 MOI aunque en menor medida (Figura 32B).

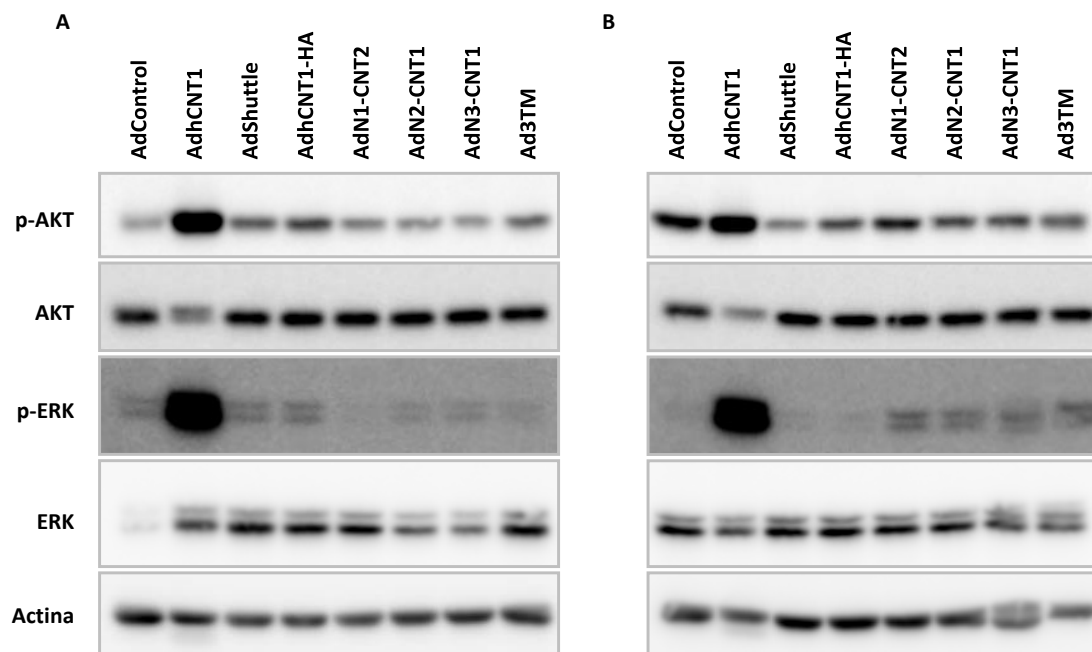


Figura 32. **Efecto de AdhCNT1 o las proteínas quiméricas sobre las proteínas p-AKT, p-ERK, AKT, ERK.** Las células NP-9 se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl o AdShuttle) o los vectores adenovirales que expresan las proteínas quiméricas (AdhCNT1-HA, AdN1-CNT2, AdN2-CNT1, AdN3-CNT1 y Ad3TM) a 50 (A) y 75 (B) MOI. Después de 48 horas se procesaron las muestras.

Los resultados obtenidos mostraron que la restitución de hCNT1-HA solo era capaz de inducir una activación de las vías de señalización de AKT y ERK a dosis adenovirales muy elevadas al igual que la proteína quimérica que contiene el N-terminal de hCNT1 y el cuerpo de hCNT2. Estos resultados, aunque poco representativos, parecerían indicar que el N-terminal de hCNT1 sería necesario para ejercer las funciones de transceptor, ya que las quimeras que contienen el cuerpo de hCNT1 no son capaces de activar las vías AKT y ERK. De todos modos, el poco efecto observado mediante la restitución de hCNT1-HA estaría sugiriendo que la presencia del *tag* HA interfiere en estas funciones. Como se ha comentado, la forma mayoritaria de hCNT1-HA observado por WB no se corresponde con el peso esperado para esta proteína y además, la presencia de HA podría estar interfiriendo en la oligomerización del transportador o en sus modificaciones post-traduccionales. Está descrito que vcCNT podría estar formando trímeros (Johnson et al. 2012) así como el transportador hCNT3 (Stecula et al. 2017).

Estos experimentos no nos permiten concluir si el dominio N-terminal de hCNT1 es suficiente para que esta proteína lleve a cabo las funciones de transceptor, pero sin

duda es un dominio relevante donde podrían estar residiendo las nuevas funciones descritas para este transportador ya sea de forma directa o mediante la interacción con otras proteínas. El dominio N-terminal de la familia de los hCNTs, se ha demostrado como lugar de interacción de otras proteínas con el transportador hCNT2 (Huber-Ruano et al. 2010) y como se verá a continuación, también es el dominio de interacción de hCNT1 con la proteína RACK1.

## **2.2 Validación y estudio funcional de las interacciones de hCNT1 con proteínas previamente identificadas**

La proteína hCNT1, como los demás miembros de la familia, posee un papel relevante en la fisiología celular relacionado con la captación de nucleósidos naturales y sus análogos. La pérdida de su expresión ha sido caracterizada en tumores humanos (Farré et al. 2004; Gloeckner-Hofmann et al. 2006; Bhutia et al. 2011; Urtasun et al. 2017) y la restitución de la expresión en líneas celulares que la han perdido ha demostrado que este transportador posee nuevas funciones que van más allá del mero transporte, asignándole características de transceptor (Pérez-Torras et al. 2013). Tal y como ya se ha indicado, el dominio N-terminal, presente solo en los hCNTs eucariotas parecería ser una adquisición evolutiva donde residirían estas nuevas funciones, que podrían ser mediadas por la interacción de este dominio con otras proteínas. Además, como ya se ha comentado, este dominio no resulta esencial para la función transportadora de hCNT1. De hecho, la delección de los primeros 174 aminoácidos de la proteína no tiene ningún efecto sobre su actividad transportadora (Hamilton et al. 2001). En nuestro grupo de investigación, se han identificado a través de diferentes metodologías, varias proteínas de interacción con los transportadores concentrativos de nucleósidos y se han escogido para su estudio las que podrían estar contribuyendo a las nuevas funciones de la proteína hCNT1.



### 2.2.1 Interacción hCNT1-RACK1

A través de estudios de doble híbrido en bacterias utilizando el dominio N-terminal de hCNT1, se identificó la proteína RACK1 (*Receptor for Activated C-kinase 1*) como proteína de interacción con el transportador. En colaboración con el Dr. Patrick Kiely (Universidad de Cork) se identificaron los residuos de RACK1 implicados en la interacción, siendo estos los mismos descritos para la interacción con FAK (*Focal Adhesión Kinase*), por lo que la unión de ambas a hCNT1 podría ser mutuamente excluyente.

La proteína RACK1 se encuentra en una gran variedad de especies eucariotas y su estructura le permite interactuar simultáneamente con diferentes moléculas señalizadoras, desde quinasas, fosfatasa, receptores de membrana hasta con proteínas relacionadas con la apoptosis y con proteínas estructurales asociadas a los ribosomas. RACK1 además es capaz de modular la estabilidad, la actividad y la localización de sus proteínas *partner* así como de condicionar la interacción de estas con otras moléculas. Las proteínas de unión a RACK1 mejor estudiadas hasta la fecha son las integrinas y el receptor IGF-1R (*Insuline-like growth factor 1*), ambos relacionados con los efectos de supervivencia, morfología, adhesión y migración (Li & Xie 2014).

Como se ha introducido anteriormente, las funciones transceptoras de hCNT1 están relacionadas con la muerte celular, la proliferación, la modulación de las vías de señalización de AKT y ERK y la migración celular. Estos efectos son comunes a los descritos para RACK1 por lo que no se puede descartar que los efectos del transportador hCNT1 se deban a la interacción entre ambas proteínas. Basándonos en esta hipótesis, quisimos analizar los efectos de la interacción entre ambas proteínas y los efectos de hCNT1 en migración.

La interacción hCNT1-RACK1 se demostró mediante co-inmunoprecipitación en células HEK293 que expresan de manera estable el transportador o células HEK293 transfectadas con hCNT1 (Figura 33). Por un lado la inmunoprecipitación de RACK1 e inmunodetección de hCNT1 se realizó en las células que expresan de manera estable el transportador (Figura 33A) y la aproximación inversa, es decir, la inmunoprecipitación

de hCNT1 y detección de RACK1 se realizó en las células HEK293 transfectadas con el vector de hCNT1 (Figura 33B).

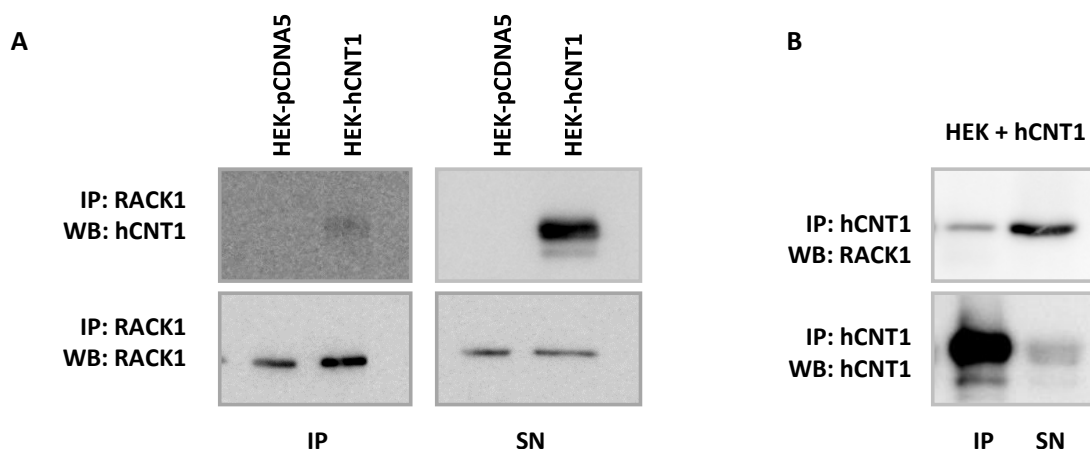


Figura 33. **Co-inmunoprecipitación de hCNT1 con RACK1.** Se sembraron células control HEK293-pCDNA5 (HEK-pCDNA5) y células que expresan de manera estable el transportador (HEK-hCNT1). 48 horas después se realizó la co-IP de RACK1 y hCNT1 (A). Se sembraron células HEK293 y 24 horas después se transfectaron con el vector de hCNT1. 48 horas después se procesaron las muestras y se realizó la co-IP de hCNT1 y RACK1 (B). IP: Inmunoprecipitado; SN: Sobrenadante.

Una vez validada la interacción y teniendo en cuenta que la hipótesis de que la interacción entre RACK1 y hCNT1 estaría desplazando la unión de FAK a RACK1, quisimos analizar el efecto de la restitución de la expresión del transportador en la línea NP-9, derivada de adenocarcinoma pancreático, sobre esta vía de señalización. Esta línea tumoral resulta ser un buen modelo de estudio dado que carece de la expresión de hCNT1 y además fue en una de las líneas en las que se demostró la función de transceptor del transportador (Pérez-Torras et al. 2013). La restitución de la expresión de hCNT1 a dos tiempos diferentes (24 y 48 horas) provocó una disminución de los niveles de fosforilación de FAK así como de la proteína total (Figura 34).

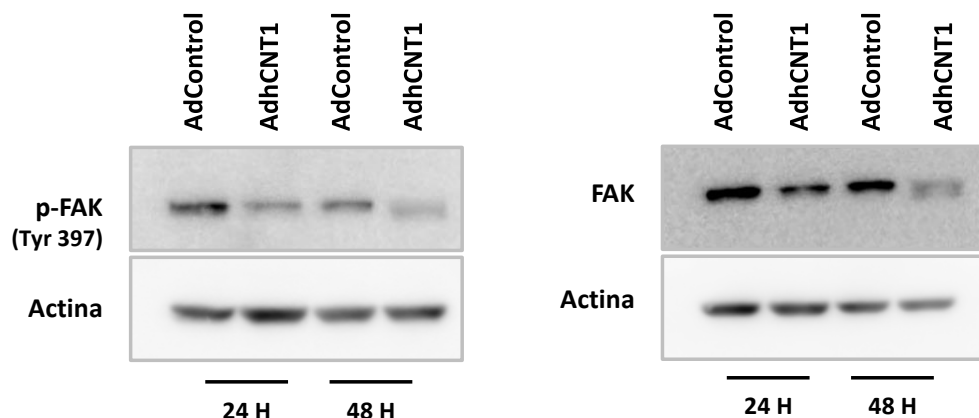


Figura 34. **Efecto de hCNT1 sobre la activación y expresión de FAK.** Las células NP-9 se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) a 10 MOI. Después de 24 horas o 48 horas se procesaron las muestras.

Para analizar si la inhibición de la activación de FAK podría estar condicionando su localización celular, se inmunodetectó la proteína en células Control y en células en las que se restituyó la expresión de hCNT1 (Resultado de la Dra. Nerea Urtasun). En las células en las que se restituyó la expresión de hCNT1 se evidenció una disminución del tamaño de los contactos focales en comparación con las células Control. Además este hecho se correspondería con una disminución en la migración de estas células (Figura 35).

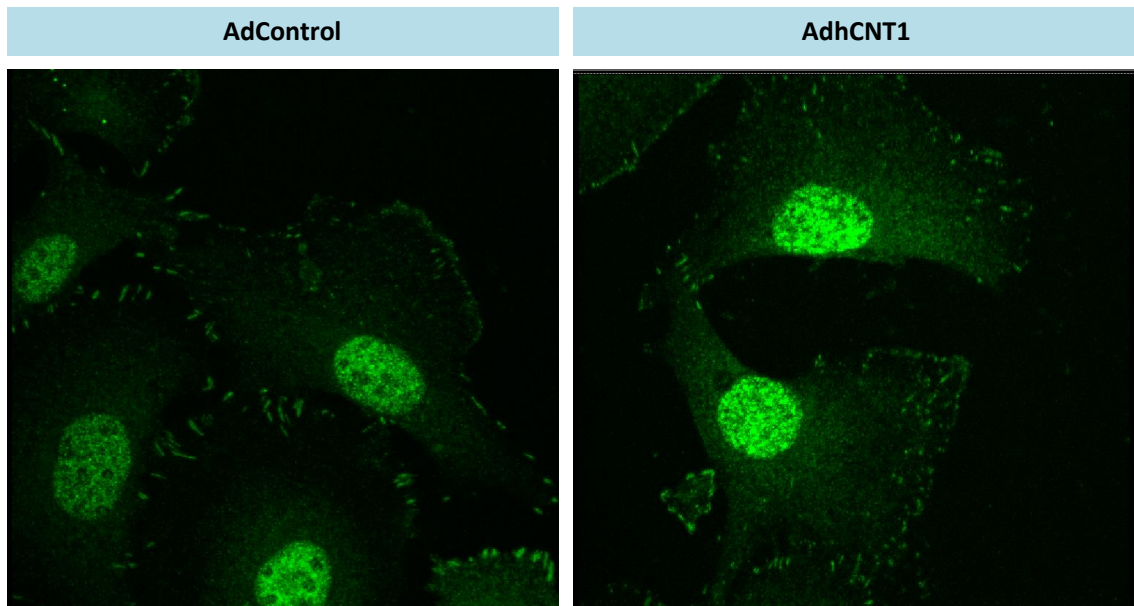


Figura 35. **Disminución del tamaño de los contactos focales por la restitución de la expresión de hCNT1.** Las células NP-9 se sembraron y se infectaron 24 horas después con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) a 10 MOI. Después de 48 horas se procesaron las muestras y se realizó la inmunodetección con el anticuerpo de FAK. Imágenes de microscopía confocal obtenidas con el microscopio Leica SPE, objetivo: 63x.

FAK es una tirosina quinasa que regula procesos de proliferación, supervivencia, adhesión y migración. Estos dos últimos procesos los realiza mediante la interacción con RACK1 que actúa como proteína adaptadora y permite su activación por señales de adhesión a través de receptores de integrinas o receptores de crecimiento y citoquinas. La señalización por el complejo de receptores de integrinas y RACK1 es suficiente para que FAK se autofosforile en la Tyr 397 y se active parcialmente. Esta fosforilación crea un sitio de unión de la quinasa Src que fosforila a FAK en sitios secundarios para que se active completamente (Adams et al. 2011). El aumento en los niveles de hCNT1 estaría favoreciendo la interacción del transportador con RACK1 y quizás también modulando su localización celular, encontrándose lejos de las adhesiones focales. La fosforilación de FAK en estas condiciones se vería condicionada por la disminución de los complejos de RACK1 e integrinas disminuyendo así los niveles de su forma activa.

La inhibición de la quinasa FAK por hCNT1 nos hizo plantearnos el hecho de si este efecto era dependiente de la activación de RACK1. Se ha descrito que la fosforilación

de RACK1 por c-Abl, quinasa inhibida por Imatinib, modula su localización en la célula condicionando su interacción con FAK (Kiely et al. 2009). Restituyendo hCNT1 solo o en combinación con Imatinib, se analizaron los efectos sobre la fosforilación de FAK y sobre la activación de dos de las vías de señalización activadas por la unión de RACK1 con los receptores de IGF-1R y de integrinas (Einhorn 2013). Estas dos vías son la vía de MAPK/ERK y de PI3K/AKT. En las células control, el fármaco Imatinib mostró un efecto en reducir los niveles de fosforilación de FAK mientras que los niveles de p-AKT y p-ERK se mantuvieron inalterados. Respecto a las proteínas totales, solo AKT mostró una disminución cuando las células se trataron con 20  $\mu$ M del fármaco. En comparación con la condición control, la restitución de la expresión de hCNT1 causó un aumento en los niveles de p-AKT y p-ERK y una disminución de p-FAK y solo este último se moduló por la combinación con Imatinib, observándose una menor fosforilación de FAK en las células tratadas a ambas concentraciones del fármaco. Las proteínas totales AKT y ERK se mantuvieron constantes mientras que la disminución de FAK en las células transducidas con AdhCNT1 se vio incrementada por la presencia del inhibidor (Figura 36).

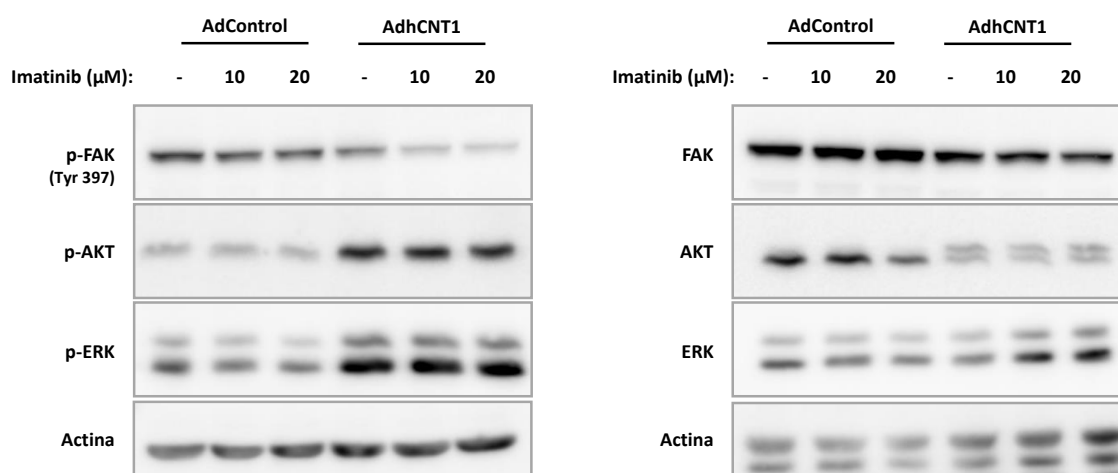


Figura 36. **Efecto de hCNT1 sobre la activación y expresión de FAK, ERK y AKT.** Las células NP-9 se sembraron y 24 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) a 10 MOI. Después de 24 horas se trataron las células con Imatinib (10 o 20  $\mu$ M) y se procesaron las muestras 48 horas después.

En este experimento, la presencia del transportador junto con el tratamiento con Imatinib tiene un efecto sumatorio sobre la fosforilación de FAK lo que indicaría que

las dos condiciones estarían actuando parcialmente sobre la misma diana. En cambio, los niveles totales de FAK solo se alteran cuando se restituye hCNT1 solo o en combinación con el tratamiento con Imatinib, mientras que el fármaco por sí solo no tiene ningún efecto. Respecto a la señalización por ERK, esta proteína permite integrar las señales extracelulares con respuestas biológicas intracelulares como proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y transformación celular. En relación a sus efectos en migración, su activación es dependiente de FAK y de su localización en las adhesiones focales (Vomastek et al. 2007). La activación de ERK no parece verse modulada por el inhibidor tampoco en la condición donde se restituyó la expresión de hCNT1. Esto estaría indicando que la activación de ERK por hCNT1 no sería por la vía de FAK. De hecho existen diferentes estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, carcinógenos que activan esta proteína y le confieren una amplia variedad de funciones celulares (Johnson & Lapadat 2002). Para el caso de AKT, sus efectos biológicos son también muy diversos y aunque se ha descrito que RACK1 puede estar modulando la apoptosis por medio de la inhibición de AKT (Mamidipudi & Cartwright 2009), en estas condiciones no observamos que el fármaco tuviera ningún efecto sobre su fosforilación.

El análisis de la función biológica de la interacción entre hCNT1 y RACK1 se analizó mediante ensayos de adhesión y migración al restituir la expresión del transportador con el sistema RTCA (*Real-Time Cell Analysis*) xCELLigence. Este sistema permite monitorizar a tiempo real los parámetros de adhesión y migración en un cultivo celular. La capacidad de adhesión celular, reflejada en las primeras horas del experimento, resultó ser igual entre ambas condiciones mientras que a partir de las 30 horas se evidenció una parada de la proliferación celular en las células donde se restituyó la expresión del transportador. Además, a partir de las 40 horas, en esta misma condición se observó una disminución del Índice Celular, reflejo del aumento de la muerte celular (Figura 37).

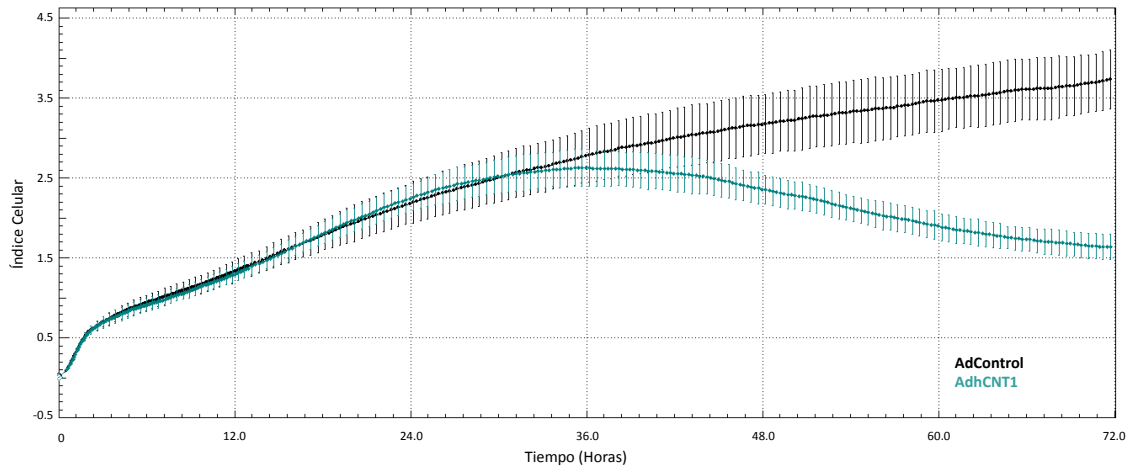


Figura 37. **Cambios en el proceso de adhesión al restituir la expresión de hCNT1.** Las células NP-9 se sembraron y 16 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) a 10 MOI durante 4 horas, momento en el que se realizó el ensayo. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de las cuatro réplicas analizadas por condición.

En base a lo expuesto, los experimentos de migración se decidieron realizar a 26 horas post-infección para asegurarnos la máxima expresión del transportador y evitar los efectos en la proliferación y muerte celular que podrían estar condicionando el ensayo.

El análisis de la migración mostró un claro efecto de hCNT1 en reducir la migración celular en las 5 primeras horas de ensayo. Al tratar las células con el inhibidor de FAK se observó una clara disminución de la migración en las células NP-9 infectadas con AdControl, siendo este efecto de la misma magnitud que el inducido por la combinación de AdhCNT1 y el inhibidor (Figura 38).

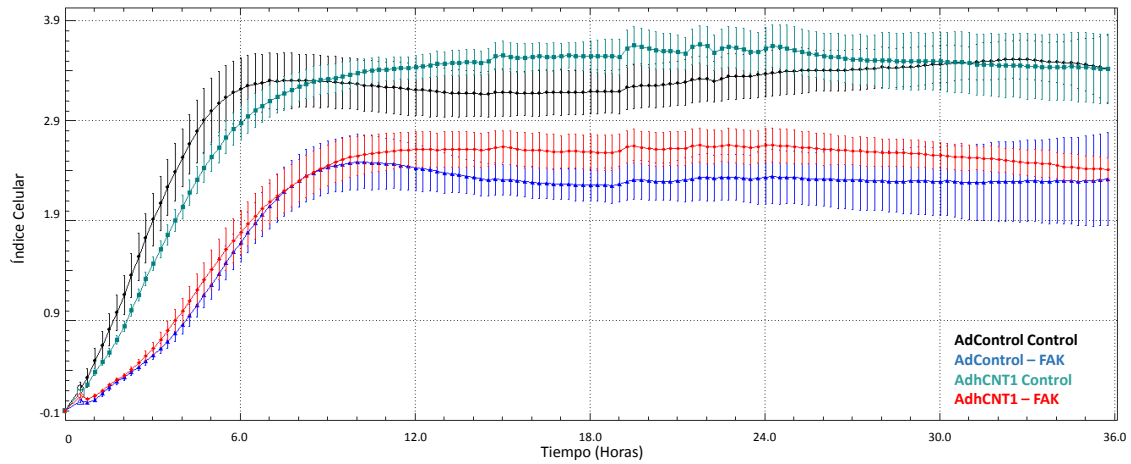


Figura 38. Cambios en el proceso de migración al restituir la expresión de hCNT1 solo o en combinación con el inhibidor de FAK PF562271. Las células NP-9 se sembraron y 16 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) a 10 MOI durante 26 horas, momento en el que se trataron las células con PF562271 (10  $\mu$ M) y se realizó el ensayo. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de las cuatro réplicas analizadas por condición.

El análisis en paralelo de los efectos sobre la fosforilación de las quinasas ERK y FAK en estas mismas condiciones mostraron un aumento de p-ERK al restituir la expresión de hCNT1 en comparación con las células control mientras que la presencia del inhibidor no tuvo ningún efecto. En relación a la activación de FAK, el inhibidor causó una disminución de p-FAK que se mantuvo con la combinación con hCNT1 (Figura 39).

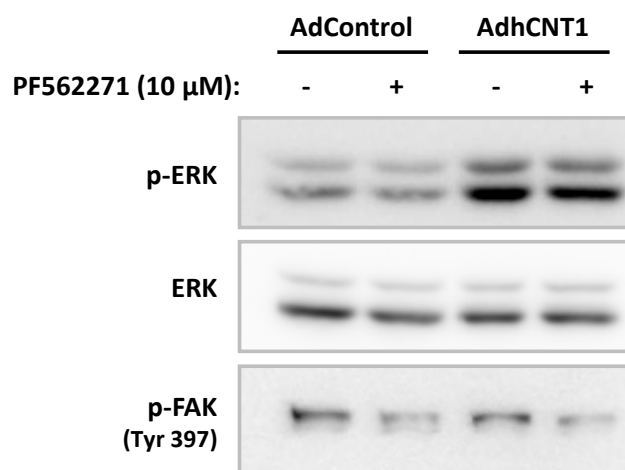


Figura 39. Efecto de hCNT1 solo o en combinación con PF562271 sobre la activación de FAK y ERK. Las células NP-9 se sembraron y 16 horas después se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) a 10 MOI durante 30 horas, momento en el que se trataron las células con PF562271 (10  $\mu$ M) y se procesaron las muestras 2 horas después.



El hecho de que en el ensayo de migración el efecto de inhibir FAK no se suma al de la restitución de hCNT1 y sea el mismo cuando se restituye o no la expresión del transportador nos estaría indicando que los efectos sobre mecanismos involucrados en el proceso de migración son comunes entre ambas condiciones. A nivel de proteína, hCNT1 mostró un pequeño efecto sobre la disminución de la fosforilación de FAK mientras que con el inhibidor los efectos fueron mayores y los niveles entre la condición control y la condición con AdhCNT1 resultaron ser iguales. En este caso también, los niveles de p-ERK se mantuvieron inalterados en presencia del inhibidor por lo que no parecería que en nuestro modelo celular esta proteína tenga un efecto directo sobre la migración celular ni se module por los inhibidores Imatinib y PF562271.

El mismo experimento se realizó disminuyendo los niveles de RACK1 y analizando el efecto en migración. En la condición con hCNT1, también en este caso, se vio una disminución de la migración en comparación con las células Control. Además la combinación con el siRNA de RACK1 tuvo un efecto mayor en inhibir la migración. De todas maneras, cabe destacar que el índice celular de este experimento es inferior por lo que el silenciamiento podría estar dañando las células y por lo tanto los resultados podrían ser menos fiables (Figura 40).

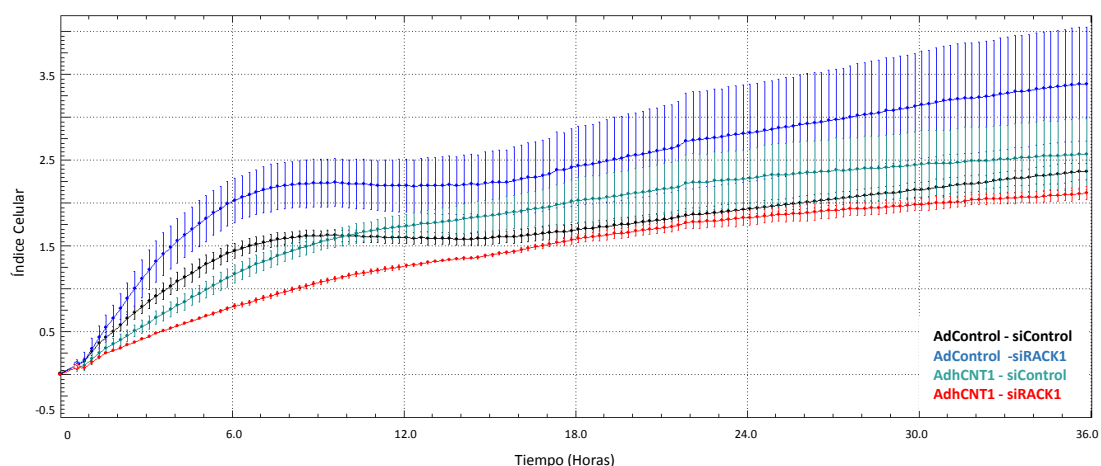


Figura 40. **Cambios en el proceso de migración al restituir la expresión de hCNT1 y modificar los niveles de RACK1.** Las células NP-9 se sembraron y 16 horas después se silenciaron con el siRNA Control (siControl, 2  $\mu$ M) o el siRNA de RACK1 (siRACK1, 2  $\mu$ M) y infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) a 10 MOI durante 26 horas, momento en el que se realizó el ensayo. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de las cuatro réplicas analizadas por condición.

A nivel de proteína, el silenciamiento de RACK1 no modificó los niveles de fosforilación de ERK mientras que parecería que la combinación de hCNT1 junto con el silenciamiento de RACK1 provoca una disminución de la fosforilación de FAK en comparación con el silenciamiento de RACK1 donde hCNT1 no se encuentra sobreexpresado (Figura 41).

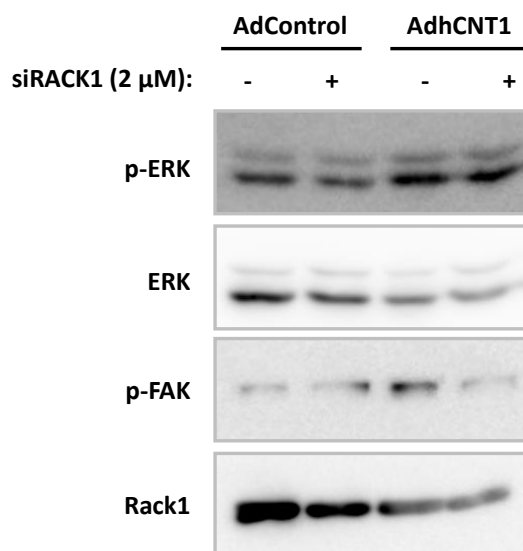


Figura 41. **Efecto de hCNT1 y el silenciamiento de RACK1 sobre la activación de FAK y ERK.** Las células NP-9 se sembraron y 16 horas después se silenciaron con el siRNA Control (siControl, 2  $\mu$ M) o el siRNA de RACK1 (siRACK1, 2  $\mu$ M) y se infectaron con el vector adenoviral control (AdControl) o el vector adenoviral que expresa hCNT1 (AdhCNT1) a 10 MOI durante 30 horas, momento en el que se procesaron las muestras.

Con estos resultados, parecería que el efecto de hCNT1 en inhibir la migración celular aumenta cuando la proteína RACK1 se encuentra silenciada por lo que la disminución de sus niveles podría estar condicionando que la proteína restante que no se ha silenciado esté toda unida al transportador hCNT1 que se encuentra sobreexpresado, aumentando así el efecto negativo en la migración.

La interacción del transportador con RACK1 también se ha podido demostrar por inmunohistoquímica en muestras de cáncer colorrectal y pancreático (datos no publicados) por lo que no parecería ser exclusivo de este modelo celular.

### 2.2.2 Interacción hCNT1-RNF41

En resultados previos del grupo, en el marco de la tesis doctoral del Dr. Albert Viel, se identificó la interacción del transportador hCNT1 con la proteína RNF41 (datos no publicados). Estos datos se obtuvieron gracias a la técnica MYTH (*Membrane Yeast Two Hybrid*) que permite detectar posibles interacciones de proteínas de membrana utilizando la proteína entera en su ubicación celular normal. El ensayo se realiza en levaduras, organismos eucariotas que pueden llevar a cabo modificaciones post-traduccionales de las proteínas, por lo que resulta un buen modelo en el que estudiar estas interacciones (Snider et al. 2013). Respecto a la función biológica de la interacción, se demostró que los niveles de RNF41 estaría modulando la actividad del transportador por un mecanismo hasta ahora desconocido (Figura 42).

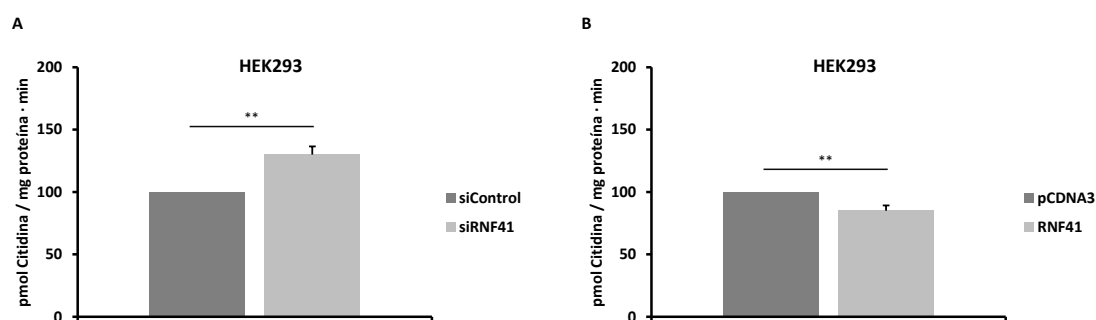


Figura 42. **Modulación de la actividad de hCNT1 por los niveles de RNF41.** Las células HEK293-CNT1 se sembraron y 24 horas después se silenciaron con el siRNA Control (siControl) o con el siRNA de RNF41 (siRNF41) (A). En paralelo se transfectaron las células con el vector control (pCDNA3) o con el vector que codifica para RNF41 (RNF41) (B) durante 48 horas momento en el cual se realizaron los ensayos de transporte a un minuto con citidina tritiada en medio colina (Cho) o sodio (Na). Se representa la sodio dependencia (Na dep). Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Datos Tesis Doctoral Albert Viel.

RNF41 (*Ring finger protein 41*) también conocida como Nrdp1 (*Neuregulin receptor protein 1*) es una ubiquitin ligasa de tipo E3 con capacidad de transferir el péptido de ubiquitina a la proteína diana. Existen diferentes estudios que relacionan esta proteína con procesos relacionados con la oncogénesis, como es el caso del cáncer de mama. En concreto, en un subtipo de este tipo de cáncer, ErbB3 se encuentra sobreexpresado y su heterodimerización con el receptor ErbB2 promueve la proliferación de las células

tumorales (Holbro et al. 2003). Se ha descrito que RNF41 interacciona con ErbB3 y ErbB4 promoviendo la ubiquitinización y el cambio de localización de estos receptores desde la membrana plasmática hacia el interior celular provocando una disminución de su señalización (Diamonti et al. 2002). Además, se ha demostrado una disminución de los niveles de RNF41 en muestras de cáncer de mama primario que se relaciona con un aumento de ErbB3 (Yen et al. 2006). En conjunto, se puede decir que tanto RNF41 como hCNT1 modulan procesos relacionados con la oncogénesis y su interacción puede estar determinando las diferentes funciones del transportador.

Siendo RNF41 una ubiquitin ligasa, se presupone que la interacción entre ambas promueva la ubiquitinización de hCNT1. La unión del residuo ubiquitina puede tener diferentes efectos sobre la proteína a la que se une, desde su proteólisis hasta su regulación a nivel de actividad, regulación alostérica o localización celular (Komander 2009).

Para llevar a cabo el estudio de esta interacción y el efecto que tiene esta sobre el transportador, se realizó un conjunto de experimentos que a continuación se detallan. En primer lugar, se realizaron experimentos de inmuprecipitación de hCNT1 para verificar la eficiencia de los anticuerpos presentes en el laboratorio para llevar a cabo esta técnica y poder analizar posteriormente la interacción hCNT1-RNF41 y determinar si hCNT1 se encuentra ubiquitinado. Los ensayos de inmunoprecipitación (IP) se realizaron con dos tipos de anticuerpos, el N17 de Santa Cruz dirigido contra el dominio N-terminal de la proteína y el C14 también de Santa Cruz pero dirigido contra el dominio C-terminal. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal producido por el laboratorio para evitar señales cruzadas entre anticuerpos. La inmunoprecipitación del transportador se consiguió con el anticuerpo N17 y no con el C14 (Figura 43). En el revelado, hCNT1 aparece con dos pesos diferentes, uno superior a los 75 kDa y otro menor a 60 kDa. Investigaciones de nuestro grupo han demostrado que el transportador hCNT1 puede glicosilarse y que esta modificación post-traduccional estaría modulando la actividad de la proteína (manuscrito en revisión). Por lo tanto, las dos bandas que se observan podrían corresponder a la proteína hCNT1 glicosilada y no glicosilada (Figura 43).

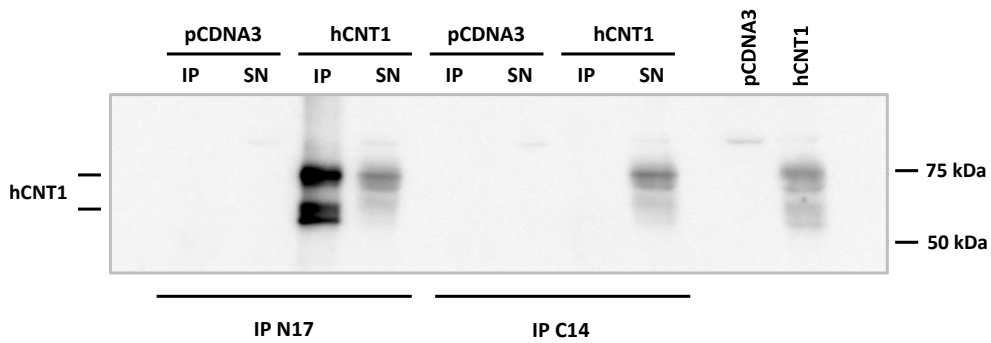


Figura 43. **Inmunoprecipitación de hCNT1 con los anticuepos N17 (Santa Cruz) y C14 (Santa Cruz) en la línea HEK293.** Las células HEK293 se sembraron y 24 horas después se transfectoron con el vector pCDNA5-hCNT1 (hCNT1) o el vector control pCDNA5. 48 horas después se procesaron las muestras y se realizó la IP y posterior análisis mediante *Western Blot*. La inmunodetección se analizó con el anticuerpo monoclonal de hCNT1, producido por nuestro laboratorio.

En un siguiente ensayo, se establecieron las mismas condiciones pero esta vez cotransfectando las células con hCNT1 y RNF41 con el fin de analizar si los niveles del transportador varían cuando se sobreexpresa RNF41. La sobreexpresión de RNF41 no parecería estar modulando los niveles de expresión de la proteína hCNT1 (Figura 44).

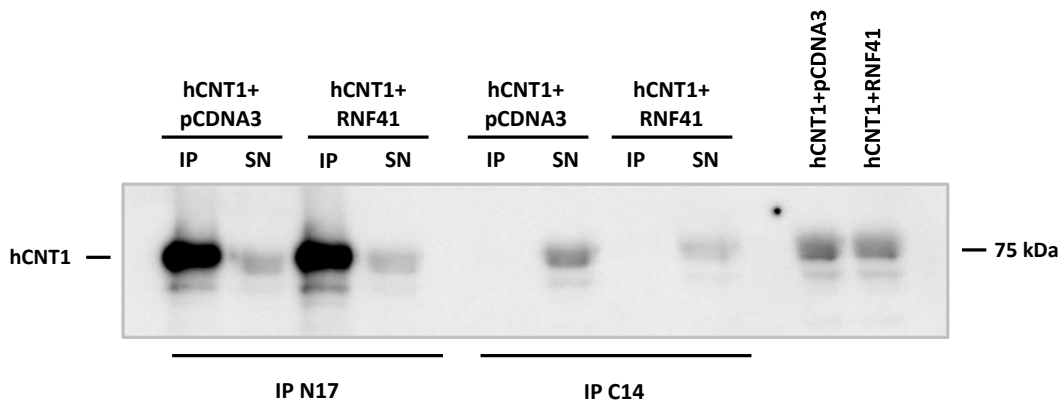


Figura 44. **Inmunoprecipitación de hCNT1 con los anticuepos N17 (Santa Cruz) y C14 (Santa Cruz) en la línea HEK293.** Las células HEK293 se sembraron y 24 horas después se transfectoron con el vector de hCNT1 junto con el vector control pCDNA5 o el vector RNF41. 48 horas después se procesaron las muestras y se realizó la IP y posterior análisis mediante *Western Blot*. La inmunodetección se analizó con el anticuerpo monoclonal de hCNT1, producido por nuestro laboratorio.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para inmunoprecipitar hCNT1, se analizó la co-inmunoprecipitación entre hCNT1 y RNF41. La Figura 45 demuestra la interacción entre ambas proteínas. Esta interacción se consigue tanto con la proteína RNF41 endógena como con la transfectada.

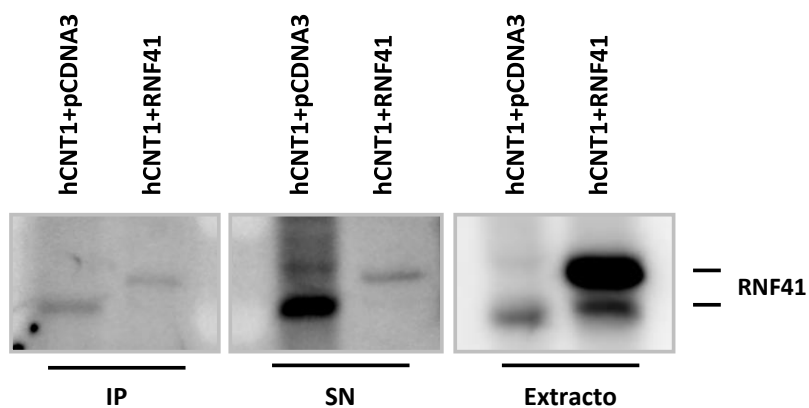


Figura 45. **Co-inmunoprecipitación de hCNT1 con RNF41.** Las células HEK293 se sembraron y 24 horas después se transfectaron con el vector de hCNT1 junto con el vector control pCDNA5 o el vector RNF41. 48 horas después se procesaron las muestras y se realizó la co-IP de hCNT1 y posterior análisis mediante *Western Blot* de RNF41. IP: Inmunoprecipitado; SN: Sobrenadante.

En la condición en la que se sobreexpresó RNF41, la interacción de hCNT1 se observó solo con la proteína RNF41 exógena y no con la endógena. Los niveles de expresión de esta última resultaron ser más bajos, por lo que el aumento de la forma exógena podría estar interaccionando con todo el hCNT1 disponible.

Una vez confirmada la interacción, se decidió analizar el estado de ubiquitinización de hCNT1 y determinar si RNF41 podría estar modulándolo. Se realizó la inmunoprecipitación de hCNT1 y el posterior análisis de las formas ubiquitinadas. Si bien la IP funcionó y se pudo detectar la expresión del transportador, este no parecería presentar formas ubiquitinadas (Figura 46).

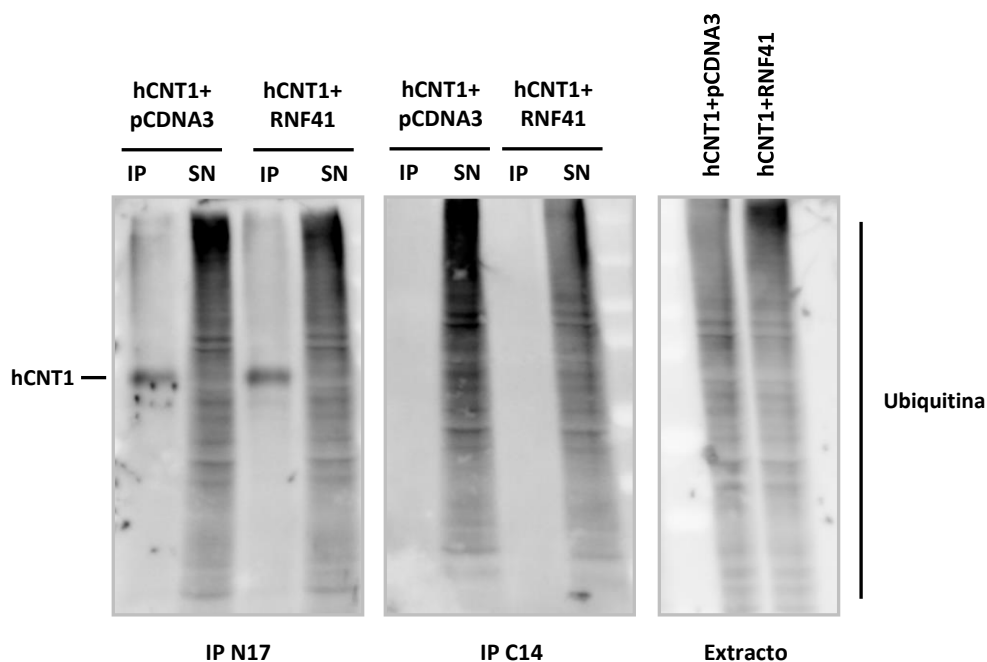


Figura 46. **Análisis mediante inmunoprecipitación de las formas ubiquitinadas de hCNT1.** Las células HEK293 se sembraron y 24 horas después se transfectaron con el vector de hCNT1 junto con el vector control pCDNA5 o el vector RNF41. 48 horas después se procesaron las muestras y se realizó la IP de hCNT1 y posterior análisis mediante *Western Blot* de Ubiquitina. IP: Inmunoprecipitado; SN: Sobrenadante.

Predicciones bioinformáticas con el programa UbPred revelan tres lisinas susceptibles de ubiquitinarse, una de ellas, la lisina K19 con una alta confianza. Esta lisina se encuentra en la región N-terminal. Existen ejemplos de transportadores que se ubiquitan en esta región como por ejemplo el transportador de monocarboxilato 8 (MCT8) que existe en dos formas, con una cola N-terminal larga y otra corta. La proteína con el N-terminal largo se ubiquitina, proceso que modula su degradación vía proteosoma y su capacidad de oligomerización (Zwanziger et al. 2016). Para acabar de verificar este resultado se decidió realizar la aproximación inversa, es decir, inmunoprecipitar ubiquitina y revelar hCNT1. En este caso, la inmunoprecipitación de ubiquitina no resultó eficiente por lo que no se pudo comprobar por esta vía. De todas maneras, el conjunto de los resultados obtenidos no demostró la presencia de formas de hCNT1 ubiquitinadas.

El hecho de que la proteína RNF41 se exprese de forma considerable en nuestro modelo celular nos hizo plantearnos la opción de silenciar su expresión y analizar el

efecto sobre la proteína hCNT1. Además, se utilizó el inhibidor del proteosoma MG132 para determinar si la degradación del transportador es dependiente de esta vía y si se condiciona por los niveles de RNF41. El silenciamiento de RNF41 parecería estar aumentando los niveles de la proteína hCNT1 a un peso molecular menor en comparación con las células que mantienen unos niveles basales o aumentados de RNF41 (Figura 47A). Además cuando las células se trataron con el inhibidor del proteosoma MG132 se observó una disminución en los niveles de hCNT1 cuando se sobreexpresa RNF41 en comparación con las células que tienen esta proteína silenciada, en las cuales se obtienen unos niveles de expresión similares al control (Figura 47B).

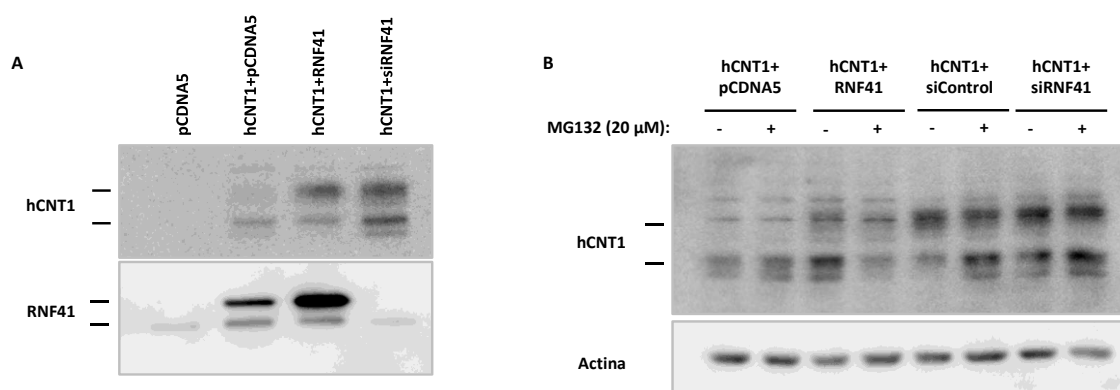


Figura 47. **Efecto de los niveles de RNF41 sobre la expresión de hCNT1.** Las células se sembraron y 24 horas después se transfectaron con el vector de hCNT1, RNF41 o el control pCDNA5 (A, B). 24 horas después las células se silenciaron con el siRNA control (siControl) o el siRNA de RNF41 (siRNF41) (A, B). 24 horas después se trataron con MG132 20 μM durante 8 horas (B) momento en el cual se procesaron las muestras y se inmunodetectaron los niveles de hCNT1 (anticuerpo N17), RNF41 y actina.

De todas maneras, no parecería que la degradación del transportador sea por medio del proteosoma pero sí que existe un cambio cuando las células se tratan con este inhibidor y se modulan los niveles de RNF41.



### 2.3 Efecto del silenciamiento de mCNT1 en un modelo *in vivo*

La expresión de los transportadores concentrativos de nucleósidos se pierde durante los procesos tumorales y a la vista de la imposibilidad de encontrar modelos celulares que retengan la expresión de estas proteínas, se decidió realizar un experimento con un modelo de ratón. Para ello se subclonaron tres *short hairpins* RNA (uno para mCNT1 otro para mCNT2 y el control) en un vector adenoasociado derivado del serotipo AAV8 (Elizalde et al., 2014). Este serotipo se caracteriza por presentar tropismo hepático y los *short hairpins* RNA están bajo la regulación de un promotor específico de hígado. Los virus adenoasociados generados se inyectaron por la vena de la cola del ratón dado que es una vía directa al hígado por lo que gracias a estas características se esperaba una gran eficiencia del silenciamiento en este órgano. Una vez transcurridos 20 días desde la inyección de los virus, se sacrificaron los animales y se realizó la extracción de RNA del hígado para comprobar la eficiencia del silenciamiento (Figura 48). El silenciamiento del transportador mCNT1 resultó ser más eficiente que el silenciamiento de mCNT2.

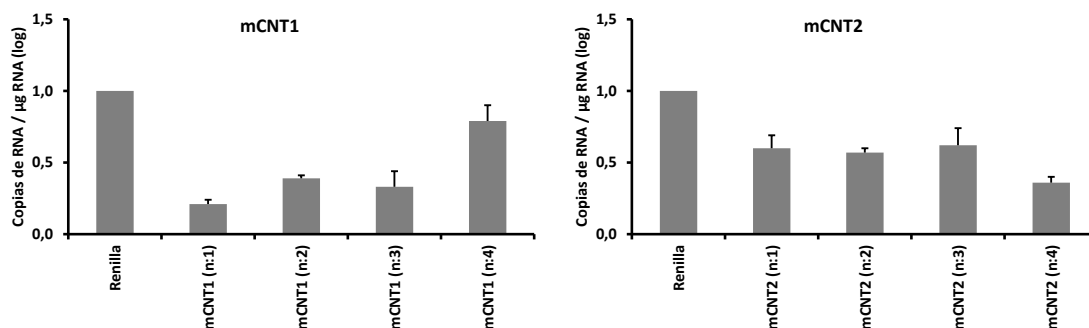


Figura 48. **Silenciamiento hepático de mCNT1 y mCNT2 determinados por Real Time PCR absoluta.** El silenciamiento de los transportadores se llevó a cabo 20 días después de la inyección de los virus adenoasociados. Se representa la media  $\pm$  SEM de las dos réplicas analizadas por condición.

Una vez realizada la comprobación del silenciamiento se analizaron las muestras por RNA sequencing y se realizó el análisis computacional de los resultados obtenidos. El análisis demostró un silenciamiento significativo de mCNT1 pero no de mCNT2. En la Figura 49 se muestra el heatmap de los 50 genes con mayores cambios en sus niveles de expresión después de silenciar mCNT1.

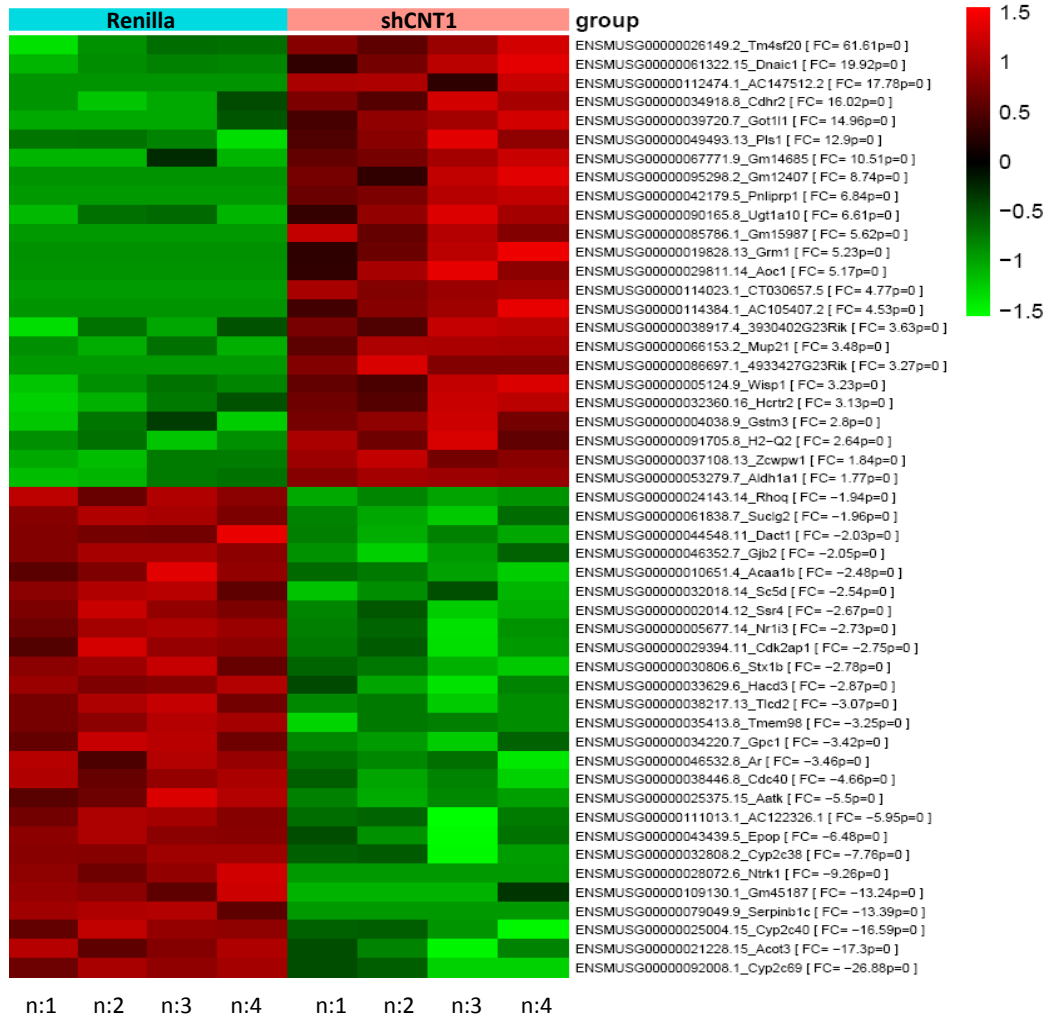


Figura 49. **Heatmap** de los primeros 50 genes con cambios significativos en su expresión después del silenciamiento hepático de mCNT1. La intensidad de los colores refleja el grado de cambio. Cada columna corresponde con uno de los 4 ratones analizados por condición.

El silenciamiento hepático de CNT1 tuvo como resultado un cambio en la expresión de genes relacionados con la reorganización del citoesqueleto y la migración además de genes relacionados con la conjugación y detoxificación de compuestos. En relación a los primeros, se observó un aumento en los genes *TM4SF20*, *PATJ*, *CDHR2* y *CDH1*. *TM4SF20* y *PATJ* se encuentran relacionados con la polaridad epitelial, la dirección de la migración y el ensamblaje de las proteínas en el frente migratorio (Shin et al. 2007; Wright et al. 2000). *CDHR2* y *CDH1* (Cadherina 1), en cambio, forman parte de la familia de las cadherinas, las cuales poseen funciones de supresores tumorales, estando la expresión de *CDH1* disminuida en determinados tipos tumorales, confiriéndoles menos capacidad de adhesión y por lo tanto más capacidad de invasión

y metástasis (Shamir & Ewald 2015). Además, también se observó una disminución de la expresión de *RHOQ*, implicada en la reorganización del citoesqueleto, de *CEACAM1*, implicada en la regulación del fenotipo epitelial y cuya expresión se encuentra disminuida en cáncer de mama, próstata e hígado (Abou-rjaily et al. 2004) y de *CRB3*, considerado como supresor tumoral y marcador de la transición epitelio-mesénquima. La transición epitelio-mesénquima, necesaria para la adquisición del fenotipo migratorio celular, se caracteriza por la disminución de la expresión de *CRB3* y Cadherina 1 y el aumento de vimentina (Li et al. 2015).

Otro grupo de genes con cambios significativos en su expresión fueron genes relacionados con la vía de señalización de Wnt, la cual se encuentra relacionada con procesos de diferenciación y proliferación y su activación se ha caracterizado en diferentes tipos de cáncer (Zhan et al. 2017). Así, después del silenciamiento de *CNT1*, se observó un aumento de *Wisp1*, que codifica para una proteína secretada al espacio extracelular y activadora de la vía Wnt y de la cual se ha descrito un aumento en diferentes tipos de cáncer como el de hígado (Chiang et al. 2015). También se observó una disminución de *DACT1*, inhibidor de la vía de Wnt. La expresión de esta proteína se ha visto disminuida en tumores gastrointestinales, de hígado y pulmón aunque también se ha encontrado un aumento en cáncer de colon (Li et al. 2017).

Respecto a los genes relacionados con la detoxificación de compuestos, la disminución de la expresión del transportador causó una regulación de la expresión de algunos miembros de la familia génica *GSTM* y *UGT*, relacionados con la detoxificación de carcinógenos, tóxicos y productos del estrés oxidativo (Dostalek & Stark 2012).

Si bien los resultados obtenidos deben ser validados individualmente, cabe destacar que los cambios observados mediante el silenciamiento de *mCNT1* irían a favor de un fenotipo más pro-tumorigénico.

# **DISCUSIÓN GENERAL**



Los transportadores de nucleósidos juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los nucleósidos, permitiendo tanto la entrada como la salida de estas moléculas (Young et al. 2013). Además estos transportadores son esenciales en la internalización de determinados fármacos, actuando como biomarcadores de la sensibilidad o resistencia al tratamiento (Molina-Arcas et al. 2009). Actualmente, se han descrito nuevas funciones para estas proteínas relacionadas con la modulación de diferentes procesos celulares, en muchos casos no relacionados directamente con el transporte de nucleósidos. Así, algunos miembros de la familia génica *SLC* se han podido clasificar como transceptores, transportadores que de manera dependiente o independiente de transporte pueden modular funciones celulares, actuando como receptores (Pastor-Anglada & Pérez-Torras 2018a).

En este trabajo de tesis, el estudio de estas proteínas se ha centrado en dos de los tres miembros de esta familia, en concreto en los miembros *SLC28A1* (hCNT1) y *SLC28A2* (hCNT2). Las recientes evidencias que demuestran que algunos transportadores pueden ser a su vez transceptores, como es el caso de hCNT1, nos ha llevado a evaluar el posible papel de estas proteínas en funciones que van más allá del transporte y metabolismo de los nucleósidos.

En base a los experimentos planteados para demostrar nuevas funciones accesorias para estos transportadores y dada la importancia a la hora de trabajar con modelos celulares que se asemejen lo máximo posible a las condiciones fisiológicas reales, el primer reto al cual nos enfrentamos para el estudio de hCNT1 y hCNT2 fue el de encontrar modelos celulares que retuvieran dicha expresión.

Tal y como era de esperar los hepatocitos primarios demostraron retener la expresión de ambos transportadores, si bien no se pudo detectar su actividad. Estos resultados correlacionarían con el hecho constatado de que el grado de diferenciación celular condiciona los niveles de expresión de los transportadores concentrativos de nucleósidos (Aymerich et al. 2005) y de que su pérdida durante los procesos tumorales podría tener efectos en diferentes vías de señalización durante el cambio de fenotipo celular. Así mismo, todas las líneas celulares establecidas que fueron analizadas habían perdido su expresión. Este hecho nos llevó a analizar el papel de estas proteínas más

allá de su función como transportadores determinando el efecto de la restitución de la expresión de estas proteínas en modelos tumorales que lo han perdido.

El estudio de estos transportadores se ha realizado en modelos de dos tumores gastrointestinales. Para el estudio de hCNT2 se escogió un modelo de hepatocarcinoma ya que ambas proteínas se expresan en hígado sano de forma abundante al contrario que hCNT3, y además su expresión se perdería en tumores hepáticos. En el caso de hCNT1, su función se analizó en un modelo de adenocarcinoma ductal pancreático donde previamente se había demostrado el papel de transceptor de esta proteína (Pérez-Torras et al. 2013) y donde además su expresión también se pierde tanto a nivel de mensajero (Bhutia et al. 2011) como a nivel de proteína (datos propios no publicados).

En concreto, el estudio de hCNT2 y su papel como regulador del metabolismo tumoral se planteó desde dos perspectivas diferentes. Por un lado, analizando como las condiciones que caracterizan los tumores pueden estar modulando su expresión y por otro como la restitución de la expresión del transportador podría estar modulando el metabolismo energético celular.

En nuestro modelo celular de hepatocarcinoma tanto los niveles de oxígeno como los diferentes sustratos glucolíticos a los cuales las células tienen acceso se encuentran regulando la expresión y actividad del transportador hCNT2. Cabe destacar que estos dos factores se modulan durante la transformación neoplásica. Por un lado, la proliferación descontrolada de las células tumorales limita los niveles de oxígeno creando un ambiente hipóxico (Muz et al. 2015) mientras que los requerimientos energéticos de estas células aumentan necesitando un elevado aporte de glucosa (Fadaka et al. 2017). Así, no se puede descartar que durante los procesos tumorales ambos condicionen de una manera u otra la expresión y actividad del transportador y que la pérdida de su expresión sea la combinación de una suma de factores. De todas maneras, para llevar a cabo el análisis exhaustivo de la regulación de la expresión del transportador sería necesario realizar experimentos complementarios de silenciamiento de hCNT2 en una línea que retuviera dicha expresión. Además, para ser un buen modelo se debería disponer de una línea no tumoral para que el silenciamiento estuviera simulando el proceso de pérdida de expresión que se da

durante la transformación celular. Esta aproximación no se ha podido llevar a cabo en líneas celulares y aunque se intentó realizar el silenciamiento hepático en un modelo *in vivo*, este no resultó efectivo.

Respecto a la posible función como transceptor, el estudio de hCNT2 se centró en la regulación del metabolismo energético basándonos en su interacción con Aldolasa B, enzima implicada en la glucólisis. El efecto de la restitución de la expresión de esta proteína en modelos celulares de hepatocarcinoma humano no demostró un cambio significativo de los niveles de lactato y ATP, parámetros que permiten determinar el tipo de metabolismo que predomina en las células. Es necesario considerar el hecho de que estos metabolitos se encuentran regulados por muchos factores, desde la densidad de los cultivos celulares que modula los niveles de lactato que las células producen (Bereiter-Hahn et al. 1998) hasta la presencia de glutamina en el medio que condiciona un metabolismo celular más mitocondrial (Jie Zheng 2012). En concreto, la glutamina es utilizada por la célula como fuente de energía mediante la potenciación de la fosforilación oxidativa y además resulta ser una fuente para procesos anabólicos en células tumorales a partir de la cual se pueden producir aminoácidos no esenciales y lípidos (Tong et al. 2009). Teniendo en cuenta estos factores, los experimentos para demostrar el papel de hCNT2 como regulador del metabolismo se realizaron también a diferente densidad celular así como en ausencia de glutamina pero en ningún caso se obtuvieron resultados concluyentes. Si las funciones de modulador metabólico de hCNT2 dependen de su interacción con Aldolasa B, sería necesario encontrar un buen modelo de expresión de esta enzima, dado que la disminución de su expresión es una de las características de los estados avanzados de hepatocarcinoma (Peng et al. 2008). Las células BCLC, aunque retienen la expresión, no presentaron niveles tan altos comparados con el cultivo primario de hepatocitos. De nuevo nos encontramos frente a la limitación de no poder analizar el efecto del silenciamiento de hCNT2 en un modelo no tumoral hepático en el que nos aseguraríamos unos niveles de expresión de Aldolasa B considerablemente elevados.

Por otro lado, el impacto de la restitución de la expresión de hCNT2 en las líneas BCLC-3 y BCLC-5 analizado mediante *microarray* demostró un efecto en la regulación transcripcional de alrededor de 100 genes en comparación con el gran impacto



causado por hCNT1, que resultó en la regulación de cerca de 2000 genes. Las vías de señalización relacionadas con el metabolismo de glucosa, lípidos y purinas fueron las que mostraron mayores cambios, reforzando así la hipótesis de que este transportador está implicado de algún modo en la modulación del metabolismo energético. Así, el análisis demostró un aumento en genes relacionados con el transporte y metabolización de la glucosa, pero no nos reveló cambios en enzimas que están determinando el destino de este sustrato. La metabolización de la glucosa por parte de las células BCLC en presencia de hCNT2 podría estar dirigida a la producción de lactato o a la obtención de energía por la fosforilación oxidativa. Si bien en los experimentos realizados estas células no demostraron un metabolismo exclusivamente aeróbico, el hecho de que la presencia de hCNT2 conlleve un aumento del transporte de glucosa y un aumento de la isoforma de HK2 nos indicaría un fenotipo asociado a un aumento de la glucólisis y por lo tanto más asociado a la proliferación tumoral. Respecto a estos resultados, una de las opciones que debe tenerse en cuenta reside en el hecho de que en este experimento se restituyó la función del transportador hCNT2 funcional y esta sobreexpresión podría estar causando un desbalance del *pool* de nucleósidos. Por eso se debería realizar el experimento con una versión del transportador hCNT2 capaz de unirse a su ligando pero sin capacidad de transportarlo, experimento equivalente al realizado para hCNT1 cuando se demostró sus funciones de transceptor (Pérez-Torras et al. 2013). El conjunto de todos estos resultados demuestra que si bien ninguno de los parámetros del metabolismo energético analizado se ha podido asociar de forma significativa a la restitución de hCNT2 sí que parecería que de forma global la restitución del transportador tiene un impacto en el metabolismo celular.

Nuestra hipótesis de trabajo general se ha basado en que las nuevas funciones transceptoras de estos transportadores podrían residir en una parte específica de su estructura, en concreto, en el gran dominio N-terminal intracelular que como ya se ha comentado, es una adquisición evolutiva presente solo en los organismos eucariotas. Por ello, dado que hCNT1 es el único transceptor demostrado hasta el momento, el estudio de este dominio se realizó con este transportador. El análisis del dominio N-terminal de hCNT1 sugeriría ser necesario para llevar a cabo sus funciones transceptoras aunque no puede descartarse la posibilidad de que se necesite la

proteína completa para su correcta función o que el transportador necesite estar en forma de trímeros. La trimerización de estas proteínas se ha descrito tanto para vcCNT (Johnson et al. 2012) como para hCNT3 (Stecula et al. 2017).

Durante el trabajo realizado en esta tesis también se ha podido demostrar la interacción del transportador hCNT1 con las proteínas RACK1 y RNF41. El hecho de que estas proteínas no estén relacionadas ni con la síntesis ni con la metabolización de los nucleósidos pone de manifiesto las diferentes funciones biológicas que este transportador puede tener en los diferentes tipos celulares. Así parecería que los cambios de expresión de hCNT1 y de sus proteínas de interacción estarían condicionando alteraciones en el interactoma que *a priori* deberían estar más reguladas. La pérdida de hCNT1 desplazaría la unión de sus proteínas de interacción hacia otras interacciones con funciones que podrían estar favoreciendo el proceso carcinogénico.

Las células tumorales presentan alteradas muchas vías de señalización que comportan cambios en los niveles de expresión de determinadas proteínas así como la expresión de genes del desarrollo que en las células adultas se encuentran silenciados (Monk & Holding 2001). Además, estas células tienen cambios en la organización del citoesqueleto, en la adhesión y en la migración celular. En relación a estas características, la expresión de FAK se ha visto aumentada en los procesos tumorales y su inhibición contrarresta la migración celular y en algunos casos induce apoptosis (Parsons 2003). Respecto a los niveles de RACK1, su expresión se ha visto alterada en los procesos tumorales pero los estudios revelan tanto un aumento como una disminución dependiendo del tipo de cáncer (Li & Xie 2014). Por lo tanto, los niveles de estas proteínas a su vez se encuentran modulados durante la transformación celular y por lo tanto la capacidad migratoria de las células tumorales dependería de los niveles de todas estas proteínas así como de las proteínas efectoras de estas vías de señalización. De este modo, podríamos pensar que la unión RACK1-FAK en lugar de hCNT1 promovería un fenotipo más agresivo facilitando la migración de las células tumorales.

Los experimentos de análisis global de los cambios génicos silenciando y restituyendo (Tesis doctoral Hamsa Banjer) la expresión de CNT1 han puesto de manifiesto el

impacto de la modulación de la expresión de este transportador de un modo complementario. Cambios en la expresión de genes relacionados con la migración celular pudieron observarse en el experimento de silenciamiento del transportador CNT1 en un modelo hepático. El efecto del silenciamiento demostró un aumento de genes relacionados con la reorganización del citoesqueleto, la polaridad ápico-basal así como genes implicados en la migración celular. Por lo tanto, la pérdida de expresión del transportador en un modelo no tumoral estaría contribuyendo a un fenotipo más migratorio. Además, el análisis por *microarray* de la restitución de la expresión de hCNT1 en las células tumorales BCLC demostró una disminución de marcadores de la transición epitelio-mesénquima como vimentina y vinculina (Liu et al. 2015; Li et al. 2014) junto con la disminución en la expresión de determinadas integrinas. Otra de las vías alteradas después del silenciamiento de CNT1 en un modelo *in vivo* resultó ser la vía de Wnt, con un aumento en la expresión de genes activadores de esta vía. Una de las dianas de esta vía es el factor de transcripción c-myc (Zhan et al. 2017), que curiosamente se encontró significativamente disminuido después de la restitución del transportador hCNT1 en las líneas BCLC. Todos estos datos deben ser validados por otras técnicas pero el conjunto de resultados parecería atribuir al transportador hCNT1 un papel relevante en el proceso carcinogénico.

El conjunto de los experimentos realizados durante esta tesis doctoral nos permiten anticipar nuevas funciones para los transportadores hCNT1 y hCNT2. Además, estas funciones no se encuentran *a priori* relacionadas con el transporte ni el metabolismo de los nucleósidos, confiriendo a estas proteínas nuevas funciones relevantes en la biología tumoral. El estudio enfocado hacia la interacción entre estos transportadores con otras proteínas y su consiguiente efecto biológico resulta esencial a la hora de caracterizar estos transportadores como transceptores.

## **CONCLUSIONES**



- Los transportadores hCNT1 y hCNT2 se expresan en hígado humano y su expresión en hepatocitos primarios en cultivo muestra niveles comparables, aunque en ningún caso se observa una retención de su actividad de transporte. Ninguna línea celular establecida, ya sea derivada de tumores o inmortalizada, retuvo la expresión de estos transportadores.
- Condiciones de hipoxia, así como la presencia o concentración de distintos sustratos glucolíticos, regulan la expresión y la actividad del transportador hCNT2.
- La restitución de la expresión del transportador hCNT2 en las líneas derivadas de hepatocarcinoma BCLC-3 y BCLC-5 tiene un impacto metabólico si bien no ha sido posible demostrar hasta el momento efectos funcionales significativos.
- El estudio del dominio N-terminal de hCNT1 sugiere que su presencia es necesaria aunque no suficiente para inducir las funciones de transceptor descritas para este transportador.
- La disminución de la capacidad migratoria asociada a la restitución de hCNT1 depende en parte de su interacción con Rack1 provocando una menor activación de la quinasa FAK al desfavorecer su unión a Rack1.
- La proteína RNF41 interacciona con el transportador hCNT1 modulando su expresión y actividad.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## **1 Cultivos celulares**

El cultivo celular es un proceso por el cual las células se mantienen fuera del organismo de origen en condiciones controladas con el fin de preservar sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Los cultivos primarios proceden de células disgregadas a partir de los tejidos de un organismo manteniendo las características originales aunque su uso en el tiempo resulta limitado dado que entran rápidamente en senescencia.

Las líneas celulares, en cambio, se generan experimentalmente mediante transformación o provienen de células tumorales y poseen capacidad ilimitada de proliferación lo que permite realizar experimentos más a largo plazo teniendo siempre en cuenta la pérdida por parte de estas células del control de proliferación y de su susceptibilidad a padecer cambios fenotípicos que difieren del tejido de origen.

### **1.1 Mantenimiento de cultivos celulares**

En el mantenimiento de los cultivos celulares se hace necesario garantizar al máximo las condiciones de esterilidad y evitar contaminaciones por organismos no deseados. Por ello siempre se trabaja en una cabina de flujo laminar vertical y se desinfecta con etanol al 70% tanto su superficie como todo el material utilizado (siempre autoclavado previamente). Las células se mantendrán en un incubador con atmósfera controlada a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> con una humedad relativa del 95%.

El tipo de procedimiento empleado en el mantenimiento de los cultivos varía en función de si las células crecen en monocapa o en suspensión. Todas las células empleadas en esta tesis crecen en monocapa.

Los medios de cultivo son esenciales en el mantenimiento de cultivos celulares dado que aportan los nutrientes necesarios para la supervivencia celular y generalmente se suplementan con el aminoácido glutamina, suero para compensar la falta de factores circulantes y con una combinación de antibióticos para evitar contaminaciones.

Además, es necesario el replaqueo de dichos cultivos cuando estos alcanzan entre un 80 y un 90% de confluencia con tal de evitar el arresto del ciclo celular o su diferenciación, garantizando de este modo una mayor viabilidad a lo largo del tiempo. Debe tenerse en cuenta que el proceso de replaqueo puede provocar la acumulación de mutaciones y la consiguiente senescencia de las mismas, por lo que siempre será necesario la amplificación y congelación de alícuotas de células a pase bajo.

### **1.1.1 Tripsinización y replaqueo**

Para llevar a cabo la tripsinización con el fin de separar las células de su soporte de crecimiento se utiliza una combinación de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0.05% Trypsin - EDTA (1X), Gibco), enzima proteolítica del grupo de las serina proteasas y un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente. Estos compuestos permiten debilitar y romper las uniones célula-célula.

Para tripsinizar las células, se aspira el medio de cultivo con una pipeta pasteur estéril y se lavan las células con 5 mL de PBS 1X estéril ( $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3 mM, pH 7.4). Esto permite eliminar restos de suero que puedan interferir con la acción de la tripsina. Una vez aspirado el PBS se añade 1 ml de tripsina asegurándose de que toda la monocapa entra en contacto con el agente disgregante. La placa se incuba a 37°C hasta que las células empiezan a deshaderirse de la placa.

Con tal de parar el efecto de la tripsina, se debe añadir como mínimo el mismo volumen de medio de cultivo. Es necesario replaquear las células con una dilución apropiada para que en 3 o 4 días de cultivo puedan alcanzar de nuevo la confluencia del 80-90%. Para ello se disgregan las células con una pipeta de plástico y se añade 1 mL de la dilución de las células a otra placa que contenga 9 mL de medio fresco. Por último, cada dos días se procederá a renovar el cambio de medio de la placa.

### **1.1.2 Congelación y descongelación**

Siempre que se trabaja con líneas celulares se debe tener en cuenta el número de pases que tienen, dado que a medida que estos aumentan se acumulan mutaciones que pueden estar provocando cambios fenotípicos y por consiguiente resultados no

reproducibles. Es por ello que en el laboratorio siempre existe un *stock* de alícuotas de todas las líneas celulares congeladas a pase bajo.

El proceso de congelación implica el uso del agente crioprotector dimetil sulfoxido (DMSO) para mantener la viabilidad celular. Hay que tener en cuenta que este agente usado en concentraciones superiores al 2% y a temperatura ambiente es citotóxico, por ello se debe proceder con rapidez tanto en el proceso de congelación como de descongelación. El medio de congelación consiste en suero suplementado con un 10% de DMSO.

Para llevar a cabo la congelación, se tripsinizan las células y se centrifugan 4 minutos a 1200 rpm en un tubo de 50 mL. A continuación, se aspira el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en 1 mL de medio de congelación. El volumen se añade en un criovial que se depositará en un contenedor de células con isopropanol para permitir la congelación gradual de las mismas. El criovial se guardará a -80°C un mínimo de 4 horas y un máximo de 1 mes para luego almacenarlo a -196°C en un tanque de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células, el criovial se descongela a 37°C en un baño y el volumen se transfiere a un tubo de 50 mL. A continuación, se centrifuga 4 minutos a 1200 rpm, se aspira el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en medio fresco para su posterior plaqueo.

## **1.2 Líneas celulares utilizadas**

### **1.2.1 Línea celular HEK293**

La línea celular HEK293 deriva de células de riñón embrionario humano (*human embryonic kidney*, HEK) y fue obtenida de la ATCC (nº CRL 1573). Esta línea se ha utilizado dada su gran eficiencia de transfección lo que permite el estudio heterólogo de los genes de interés. Además, previamente en el laboratorio, ha sido utilizada para generar líneas celulares que expresen de manera estable los transportadores concentrativos de nucleósidos (HEK293-hCNT1, HEK293-hCNT2, HEK293-hCNT3 y el control HEK293-pCDNA5). Esta herramienta ha resultado muy útil, dado que un factor

limitante reside en la obtención de células que retengan la expresión de estos transportadores.

Condiciones de Cultivo: el medio utilizado es DMEM suplementado con FBS 10%, glutamina 2 mM y 1% penicilina/estreptomicina. Las HEK293 crecen muy rápido y para el mantenimiento deben subcultivarse antes de que lleguen a confluencia en una dilución 1:10–1:12.

### **1.2.2 Línea celular HEK293T**

Esta línea celular deriva de la anterior con la diferencia que expresa el antígeno T del virus SV40 capaz de unirse a vectores de expresión con *enhancers* SV40 para aumentar la expresión génica. Esta línea celular se ha utilizado para la producción de los virus adenoasociados.

Condiciones de Cultivo: el medio utilizado es DMEM suplementado con FBS inactivado 10%, glutamina 2 mM y 1% penicilina/estreptomicina. Las HEK293T crecen muy rápido y para el mantenimiento deben subcultivarse antes de que lleguen a confluencia en una dilución 1:10-1:12.

### **1.2.3 Líneas celulares BCLCs**

Las líneas celulares BCLC-3 y BCLC-5 han sido cedidas por el Dr. Jordi Bruix del IDIBAPS del Hospital Clínic de Barcelona, donde fueron generadas a partir de resecciones quirúrgicas de hepatocarcinoma humano.

Condiciones de Cultivo: El medio utilizado para su crecimiento es DMEM F-12, suplementado con 10% de FBS, glutamina 2 mM, piruvato sódico 200 mM, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales. Las líneas celulares BCLCs deben subcultivarse antes de que lleguen a confluencia en una dilución 1:4-1:6.

### **1.2.4 Línea celular NP-9**

La línea celular NP-9 deriva de adenocarcinomas pancreáticos humanos implantados en el páncreas de ratones atímicos y perpetuados como xenógrafos (Villanueva et al.

1998; Reyes et al. 1996). Esta línea se estableció en el Servicio Digestivo del Hospital de la Santa Creu y Sant Pau de Barcelona y fueron amablemente cedidas por el laboratorio de investigación gastrointestinal de dicho hospital.

Condiciones de Cultivo: El medio utilizado para su crecimiento es DMEM F-12, suplementado con 10% de FBS, glutamina 2 mM y 1% de penicilina/estreptomicina. La línea celular NP-9 debe subcultivarse antes de que lleguen a confluencia en una dilución 1:4-1:5.

### **1.2.5 Línea celular THLE-2**

La línea THLE-2 deriva de células de hígado sano inmortalizado con el antígeno T del virus SV40. Se obtuvieron de la ATCC (nº CRL-2706).

Condiciones de Cultivo: El medio utilizado para su crecimiento es BEGM, suplementado con 10% de FBS, EGF (5 ng/mL) y fosfoetanolamina (70 ng/mL). La línea celular THLE-2 debe subcultivarse antes de que lleguen a confluencia en una dilución 1:4-1:5.

### **1.2.6 Hepatocitos humanos**

Los hepatocitos primarios humanos han sido cedidos por Jordi Muntané (CIBERehd, Hospital Universitario Virgen del Rocío Sevilla). Se establecieron a partir de resecciones quirúrgicas de hígado sano de pacientes de cáncer colorrectal con metástasis hepáticas (Pichard et al. 2006).

## **1.3 Ensayos de viabilidad celular**

La viabilidad celular se ha determinado por el método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que se basa en la formación de cristales de formazán, de un color azul e insoluble en agua, después de la ruptura de la sal de tetrazolio. Esta reacción se da únicamente en células vivas mediante el enzima succinato deshidrogenasa.

Las células se siembran en placas de 96 pocillos a una densidad determinada dependiendo de la línea celular y se realizan como mínimo 4 pocillos por cada

condición. El ensayo se realiza 72 horas después de sembrar. Para ello, se incuban las células con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de MTT (7.5 mg/mL) disuelto en PBS y medio de cultivo (1:9) y se incuban a 37<sup>o</sup> durante 1 hora. Los cristales se solubilizan con el solvente orgánico DMSO, a razón de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo una vez retirado el medio anterior. Seguidamente se procede a realizar la lectura espectrofotométrica a 550 nm de los cristales disueltos con un lector ELISA.

## **2 Técnicas de modificación de la expresión de proteínas**

Existen diferentes aproximaciones que permiten la modulación de la expresión proteica. Entre ellos encontramos los que conllevan la utilización de vectores adenovirales o de métodos químicos.

En esta tesis se ha llevado a cabo la sobreexpresión proteica con tres métodos diferentes: fosfato cálcico, lipofectamina o con vectores adenovirales dependiendo de la línea celular y de las características del experimento. En el caso del silenciamiento, se ha utilizado siempre el TransIT-siQUEST (Mirus).

### **2.1 Transfección con fosfato cálcico**

El método de transfección con fosfato cálcico se basa en la formación de precipitados de DNA y  $\text{Ca}^{2+}$  por uniones electrostáticas en una solución salina. Estos precipitados contienen el vector con material genético que codifica para la proteína de interés. Una vez internalizado por las células, este se queda en forma epicromosómica permitiendo su expresión transitoria. Este protocolo se ha utilizado para transfectar la línea celular HEK293, mientras que para el resto de líneas celular se ha utilizado lipofectamina.

Para este protocolo se utilizan dos tampones (esterilizados con filtro de 0.22  $\mu\text{M}$ ):

- Tampón Calcio (pH 6.95): 500 mM  $\text{CaCl}_2$  y 100 mM ácido N,N-Bis (2-hidroxietilo)-2-aminoetanosulfónico (BES).
- Tampón fosfato (pH 6.4): 280 mM NaCl, 0.75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.75 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Se siembran las células a una determinada densidad para que al día siguiente tengan una confluencia del 60% aproximadamente. Para llevar a cabo la transfección, se mezcla el DNA con agua, se añade el tampón de calcio y por último el de fosfato (Tabla 3). La solución se mezcla burbujeando con una pipeta y se deja reposar 15 minutos. Pasado este tiempo y habiendo previamente cambiado el medio a las células, se añade la solución gota a gota y 24 horas después se les cambia el medio por medio fresco.

	MW24	MW6	60 mm	100 mm
DNA ( $\mu\text{g}$ )	0.5	3.5	7	15
Agua ( $\mu\text{L}$ )	21.25	50	125	300
Calcio ( $\mu\text{L}$ )	21.25	50	125	300
Fosfato ( $\mu\text{L}$ )	42.5	100	250	600
Total ( $\mu\text{L}$ )	85	200	500	1200

Tabla 3. Condiciones de transfección con fosfato cálcico.

## 2.2 Transfección con Lipofectamina

La lipofectamina 2000 (Invitrogen) es un reactivo capaz de formar liposomas catiónicos que pueden unirse a moléculas cargadas negativamente como el DNA permitiendo así su internalización celular.

Las células se siembran para que al día siguiente alcancen una confluencia del 70-90%. Por un lado, se prepara un tubo con la lipofectamina en medio Opti-MEM y en otro tubo el DNA en Opti-MEM (Tabla 4). Se incuban por separado las 2 soluciones durante 5 minutos y se mezclan ambas soluciones durante 5 minutos más. Se cambia el medio a las células y la solución se transfiere gota a gota. 4 horas después se cambia el medio por medio fresco.



		MW24	MW6
Tubo 1	Lipofectamina ( $\mu\text{L}$ )	2.4	12
	Opti-MEM ( $\mu\text{L}$ )	25	125
Tubo 2	DNA ( $\mu\text{g}$ )	0.5	2.5
	Opti-MEM ( $\mu\text{L}$ )	25	125

Tabla 4. Condiciones de transfección con Lipofectamina.

### 2.3 Transfección con TransIT-siQUEST

El procedimiento que se describe a continuación explica el protocolo seguido para transfectar las células con siRNA utilizando el reactivo TransIT-siQUEST en placa MW6.

Se siembran las células para que al día siguiente alcancen una confluencia adecuada, entre un 60-80%. En un tubo se añaden 250  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM y 6  $\mu\text{L}$  de TransIT-siQUEST. A continuación, se añade una concentración de 100  $\mu\text{M}$  del siRNA y se incuba durante 15 minutos. Se cambia el medio a las células y se añade la mezcla gota a gota. 24 horas después se cambia el medio por medio fresco.

Los siRNA que hemos utilizado son Silencer® Select Pre-designed de Ambion. Para hCNT1 (*SLC28A1* ID: 4392421), CNT2 (*SLC28A2* ID: 4392422) y para RACK1 (*GNB2L1* ID: AM16704).

### 2.4 Transducción con adenovirus

Esta técnica permite sobreexpresar una proteína de interés gracias a adenovirus modificados que carecen de su ciclo lítico. Resulta una buena opción cuando las células no se transfectan adecuadamente con métodos químicos o cuando estos causan una elevada mortalidad celular.

Las células se siembran y al día siguiente se lleva a cabo la transducción. Se debe tener en cuenta que la transducción se tiene que realizar antes de las 24 horas post-siembra dado que el número de partículas víricas que se utiliza va en relación al número de

células sembradas. De esto modo nos aseguramos de que las células no se hayan dividido antes de la transducción.

Para transducir células adherentes con adenovirus, las células se mantienen en medio con FBS inactivado. Se prepara la concentración deseada de partículas víricas en el menor volumen posible de tal modo que al aspirar el medio de las células y añadir los virus, la monocapa quede totalmente cubierta. Se incuban las células durante 4 horas y pasado ese tiempo se retiran los virus y se añade medio fresco.

### 3 Técnicas de análisis de la expresión de proteínas

#### 3.1 Extracción de proteínas a partir de cultivos celulares

La extracción de proteínas puede realizarse a partir de cultivos celulares o a partir de tejidos. El método para obtenerlos es muy parecido, en el caso de los cultivos celulares el extracto se obtendrá a partir de una placa de células mientras que, en el caso del tejido, se empezará directamente disgregando en un tubo de manera mecánica y con la ayuda del tampón de lisis una parte del tejido de interés.

Tampones de lisis utilizados:

- NP40: 50 mM Tris (pH 7.4), 250 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM pirofosfato sódico, 50 mM NaF, 1 mM ortovanadato sódico y el cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini*, Roche).
- Fosforilados: 10 mM Tris (pH 7.4), 400 mM NaCl, 5 mM NaF, 10% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadato sódico, 0.5% NP40, 4 mM ditioneitol (DTT), cóctel de inhibidores de proteasas y cóctel de inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP, Roche). Este tampón preserva el estado de fosforilación de las proteínas.
- NEM (N-etilmaleimida): 50 mM Tris (pH 7.4), 250 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM pirofosfato sódico, 50 mM NaF, 1 mM ortovanadato sódico, el cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini*, Roche) y 50mM NEM. Este tampón permite inhibir las desubiquitininas para poder analizar el estado de ubiquitinización de las proteínas.

Para obtener los extractos proteicos, se lavan las placas con PBS 1X dos veces y seguidamente se congelan con nitrógeno líquido. A partir de aquí se trabajará en hielo con tal de evitar cualquier degradación proteica.

Se añade el tampón de lisis a la placa y con la ayuda de un *scraper* se recoge la suspensión celular en un tubo *ependorf*. Con tal de disgregar bien las células, se pasa una jeringuilla 25G como mínimo 10 veces hasta obtener una muestra homogénea. Se centrifuga la muestra a 4°C durante 15 minutos a 13200 rpm y se recoge el sobrenadante descartando el *pellet*. En el sobrenadante se encontrará el extracto proteico.

### **3.1.1 Valoración de la concentración proteica**

Para determinar la concentración proteica se ha utilizado el método Bradford. Este método colorimétrico se basa en el cambio de coloración en medio ácido de la solución comercial BIO-RAD Protein Assay Kit al unirse a los residuos básicos de las proteínas. Esta solución se diluye a razón de 1:5 en agua destilada.

Las muestras se diluyen en PBS a razón de 1:15 y 1:30 para que entren en la recta patrón y se cargan 10 µL de cada una de ellas por duplicado en una placa MW96. Paralelamente se prepara una recta patrón con la disolución acuosa al 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones de entre 0 y 500 µg/mL.

Se pipetea 200 µL por pocillo de la solución BIO-RAD y se mide la absorbancia de la recta patrón y de cada una de las muestras a 595 nm.

### **3.2 Electroforesis en SDS-PAGE**

El sistema más clásico para la resolución de mezclas de proteínas en función de su tamaño es la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Las proteínas se tratan con un tampón que contiene el detergente iónico SDS, confiriéndoles carga negativa. De este modo se mantiene la relación carga/masa constante por lo que cuando las proteínas se hacen correr por acción de

un campo eléctrico en una red formada por un polímero de acrilamida y bisacrilamida, estas se separan en base a su peso molecular.

Se preparan dos tipos de geles:

- Gel separador: Para 10 mL; 3.3 mL, 4 mL o 4.5 mL de la mezcla de acrilamida según se quiera al 10, 12 o 15% respectivamente, 2.5 mL de Tris-Base 1.5 M pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 0.1 mL de persulfato amónico (APS, BIO-RAD) al 10%, 4  $\mu$ L de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED, BIO-RAD) y agua hasta completar el volumen.
- Gel concentrador: Para 4 mL; 2.7 mL de agua, 0.67 mL de la mezcla de acrilamida, 0.5 mL de Tris 1 M pH 6.8, 40  $\mu$ L de SDS al 10%, 40  $\mu$ L de APS al 10% y 4  $\mu$ L de TEMED.

El gel concentrador permite el alineamiento de las proteínas a la entrada del gel separador gracias al tamaño del poro y a su pH más ácido mientras que en el gel separador es donde tendrá lugar la separación de las muestras propiamente dicha.

Además, también se necesita:

- Sistema Mini Protean 3 (BIO-RAD) y una fuente de voltaje.
- Tampón de electroforesis: Tris-Base 250 mM, Glicina 1.91 M y SDS al 1%.
- Estándares de peso molecular: *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BIO-RAD) que contiene marcadores entre 10 y 250 kDa.

Los extractos proteicos que se van a analizar se preparan teniendo en cuenta la concentración proteica que se quiere cargar en el gel y el volumen final de la muestra. Por regla general, se ha trabajado con una concentración proteica entre 20 y 40  $\mu$ g en un volumen final de 20  $\mu$ L. Con el objetivo de que las muestras puedan ser cargadas y visualizadas con facilidad, se utiliza un tampón de carga (5X) que confiere densidad y color a las muestras y suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol que desnaturaliza las proteínas.

- Tampón de carga 5X: 2% SDS, 20% glicerol, 0.01% azul de bromofenol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol y 2.5 mM Tris-HCL pH 6.8.

Antes de cargarlas, se desnaturalizan con un tratamiento térmico (30 minutos a 37°C o 5 minutos a 100°C). La electroforesis se realiza a 40 mA por gel de 1.5mm de grosor en presencia de tampón de electroforesis. El tiempo varía en función del peso molecular que se necesite detectar posteriormente.

### 3.3 Western Blot

Consiste en la transferencia electroforética de las proteínas separadas por la electroforesis hacia una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF Inmobilon-P, Millipore) para la posterior detección mediante anticuerpos específicos.

La membrana de PVDF se debe activar con metanol durante 15 segundos antes de poder utilizarla. Posteriormente se lava durante 2 minutos con agua Milli-Q y se deja en tampón de transferencia para su posterior utilización. El gel de la electroforesis también se deja en tampón de transferencia.

- Tampón de transferencia: Tris-Base 250 mM, Glicina 1.91 M y metanol al 20% (v/v).

Para montar el sistema de transferencia, se colocan 3 papeles Whatman, el gel, la membrana y otros 3 papeles Whatman entre dos esponjas. Este sándwich se coloca en la cubeta (Sistema de transferencia Mini-Protean 3, BIO-RAD) llena de tampón y en presencia de hielo. La transferencia se realiza a 180 mA durante 70 minutos.

Una vez acabada la transferencia, la membrana deberá incubarse 1 hora en tampón de bloqueo para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos.

- Tampón de bloqueo: 5% (p/v) de leche descremada en polvo disuelta en TBS-Tween 0.1%.
- Tampón TBS-Tween: 20 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (BIO-RAD), pH 7.6.

Posteriormente, se incuba la membrana con el anticuerpo primario específico contra la proteína de interés (Tabla 5) preparado en tampón de bloqueo. En el caso de utilizar anticuerpos primarios contra proteínas fosforiladas, el anticuerpo se prepara en BSA al 5% en TBS-Tween 0.1%.

El tiempo de incubación varía entre anticuerpos pero por lo general se realiza durante toda la noche a 4°C o durante 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este tiempo, la membrana se lava durante 5 minutos un total de 3 veces con TBS-Tween. A continuación, se incuba con el anticuerpo secundario en la solución de bloqueo durante 1 hora y finalizado este tiempo se vuelven a realizar los lavados. El anticuerpo secundario lleva conjugado una peroxidasa de rábano (HRP) que permitirá su detección. Para ello la membrana se incuba con el reactivo ECL (*Enhanced ChemoLuminiscent Method*, Biological Industries) compuesto por dos soluciones (A y B, 1:1) que contienen respectivamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y luminol (sustrato de HRP). La reacción catalizada por la peroxidasa da un producto quimioluminiscente que se detecta por una cámara fotográfica de elevada sensibilidad que genera una imagen digital Las-3000 (Fujifilm).

Proteína	Casa Comercial	Reactividad	Dilución	Especie	Peso Molecular
hCNT1	Santa Cruz	Humano, rata, ratón	1/500	Goat	72 kDa
hCNT1	Propio	Humano	1/500	Mouse	72 kDa
hCNT2	St. John's	Humano, rata, ratón	1/1000	Rabbit	72 kDa
Ubiquitina	Santa Cruz	Humano	1/1000	Mouse	9 kDa
RNF41	Santa Cruz	Humano	1/1000	Mouse	36 kDa
HA	Roche	Humano, rata, ratón	1/2000	Rat	tag + proteína
AKT	Santa Cruz	Humano	1/1000	Goat	60 kDa
pAKT (Ser473)	Cell Signaling	Humano	1/1000	Rabbit	60 kDa
ERK 1/2	Promega	Humano	1/1000	Rabbit	42-44 kDa
pERK	Cell Signaling	Humano, rata, ratón	1/1000	Rabbit	43 kDa
Actina	Sigma	Humano	1/1000	Rabbit	42 kDa
RACK1	BD Bioscience	Humano	1/1000	Rat	36 kDa
FAK	BD Bioscience	Humano	1/1000	Mouse	125 kDa
pFAK (Tyr397)	Cell Signaling	Humano, rata, ratón	1/1000	Rabbit	125 kDa

Tabla 5. Lista de anticuerpos primarios utilizados.

### 3.4 Inmunoprecipitación/Co-Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación permite aislar una proteína determinada o identificar posibles interacciones entre proteínas, en este último caso hablamos de Co-Inmunoprecipitación. Estos métodos contemplan el uso de un anticuerpo específico que se unirá a nuestra proteína de interés y que además muestra afinidad por proteínas A o G que están acopladas a bolas de sefarosa (Figura 50.). De este modo y mediante centrifugación, se podrá obtener el complejo anticuerpo-proteína para su posterior análisis mediante *Western Blot*.

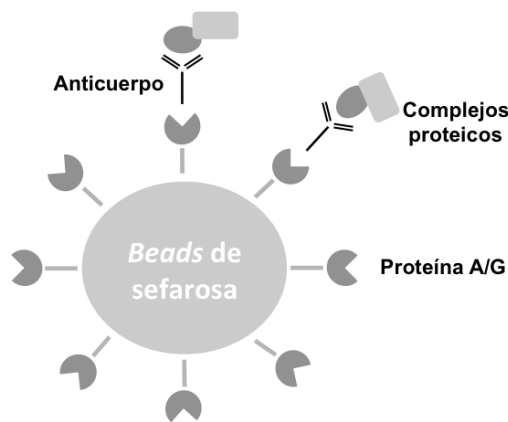


Figura 50. Esquema del funcionamiento de una inmunoprecipitación.

El procedimiento experimental consiste en incubar en un *ependorf* 500  $\mu\text{g}$  de extracto proteico junto con el anticuerpo primario de la proteína en cuestión (en general 2  $\mu\text{g}$  totales). Todo se lleva a un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  con tampón de lisis y se incuba a 4°C durante toda la noche en agitación.

Antes de añadir los 15  $\mu\text{L}$  de bolas de sefarosa, se lavan con tampón de lisis un total de 3 veces centrifugándolas 3 minutos a 5000 rpm entre cada lavado. Se resuspenden en tampón de lisis (1 resina: 1 tampón) y posteriormente se añaden al extracto los 30  $\mu\text{L}$  resultantes. Se incuba durante 3 horas a 4°C en agitación.

Pasado el tiempo de incubación, se centrifuga el *ependorf* 3 minutos a 5000 rpm y se recoge el sobrenadante. A continuación, se realizan 3 lavados con tampón de lisis y se resuspende el *pellet* en 25  $\mu\text{L}$  de tampón de carga 2X. Esta muestra junto con 20  $\mu\text{g}$  de

sobrenadante será lo que se analizará mediante electroforesis y posterior inmunodetección.

En el caso de la Co-Inmunoprecipitación, después de realizar la IP de la proteína de interés, se realiza la inmunodetección de proteínas que puedan estar unidas a ella.

#### 4 Ensayos de migración

Para los ensayos de migración se ha utilizado el sistema RTCA (*Real-Time Cell Analysis*) xCELLigence. Este sistema permite monitorizar a tiempo real, por medio de electrodos de oro, la impedancia de un cultivo celular. Se utilizan placas CIM (*Cell Invasion and Migration*) de 16 pocillos que contienen microporos y que se acoplan en la parte inferior con otra placa que contiene el medio quimioatrayente. Los electrodos se encuentran integrados en la parte exterior de los pocillos donde se siembran las células (Figura 51).

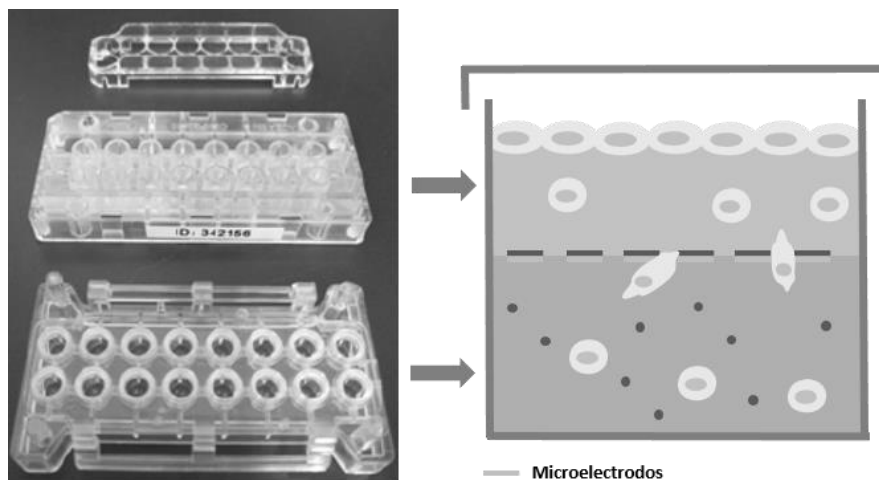


Figura 51. Placas y funcionamiento del método xCELLigence.

Los pocillos de la placa donde se siembran las células deben tratarse previamente con colágeno IV (Sigma, 5  $\mu\text{g}/30\mu\text{L}$ ) durante 30 minutos a razón de 30  $\mu\text{L}$  por pocillo. El tratamiento se aplica en ambas caras de los pocillos de modo secuencial. Una vez acabada la incubación, se descarta el volumen y se añaden 30  $\mu\text{L}$  de medio sin suero en el pocillo y 160  $\mu\text{L}$  de medio con 10% de FBS en la placa inferior. La placa se deja una hora en el aparato para que se establezcan las conexiones y se realiza el



*background*. Posteriormente, se siembran 40.000 células en 100  $\mu\text{L}$  totales, se esperan 30 minutos y la placa se introduce en el RealTime Cell Analyzer (RTCA) station (xCELLigence System, Roche, Mannheim, Germany).

La migración celular hacia los pocillos que contienen el quimioatrayente se monitoriza continuamente por cambios en la impedancia. Los valores se analizan con el Software RTCA 2.0 y se representan como el índice celular (*Cellular Index*, CI) durante un tiempo determinado.

## 5 Transporte de nucleósidos

Para medir la actividad de los transportadores de nucleósidos se utiliza el método de captación de sustratos radioactivos en células en cultivo. La radioactividad incorporada por las células se determina en dos medios diferentes, uno sodio y otro colina. Dado que los transportadores concentrativos de nucleósidos son dependientes de sodio, la diferencia entre el transporte en medio colina (transportadores equilibrativos + difusión + unión inespecífica) y en medio sodio reflejará el transporte mediado por los transportadores concentrativos.

Para realizar el ensayo se mezcla sustrato marcado radioactivamente con el mismo sustrato no marcado y la concentración total de estos debe ser del orden de la  $K_m$  del transportador a estudiar. Además, el ensayo debe realizarse en condiciones de velocidad inicial ( $V_0$ ), evitando tiempos en los que el transportador esté saturado donde valoraríamos el acúmulo.

Para realizar inhibiciones de los transportadores por exceso de sustrato, se realiza el transporte en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de nucleósido frío además del medio radioactivo que contiene nucleósido frío (1  $\mu\text{M}$ ) y nucleósido marcado (1  $\mu\text{Ci/mL}$ ) en medio sodio y colina.

### 5.1 Medios de transporte

- Medio Sodio: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM Hepes, 100  $\mu\text{L/L}$  Rojo fenol. Se ajusta a pH 7.4 con Tris- Base.

- Medio Colina: 137 mM ChoCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM Hepes, 400 µL/L Rojo fenol. Se ajusta a pH 7.4 con Tris-Base.
- Medio Stop: 137 mM NaCl, 10 mM Hepes, 200 µL/L Rojo fenol. Se ajusta a pH 7.4 con Tris-Base.
- Medio Radioactivo: Nucleósido frío (1 µM) y nucleósido marcado (1 µCi/mL) en medio sodio o colina.

## 5.2 Transporte de nucleósidos en células en monocapa

Antes de realizar el transporte, las células sembradas en placa de MW24, se lavan con medio sodio o colina un total de dos veces. En el último lavado se aspiran bien los pocillos y a continuación se incuban con 240 µL de medio de transporte durante 1 minuto. Pasado el tiempo de incubación, se lava la placa dos veces con medio Stop frío.

Para analizar la radioactividad incorporada por las células, se añade a cada pocillo 100 µL de solución de lisis (Tritón X-100 y 0.5 NaOH 100 mM) durante 1 hora en agitación. Después con la ayuda de una pipeta se disgrega y se homogeniza bien cada pocillo.

Se recogen 10 µL de lisado celular para medir la concentración de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA, apartado 4.4) y los restantes 90 µL se utilizan para medir la radioactividad de las muestras. Para ello se recogen en viales que contienen 3 mL de líquido de centelleo (Ecoscint™ H, National Diagnostics).

Por último, se recogen 5 µL de cada medio radioactivo estándar en 3 mL de líquido de centelleo para determinar la actividad específica (AE).

## 5.3 Cálculos

El transporte en medio sodio incluye el transporte dependiente e independiente de sodio y la difusión. El medio colina en cambio, proporciona exclusivamente las tasas de transporte independiente de sodio y la difusión. La diferencia entre ambos medios indica el transporte mediado por los transportadores concentrativos de nucleósidos.

Los viales que contienen las muestras radioactivas y los correspondientes estándares se miden en un contador beta con un programa de desintegraciones por minuto de tritio.

Se calcula la AE del medio de transporte según la fórmula:

$$AE \text{ (dpm/pmol)} = \frac{\text{dpm estándar}}{\text{Volumen estándar} \cdot [\text{sustrato}]}$$

Se calcula la actividad de la muestra:

$$\text{Actividad (pmol/mg proteína)} = \frac{\text{dpm muestra} \cdot 1000}{AE \cdot \text{Volumen muestra} \cdot [\text{proteína } \mu\text{g}/\mu\text{L}] \cdot \text{min}}$$

#### 5.4 Método del ácido bicinonónico (BCA)

El ensayo de BCA se basa en la reacción de Biuret, en la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  en condiciones alcalinas. Esta reacción es influenciada por cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina y triptófano) y también por la cadena peptídica. El reactivo BCA reacciona con el ión  $\text{Cu}^{1+}$  dando lugar a una coloración lila y que se determina espectrofotométricamente a 550 nm.

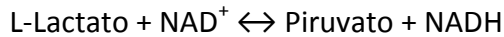
Para la recta patrón se prepara un banco de diluciones (125-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a partir de un *stock* de albumina en tampón Tritón-X100 0.5% NaOH 100 mM. Se pipetea 10  $\mu\text{L}$  por duplicado de la recta patrón y 10  $\mu\text{L}$  de muestra.

Para obtener el reactivo de BCA se mezcla la solución A y B a razón de 50:1 y se añade a cada pocillo 200  $\mu\text{L}$ . La placa se incuba durante 30 minutos a 37°C y se deja enfriar 10 minutos. Se mide la absorbancia de la recta patrón y de cada una de las muestras a 595 nm.

## 6 Técnicas relacionadas con el metabolismo celular

### 6.1 Determinación de los niveles extracelulares de lactato

La determinación de los niveles de lactato se basa en la siguiente reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH):



El método se basa en el aumento de absorbancia por la formación de NADH ( $\lambda=340$  nm). Dado que el equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la formación de lactato, se añade hidrazina de tal forma que al acomplejar el piruvato se desplaza el equilibrio hacia la formación de NADH.

Para llevar a cabo el experimento, se recoge el sobrenadante de las células sembradas en placas MW24 y se diluye 1/6 en agua. En paralelo se prepara un banco de diluciones de lactato (Sigma-Aldrich) en un rango de concentraciones entre 2 mM y 0.120 mM.

En una placa MW96 se añade a cada pocillo 11.5  $\mu\text{L}$  de agua y 18.5  $\mu\text{L}$  de muestra o patrón y 185  $\mu\text{L}$  de una mezcla 10:1 de tampón Hidrazina (0.5 M EDTA 12 mM, Sigma-Aldrich) con  $\text{NAD}^+$  (30.15 nM, Sigma-Aldrich).

Posteriormente, se prepara la LDH (1100 U/mg, Roche) diluida 1/4 con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.2 M (pH 6.5) y se añaden 5.25  $\mu\text{L}$  a cada pocillo. La placa se incuba durante 3 horas a 37°C. Se lee la absorbancia a 340 nm (Infinite 2000, TECAN) y se cuantifica la proteína de cada pocillo con tal de normalizar los valores obtenidos por proteína.

### 6.2 Determinación de los niveles intracelulares de ATP

Para determinar los niveles de ATP se ha utilizado ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Roche) que se basa en la siguiente reacción catalizada por la enzima luciferasa de *Photinus pyralis*:



La oxiluciferina emite luz con un pico máximo de emisión a  $\lambda=562$  nm, cuantificable mediante un luminómetro.

La determinación de los niveles de ATP se ha realizado en células sembradas en MW24. Para ello, se aspira el sobrenadante de cada pocillo y se realiza un lavado con PBS. A continuación, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de *Dilution Buffer* (kit) y se rasca con un *scraper*. Se separan 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra para posterior cuantificación de la proteína.

Se prepara la recta patrón con un banco de diluciones de ATP desde  $10^{-12}$  a  $10^{-5}$  y se cargan en una placa MW96 25  $\mu\text{L}$  de muestra o de patrón. A continuación, a cada uno de los puntos se añade un volumen 1:1 de *Cell Lysis Buffer* (kit) y se transfieren 50  $\mu\text{L}$  de esta mezcla a una placa de luminiscencia opaca de color blanco.

Se realiza la lectura de luminiscencia mediante un luminómetro con inyectores (Glomax de Promega) con los siguientes parámetros:

- Adición automatizada de 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de *Luciferase Reagent* (kit).
- Intervalo de un segundo entre la adición del *Luciferase Reagent* y el inicio de la lectura.
- Lectura integrada de 10 segundos.

## 7 Técnicas relacionadas con la manipulación de RNA

### 7.1 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA a partir de células en cultivo se ha utilizado el kit comercial *SV Total RNA Isolation System* (Promega). El protocolo consta de cuatro pasos para la completa purificación del RNA: la disrupción de las células o tejidos, desnaturalización de los complejos de nucleoproteínas, inactivación de la actividad de las ribonucleasas endógenas y la eliminación del DNA y proteínas contaminantes.

### 7.2 Cuantificación de RNA por espectrofotometría

La concentración del RNA se analiza a una longitud de onda de 260 nm, la máxima absorción que presentan los ácidos nucleicos. Las proteínas, en cambio, presentan un máximo de absorción a 280 nm por lo que resulta importante saber la relación  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ . La relación óptima entre estos dos valores se encuentra entre 1.8 y 2.0. Si

la relación es inferior a 1.8 indicaría una presencia excesiva de proteínas contaminantes mientras que si la relación es superior a 2.0 los ácidos nucleicos podrían estar degradados.

Para cuantificar los ácidos nucleicos se ha utilizado el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000*.

### 7.3 Síntesis de cDNA: retrotranscripción

Una vez aislado el RNA, se procede a transformarlo en DNA complementario (cDNA) para poder analizar los niveles mediante *Real-Time* PCR.

Para llevar a cabo la retrotranscripción se utiliza un enzima del virus de la leucemia murina de Moloney (transcriptasa reversa M-MLV) junto con una combinación de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y *random primers*.

Para la síntesis de cDNA se necesita 1 µg de RNA diluido en agua. En este primer paso el RNA se desnaturaliza a 65°C durante 5 minutos. Pasado este tiempo, la muestra se mantiene en hielo y se añade la siguiente mezcla:

- En tampón del enzima: DTT (10 mM), dNTPs (500 µM), Random Primers (10 µg/mL, Promega), RNAsin (0.75 U/µL, Promega) y M-MLVRT (7.2 U/µL, Gibco).

La reacción se incuba 2 horas a 37°C y se finaliza con la inactivación del enzima durante 10 minutos a 65°C.

### 7.4 Real-Time PCR

Con tal de analizar los niveles de expresión del gen de interés se ha utilizado el sistema Taqman de Applied Biosystems, basado en el uso de una sonda fluorogénica. La sonda contiene un marcador fluorescente en la posición 5' (*reporter*) y un reductor de la emisión en su extremo 3' (*quencher*). Cuando la sonda está intacta, la emisión de fluorescencia se mantiene inhibida. Por el contrario, cuando la sonda se une de manera específica a la región de ADN complementaria, la polimerasa degrada la sonda lo que resulta en un aumento de la señal fluorescente del *reporter*. En cada ciclo, se

liberan progresivamente más molecular de *reporter*, aumentando la fluorescencia de manera proporcional a la cantidad de amplicón producido.

La línea basal se determina durante los primeros ciclos de PCR donde no se observan cambios mientras que un aumento de la fluorescencia por encima de esta línea corresponde al producto de PCR acumulado. Se fija un límite (*threshold*) de fluorescencia por encima de la línea basal, de esta manera se denomina  $C_T$  (Ciclo límite) al ciclo en que la fluorescencia supera el umbral.

Para llevar a cabo la PCR, se necesita para cada reacción:

- Volumen final 20  $\mu$ L: Taqman Universal PCR Master Mix (2X), 2  $\mu$ L de cDNA, 7  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y la combinación sonda más *primers* (20X).
- Condiciones: 1 ciclo a 50°C 2 minutos, 1 ciclo a 95°C 10 minutos y 40 ciclos a 95°C 15 segundos y a 60°C 60 segundos.

Las sondas y *primers* utilizados se muestran en la Tabla 6 y Tabla 7.

Proteína	<i>Primers</i>	Sonda	<i>Quencher</i>
hCNT1	Fw: TGATTTCTTGGAAAGCCTGGA Rv: CTGCTCCTGATCTCTGCGG	FAM: AAGGCCAGCTCCCTAGGAGTGACTTGAG	TAMRA
hCNT2	Fw: AAGTAGAGCCTGAGGGAAGCAA Rv: GCCCAGTCCATCCCC	FAM: AGGACTGACGCACAAGGACACAGCC	TAMRA
hCNT3	Fw: GAGCTGTGCAAAGCAGGGA Rv: TGGAGAATCCTGCTCAACTGTG	FAM: CACACAAACACCAAACAGGATGAAGAACAGG	TAMRA
hENT1	Fw: GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA Rv: TTCATTGGTGGGCTGAGAGTT	FAM: CAGGCAAAGAGGAATCTGGAGTTTCAGTCTC	TAMRA
hENT2	Fw: CCCTGGATCTTGACCTGGAG Rv: GGTTTTCTGGCTTCTGGG	FAM: AGGAGCCGGAATCAGAGCCAGATGA	TAMRA

Tabla 6. Listado de las sondas de *Real-Time* PCR utilizadas en esta tesis, diseñadas por el software Primer Express de ABI y optimizadas en nuestro grupo.

Proteína/Gen	Assay ID	Sonda	Quencher
18S	4310893E	VIC	TAMRA
GUSB	431088E	VIC	TAMRA
GAPDH	4310884E	VIC	TAMRA
PPIA	Hs99999904_m1	FAM	NFQ
RACK1	Hs00272002_m1	FAM	NFQ
mENT1	Mm00452176_m1	FAM	NFQ
mENT2	Mm00432817_m1	FAM	NFQ
mCNT1	Mm01315368_m1	FAM	NFQ
mCNT2	Mm00445488_m1	FAM	NFQ
mCNT3	Mm00491586_m1	FAM	NFQ

Tabla 7. Listado de todas las sondas de *Real-Time* PCR utilizadas en esta tesis, diseñadas y validadas por ABI.

## 7.5 DNA microarray

Las células se sembraron a una densidad de  $5 \cdot 10^5$  células por placa de 60mm. Al día siguiente, se infectaron con AdControl o AdhCNT2 a 10 MOI durante 24 horas. El RNA se extrajo con el kit *miRNeasy Mini* (Qiagen) y el RNA obtenido se envió a la plataforma de análisis genómico donde se analizó usando el DNA *microarray* de Illumina *Human HT-12 V4 Bead Chip*.

## 7.6 RNA sequencing

El análisis por RNA *sequencing* se realizó con los tejidos hepáticos obtenidos en el experimento *in vivo*. El RNA se extrajo con el kit *miRNeasy Mini* (Qiagen) y se envió a la plataforma de análisis genómico donde se analizó usando el RNA *sequencing* de Illumina.



## 8 Técnicas relacionadas con la manipulación de virus adenoasociados

### 8.1 Generación de los virus

El diseño de los cuatro *short hairpins* RNA de los transportadores concentrativos de nucleósidos (uno para CNT1, dos para CNT2 y un control) en un vector adenoasociado derivado del serotipo AAV8 se realizó en colaboración con la Dra. Berasain (CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III).

Para la generación de los virus se han utilizado células HEK293T cultivadas en placas de 150 mm. Las células se siembran para que al día siguiente alcancen una confluencia de alrededor del 60% necesaria para llevar a cabo la correcta transfección. Previamente a la transfección, se cambia el medio a las células con 10 ml de DMEM al 2% de FBS sin antibiótico y se preparan los reactivos en dos tubos (Tabla 8).

Tubo 1	20 µg DNA
	55 µg pDP98.ape
	1 mL suero
Tubo 2	360 µg PEI
	760 µL suero

Tabla 8. Condiciones de transfección para la generación de los virus adenoasociados.

El DNA corresponde a los diferentes *short hairpins* utilizados mientras que el plásmido pDP98.ape (Plasmid Factory) proporciona las proteínas necesarias para la replicación y formación de los virus.

Los dos tubos se mezclan, se vortean y se añaden a las células gota a gota. Pasadas 4-6 horas se añaden 7 mL extra de medio y 48 horas después se recogen las células con la ayuda de un *scraper*. Para obtener el pellet que contiene los virus, se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos y se guarda a -80°C.

## 8.2 Purificación de los *stocks* virales

Para obtener los virus del interior de las células, el *pellet* se descongela y se congela en nitrógeno líquido un total de 3 veces. Posteriormente se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se filtra con un filtro de 45  $\mu$ m.

La purificación se realiza mediante la ultracentrifugación en un gradiente de densidad con diferentes concentraciones de iodixanol (Sigma).

En primer lugar, la solución que contiene los virus se incuba durante 30 minutos a 37°C con DNasa (10mg/mL) y RNasa (5 mg/mL). A continuación, se prepara el gradiente de iodixanol (Tabla 9).

%	Volumen (mL)	Iodixanol (mL)	PBSMK (mL)	NaCl 5M (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)
15	3	2.5	1.35	2	4.15
25	1.6	4.8	1.6	x	5.23
40	1.6	7.8	1.6	x	2.3
60	1	6	x	x	x

Tabla 9. Condiciones para preparar el gradiente de iodixanol.

En un tubo (Beckman) se va preparando el gradiente empezando por el porcentaje del 60% hasta llegar al del 15%. Por último, se pone la solución con los virus y se centrifuga el tubo a 36000 rpm durante 24 horas a 16°C (rotor basculante SW40 Ti, Beckman). En estas condiciones las partículas víricas se concentran en el punto de gradiente de densidad correspondiente a la densidad de la partícula viral y la banda blanquecina formada se obtiene pinchando con una aguja 21G. La fracción recogida que contiene los virus se lleva hasta 15 mL con PBS al 5% sacarosa y se hace pasar por un centrifugado centrifugando a 4000 rpm a 16°C. El proceso se repite un total de 3 veces dejando en el último lavado un volumen final de 1 mL en el que quedarán suspendidos los virus.

### 8.3 Cuantificación de los *stocks* virales

La extracción de DNA viral para su cuantificación se ha realizado con un kit (Roche) que permite la lisis del virus y su posterior purificación de posibles proteínas, sales e impurezas con una serie de lavados para, por último, eluir el DNA viral en agua.

Para la cuantificación se prepara una curva estándar con el plásmido utilizado al producir el virus y se realizan diluciones seriadas desde  $10^9$  a  $10^2$  a partir de un *stock* de  $10^{10}/2\mu\text{L}$  y utilizando como control negativo agua.

Del mismo modo, se prepara la dilución del virus (1/10, 1/100, 1/1000) y se prepara la PCR de la siguiente manera:

- SyBr (10  $\mu\text{L}$ /pocillo)
- Primer hAAT Fw (15  $\mu\text{M}$ , 0.4  $\mu\text{L}$ /pocillo)
- Primer hAAT Rv (15  $\mu\text{M}$ , 0.4  $\mu\text{L}$ /pocillo)
- H<sub>2</sub>O (7.2  $\mu\text{L}$ /pocillo)

Primer hAAT Fw: CCCTGTTTGCTCCTCCGATAA

Primer hAAT Rv: GTCCGTATTTAAGCAGTGGATCCA

Finalmente se añaden 2  $\mu\text{L}$  de muestra a cuantificar por duplicado y se utiliza el sistema Taqman de Applied Biosystems para el análisis cuantitativo del DNA viral.

## 9 Técnicas utilizadas en los estudios *in vivo*

### 9.1 Animales de experimentación y condiciones del estabulario

Para los experimentos *in vivo* se han utilizado ratones C57BL/6 de 2 meses de edad. Todos los procedimientos se han realizado de acuerdo a las recomendaciones y el correcto uso de los animales de laboratorio aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del Parc Científic de Barcelona.

Los ratones se mantienen a una temperatura controlada de 22-24°C con un ciclo diario de luz/oscuridad de 12 horas con agua y comida *ad libitum*.

## **9.2 Inyección de virus adenoasociados**

Las partículas virales están diluidas en PBS 5% sacarosa estéril y se han inyectado a razón de  $2 \times 10^{11}$  en un volumen total de 100  $\mu\text{L}$  por la vena de la cola del ratón. Esta es una vía directa al hígado y además estos virus presentan un elevado tropismo hepático y su expresión está bajo la regulación de un promotor específico de hígado por lo que se espera una gran eficiencia del silenciamiento en este órgano.

## **9.3 Obtención de plasma y de órganos para posterior análisis**

Se han realizado extracciones de sangre por la cola del ratón a tres tiempos diferentes: antes de la inyección de los virus y a 10 y 20 días después de su inyección. La sangre se ha recogido en tubos capilares (Microvette, Sarstedt) y se han centrifugado durante 5 minutos a 2000 g. El sobrenadante correspondiente al plasma se ha recogido y guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El sacrificio y posterior extracción de los órganos se ha realizado 20 días después de la inyección de los virus. Para ello, los animales se sacrificaron mediante un exceso de  $\text{CO}_2$  y se extrajo el hígado, riñón y el tejido adiposo para su posterior análisis.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abdulla, P. & Coe, I.R., 2007. Characterization and functional analysis of the promoter for the human equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 26(1), pp.99–110.
- Abou-rjaily, G. a et al., 2004. CEACAM1 modulates epidermal growth factor receptor – mediated cell proliferation. *October*, 114(7), pp.944–952. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/21786> [Accessed September 4, 2018].
- Adams, D.R., Ron, D. & Kiely, P.A., 2011. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell communication and signaling : CCS*, 9(1), p.22.
- Aguer, C. et al., 2011. Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS ONE*, 6(12), pp.1–11. Available at: [www.plosone.org](http://www.plosone.org) [Accessed July 30, 2018].
- Ahn, K.J. et al., 2009. Evaluation of the Role of Hexokinase Type II in Cellular Proliferation and Apoptosis Using Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(9), pp.1525–1532. Available at: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.108.060780>.
- Aird, K. & Zhang, R., 2015. Nucleotide Metabolism, Oncogene-Induced Senescence and Cancer. *Cancer Letters*, 29(10), pp.204–210.
- Arimany-Nardi, C. et al., 2017. Identification and Characterization of a Secondary Sodium-Binding Site and the Main Selectivity Determinants in the Human Concentrative Nucleoside Transporter 3. *Molecular Pharmaceutics*, 14(6), pp.1980–1987.
- Arterburn, L.M. et al., 1995. A morphological study of differentiated hepatocytes in vitro. *Hepatology*, 22(1), pp.175–187. Available at: <https://aasldpubsonline.wiley.com/doi/pdf/10.1002/hep.1840220128> [Accessed July 13, 2018].
- Aymerich, I. et al., 2006. Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *Journal of Cell Science*, 119(8), pp.1612–1621. Available at: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.02865>.



- Aymerich, I. et al., 2005. The concentrative nucleoside transporter family (SLC28): new roles beyond salvage? *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 1), pp.216–9. Available at: <http://www.biochemsoctrans.org/content/33/1/216.abstract>.
- 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(5), pp.505–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2234001&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Baldwin, S.A. et al., 2004. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), pp.735–743. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-003-1103-2>.
- Bereiter-Hahn, J., Münnich, a & Woiteneck, P., 1998. Dependence of energy metabolism on the density of cells in culture. *Cell structure and function*, 23, pp.85–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9669036>.
- Bertout, J.A., Patel, S.A. & Simon, M.C., 2008. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), pp.967–975. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2540>.
- Bhutia, Y.D. et al., 2011. CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 71(5), pp.1825–1835.
- Bicket, A. & Coe, I.R., 2016. N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function. *Bioscience Reports*, 36(4), pp.e00376–e00376. Available at: <http://bioscirep.org/cgi/doi/10.1042/BSR20160063>.
- Butura, A. et al., 2004. Differentiation of human hepatoma cells during confluence as revealed by gene expression profiling. *Biochemical Pharmacology*, 67(7), pp.1249–1258. Available at: [https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/S000629520300889X/1-s2.0-S000629520300889X-main.pdf?\\_tid=51fa0d2f-f417-43e8-93e6-731e8fbe88ea&acdnat=1532938274\\_c2fc43a8156bfcc20e9c7f791973ffa3](https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/S000629520300889X/1-s2.0-S000629520300889X-main.pdf?_tid=51fa0d2f-f417-43e8-93e6-731e8fbe88ea&acdnat=1532938274_c2fc43a8156bfcc20e9c7f791973ffa3) [Accessed July 30, 2018].

- Cano-Soldado, P. et al., 2012. Functional analysis of the human concentrative nucleoside transporter-1 variant hCNT1S546P provides insight into the sodium-binding pocket. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 302(1), pp.C257–C266. Available at: <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpcell.00198.2011> [Accessed May 31, 2018].
- Chaudary, N. et al., 2004. The adenosine transporter, mENT1, is a target for adenosine receptor signaling and protein kinase Cepsilon in hypoxic and pharmacological preconditioning in the mouse cardiomyocyte cell line, HL-1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310(3), pp.1190–1198. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org>. [Accessed July 16, 2018].
- Chiang, K.C. et al., 2015. WNT-1 inducible signaling pathway protein-1 enhances growth and tumorigenesis in human breast cancer. *Scientific Reports*, 5, pp.1–12. Available at: [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports) [Accessed September 4, 2018].
- Coothankandaswamy, V. et al., 2013. The plasma membrane transporter SLC5A8 suppresses tumour progression through depletion of survivin without involving its transport function. *Biochemical Journal*, 450(1), pp.169–178. Available at: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20121248>.
- Daemen, A. et al., 2015. Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32), pp.E4410–E4417. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1501605112>.
- DeBerardinis, R.J. & Chandel, N.S., 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*, 2(5), p.e1600200. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928883/pdf/1600200.pdf> [Accessed March 26, 2018].
- Denko, N.C., 2008. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), pp.705–713.
- Diallinas, G., 2017. Transceptors as a functional link of transporters and receptors.

- Microbial Cell*, 4(3), pp.69–73. Available at: <http://microbialcell.com/researcharticles/transceptors-as-a-functional-link-of-transporters-and-receptors>.
- Diamonti, a J. et al., 2002. An RBCC protein implicated in maintenance of steady-state neuregulin receptor levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), pp.2866–2871. Available at: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052709799](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052709799) [Accessed July 23, 2018].
- Donaton, M.C. V et al., 2003. The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 50(3), pp.911–929.
- Dostalek, M. & Stark, A., 2012. *Metabolism of drugs and other xenobiotics*, Wiley-VCH.
- Dragan, Y. et al., 2000. Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas. *Hepatology*, 32(2), pp.239–246.
- Duflot, S. et al., 2004. ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors. *Mol Cell Biol*, 24(7), pp.2710–2719. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15024061](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15024061).
- Einhorn, E., 2013. The scaffolding protein RACK1: multiple roles in human cancer. *Biosciences Master Reviews*, (Nov 2013), pp.1–9.
- Eltzschig, H.K. et al., 2005. HIF-1–dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11), pp.1493–1505. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213326/pdf/20050177.pdf> [Accessed July 16, 2018].
- Errasti-Murugarren, E. et al., 2012. Role of the Transporter Regulator Protein (RS1) in the Modulation of Concentrative Nucleoside Transporters (CNTs) in Epithelia. *Molecular Pharmacology*, 82(1), pp.59–67. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.111.076992>.

- 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), pp.795–803.
- Fadaka, A. et al., 2017. Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*, 3(2), pp.45–51. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452336417300420> [Accessed August 27, 2018].
- Fajas, L., 2013. Metabolic control in cancer cells. *Annales d'Endocrinologie*, 74(2), pp.71–73. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ando.2013.03.021>.
- Farré, X. et al., 2004. Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *International Journal of Cancer*, 112(6), pp.959–966.
- 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- $\beta$ 1-mediated mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), pp.13589–13598.
- Fernández-Veledo, S. et al., 2006. Bile acids alter the subcellular localization of CNT2 (concentrative nucleoside cotransporter) and increase CNT2-related transport activity in liver parenchymal cells. *Biochemical Journal*, 395(2), pp.337–344. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1422760/pdf/bj3950337.pdf> [Accessed July 16, 2018].
- Fernández-Veledo, S. et al., 2007. Transcription factors involved in the expression of SLC28 genes in human liver parenchymal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(2), pp.381–388.
- Ganapathy-kanniappan, S. & Geschwind, J.-F., 2013. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: *Molecular Cancer*, 12(1), pp.1–11. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4223729/pdf/1476-4598-12->

152.pdf [Accessed March 27, 2018].

Gatenby, R.A. & Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4(11), pp.891–899.

Giehl, R.F.H. & Von Wirén, N., 2015. Nitrate signalling: Functions of a nitrate transceptor. *Nature Plants*, 1(March), pp.1–2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nplants.2015.21>.

Gloeckner-Hofmann, K. et al., 2006. Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer. *Oncology*, 70(3), pp.238–244.

Govindarajan, R. et al., 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), pp.G570-80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536788&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

Govindarajan, R. et al., 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), pp.G910–G922. Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.90672.2008>.

Govindarajan, R. et al., 2007. In situ Hybridization and Immunolocalization of Concentrative and Equilibrative Nucleoside Transporters in the Human Intestine, Liver, Kidneys, and Placenta. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 293(5), pp.R1809–R1822.

Gray, J.H., Owen, R.P. & Giacomini, K.M., 2004. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), pp.728–734.

Hamilton, S.R. et al., 2001. Subcellular Distribution and Membrane Topology of the Mammalian Concentrative Na<sup>+</sup>-Nucleoside Cotransporter rCNT1. *Journal of*

- Biological Chemistry*, 276(30), pp.27981–27988.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>.
- Hasawi, N. Al, Alkandari, M.F. & Luqmani, Y.A., 2014. Phosphofructokinase: A mediator of glycolytic flux in cancer progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 92(3), pp.312–321. Available at: [http://www.croh-online.com/article/S1040-8428\(14\)00086-9/pdf](http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(14)00086-9/pdf) [Accessed April 9, 2018].
- Hediger, M.A. et al., 2013. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), pp.95–107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23506860> [Accessed March 20, 2018].
- Vander Heiden, M., Cantley, L. & Thompson, C., 2009. Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), pp.1029–1033. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849637/pdf/nihms165713.pdf> [Accessed April 12, 2018].
- Vander Heiden, M.G. & DeBerardinis, R.J., 2017. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168(4), pp.657–669. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5329766/pdf/nihms848132.pdf> [Accessed March 27, 2018].
- Helenius, A. & Aebi, M., 2017. Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science*, 291(April 2001), pp.2364–2370. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11269317](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11269317).
- Holbro, T. et al., 2003. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences*, 100(15), pp.8933–8938. Available at: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1537685100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1537685100) [Accessed July 23, 2018].
- Huber-Ruano, I. et al., 2010. Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 225(2), pp.620–630.
- Hyde, R.J. et al., 2001. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: Recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Molecular Membrane Biology*, 18(1), pp.53–63.
- Jaeken, J. & Matthijs, G., 2007. Congenital Disorders of Glycosylation: A Rapidly Expanding Disease Family. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 8(1), pp.261–278. Available at: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org) [Accessed July 20, 2018].
- Johnson, G.L. & Lapadat, R., 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), pp.1911–1912. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471242> [Accessed July 31, 2018].
- 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), pp.489–493. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10882>.
- Jordheim, L.P. et al., 2013. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(6), pp.447–464. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4010>.
- Jose, C., Bellance, N. & Rossignol, R., 2011. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(6), pp.552–561. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.012>.
- Karim, S., Adams, D.H. & Lalor, P.F., 2012. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J Gastroenterol*, 18(46), pp.6771–6781. Available at: <http://www.wjgnet.com/esps/http://www.wjgnet.com/1007->

9327/full/v18/i46/6771.htmDOI:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i46.6771>

[Accessed August 23, 2018].

Kiely, P.A. et al., 2009. Phosphorylation of RACK1 on tyrosine 52 by c-Abl is required for insulin-like growth factor I-mediated regulation of focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(30), pp.20263–20274.

King, A.E. et al., 2006. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), pp.416–425.

Klein, K. et al., 2009. Hepatocyte nuclear factor-4 and bile acids regulate human concentrative nucleoside transporter-1 gene expression. *Am J Physiol liver Physiol*, 296, pp.936–947.

Kohnken, R., Kodigepalli, K.M. & Wu, L., 2015. Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: Novel mechanisms and therapeutic implications. *Molecular Cancer*, 14(1), pp.1–11.

Komander, D., 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 37(5), pp.937–953. Available at: <http://www.biochemsoctrans.org/content/ppbiost/37/5/937.full.pdf> [Accessed July 23, 2018].

Kroemer, G. & Pouyssegur, J., 2008. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*, 13(6), pp.472–482.

Lacoste, C. et al., 2012. Iodide transporter NIS regulates cancer cell motility and invasiveness by interacting with the rho guanine nucleotide exchange factor LARG. *Cancer Research*, 72(21), pp.5505–5515.

Lane, A.N. & Fan, T.W.M., 2015. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 43(4), pp.2466–2485.

Li, J.J. & Xie, D., 2014. RACK1, a versatile hub in cancer. *Oncogene*, 34(15), pp.1890–1898. Available at: [www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc) [Accessed July 26, 2018].

Li, P. et al., 2015. Epithelial cell polarity determinant CRB3 in cancer development. *International Journal of Biological Sciences*, 11(1), pp.31–37. Available at:



- <http://www.ijbs.com/v11p0031.htm> [Accessed September 4, 2018].
- Li, R.N. et al., 2017. DACT1 Overexpression in type i ovarian cancer inhibits malignant expansion and cis-platinum resistance by modulating canonical Wnt signalling and autophagy. *Scientific Reports*, 7(1), p.9285. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-08249-7> [Accessed September 4, 2018].
- Li, T. et al., 2014. Loss of vinculin and membrane-bound  $\beta$ -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Molecular Cancer*, 13(1). Available at: <http://www.molecular-cancer.com/content/13/1/263> [Accessed September 4, 2018].
- Lin, L. et al., 2015. SLC transporters as therapeutic targets: Emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(8), pp.543–560. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4626>.
- Liu, C.-Y. et al., 2015. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6(18), pp.15966–15983. Available at: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/) [Accessed September 4, 2018].
- Mamidipudi, V. & Cartwright, C.A., 2009. A novel pro-apoptotic function of RACK1: Suppression of Src activity in the intrinsic and Akt pathways. *Oncogene*, 28(50), pp.4421–4433. Available at: [www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc) [Accessed July 31, 2018].
- Mathews, C.K., 2015. Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), pp.528–539. Available at: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/nrc3981.pdf> [Accessed May 31, 2018].
- Medina-Pulido, L. et al., 2013. Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells. *The Biochemical journal*, 454(3), pp.437–45. Available at: <http://www.biochemj.org/bj/454/bj4540437.htm> <http://www.biochemj.org/content/454/3/437.abstract>.
- Mihaylova, M.M. & Shaw, R.J., 2012. The AMP-activated protein kinase (AMPK)

- signaling pathway coordinates cell growth, autophagay, & metabolism. *Nature cell biology*, 13(9), pp.1016–1023.
- Molina-Arcas, M., Casado, F. & Pastor-Anglada, M., 2009. Nucleoside Transporter Proteins. *Current Vascular Pharmacology*, 7(4), pp.426–434. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-1611&volume=7&issue=4&spage=426>.
- Monk, M. & Holding, C., 2001. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene*, 20(56), pp.8085–8091. Available at: <http://www.nature.com/articles/1205088> [Accessed August 28, 2018].
- Muz, B. et al., 2015. The role of hypoxia in cancer progression angiogenesis metastasis and resistane to therapy. *Hypoxia*, 3, pp.83–92. Available at: <http://dx.doi.org/10.2147/HP.S93413> [Accessed August 27, 2018].
- Naifeh, J. & Bhimji, S.S., 2018. *Biochemistry, Carbohydrate, Aerobic Glycolysis*, StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262043> [Accessed August 21, 2018].
- Navale, A.M. & Paranjape, A.N., 2016. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews*, 8(1), pp.5–9. Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425736/pdf/12551\\_2015\\_Article\\_186.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425736/pdf/12551_2015_Article_186.pdf) [Accessed August 23, 2018].
- Pai, C.C. & Kearsey, S.E., 2017. A critical balance: dNTPs and the maintenance of genome stability. *Genes*, 8(2), pp.1–14.
- Parker, W.B., 2009. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chemical Reviews*, 109(7), pp.2880–2893. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476376> [Accessed March 20, 2018].
- Parsons, J.T., 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of cell science*, 116(Pt 8), pp.1409–1416.
- Pastor-Anglada, M. et al., 2001. Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Molecular Membrane Biology*,

18(1).

Pastor-Anglada, M. et al., 2007. Concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia: From absorption to cell signaling. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 63(1), pp.97–110.

Pastor-Anglada, M. et al., 2008. SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica*, 38(7–8), pp.972–994.

Pastor-Anglada, M. & Pérez-Torras, S., 2018a. Emerging roles of nucleoside transporters. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JUN), pp.1–8. Available at: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) [Accessed September 5, 2018].

Pastor-Anglada, M. & Pérez-Torras, S., 2015. Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Frontiers in Pharmacology*, 6(FEB), pp.1–14.

Pastor-Anglada, M. & Pérez-Torras, S., 2018b. Who Is Who in Adenosine Transport. *Frontiers in Pharmacology*, 9, p.627. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00627/full>.

Pastor-Anglada, M., Urtasun, N. & Perez-Torras, S., 2018. Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation. *Comprehensive physiology*, 9(37), pp.1–15.

Patra, K.C. et al., 2013. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell*, 24(2), pp.213–228. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3753022/pdf/nihms-502315.pdf> [Accessed April 11, 2018].

Peng, S.Y. et al., 2008. Aberrant expression of the glycolytic enzymes aldolase B and type II hexokinase in hepatocellular carcinoma are predictive markers for advanced stage, early recurrence and poor prognosis. *Oncology Reports*, 19(4), pp.1045–1053. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.19.4.1045> [Accessed August 27, 2018].

- Pennycooke, M. et al., 2001. Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(3), pp.951–959.
- Pérez-Torras, S. et al., 2013. Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner. *Cell Death and Disease*, 4(5), pp.1–9.
- Pichard, L. et al., 2006. Human Hepatocyte Culture. *Methods in Molecular Biology*, 320, pp.283–293.
- 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. *Biochemical Journal*, 442(3), pp.517–525. Available at: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20110605>.
- Pinilla-Macua, I., Claudio-Montero, A. & Pastor-Anglada, M., 2014. rCNT2 extracellular cysteines, Cys615 and Cys649, are important for maturation and sorting to the plasma membrane. *FEBS Letters*, 588(23), pp.4382–4389. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.10.006>.
- Reyes, G. et al., 1996. Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Research*, 56(24), pp.5713–5719. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/56/24/5713.full.pdf> [Accessed April 20, 2018].
- Ros, S. & Schulze, A., 2013. Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer & Metabolism*, 1(1), p.8. Available at: <http://cancerandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-3002-1-8>.
- Rose, J.B. & Coe, I.R., 2008. Physiology of Nucleoside Transporters: Back to the Future. *Physiology*, 23(1), pp.41–48. Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00036.2007>.

- Del Santo, B. et al., 2001. Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *Journal of Hepatology*, 34(6), pp.873–880.
- Santo, B.D. et al., 1998. Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology*, 28(6), pp.1504–1511.
- Dos Santos-Rodrigues, A. et al., 2014. Nucleoside transporters in the purinome. *Neurochemistry International*, 73(1), pp.229–237. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2014.03.014>.
- Shamir, E.R. & Ewald, A.J., 2015. Adhesion in mammary development: Novel roles for E-cadherin in individual and collective cell migration. *Current Topics in Developmental Biology*, 112, pp.353–382. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215314000295> [Accessed September 4, 2018].
- Shin, K., Wang, Q. & Margolis, B., 2007. PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Reports*, 8(2), pp.158–164. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1796763/pdf/7400890.pdf> [Accessed September 4, 2018].
- Snider, J. et al., 2013. Mapping the functional yeast ABC transporter interactome. *Nature Chemical Biology*, 9(9), pp.565–574. Available at: [www.nature.com/naturechemicalbiology](http://www.nature.com/naturechemicalbiology) [Accessed July 23, 2018].
- Soga, T., 2013. Cancer metabolism: Key players in metabolic reprogramming. *Cancer Science*, 104(3), pp.275–281.
- Solaini, G. et al., 2010. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6–7), pp.1171–1177. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.011>.
- Song, A. et al., 2017. Erythrocytes retain hypoxic adenosine response for faster acclimatization upon re-ascent. *Nature Communications*, 8, pp.1–13. Available at: [www.nature.com/naturecommunications](http://www.nature.com/naturecommunications) [Accessed July 16, 2018].

- Stecula, A. et al., 2017. Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 (hCNT3, SLC28A3) Forms a Cyclic Homotrimer. *Biochemistry*, 56(27), pp.3475–3483. Available at: <http://salilab>. [Accessed September 4, 2018].
- Stolarczyk, E. et al., 2010. Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 298(5), pp.E1078–E1087.
- Tao, Q.F. et al., 2015. Aldolase B inhibits metastasis through Ten-Eleven Translocation 1 and serves as a prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 14(1), pp.1–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-015-0437-7>.
- Thevelein, J.M. & Voordeckers, K., 2009. Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Molecular Biology and Evolution*, 26(11), pp.2407–2414.
- Tong, X., Zhao, F. & Thompson, C.B., 2009. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(1), pp.32–37. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2707261/pdf/nihms-124909.pdf> [Accessed April 19, 2018].
- Tóth, B., Krajcsi, P. & Magyan, R., 2014. Membrane transporters and transporter substrates as biomarkers for drug pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicity/adverse events. In *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier, pp. 947–963. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124046306000567> [Accessed February 14, 2018].
- Turano, C. et al., 2011. ERp57/GRP58: A protein with multiple functions. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 16(4), pp.539–563.
- Urtasun, N. et al., 2017. Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 8(52), pp.90185–90196. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163820><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5685741><http://www.oncotarget.com/f>

ulltext/21624.

Valdés, R. et al., 2006. TGF- $\beta$  transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(21), pp.2527–2537.

Villanueva, A. et al., 1998. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 17(15), pp.1969–78. Available at: <https://www.nature.com/articles/1202118.pdf> [Accessed April 20, 2018].

Vomastek, T. et al., 2007. RACK1 Targets the Extracellular Signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway To Link Integrin Engagement with Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), pp.8296–8305. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2169169/pdf/0598-07.pdf> [Accessed June 14, 2018].

Wallace, D.C., 2012. Mitochondria and Cancer. *Nat Rev, Cancer*, 12(10), pp.685–698.

Warburg, O. & Dickens, F., 1926. THE METABOLISM OF TUMORS. *The Journal of general physiology*, 8(6), pp.519–530. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2140820/pdf/519.pdf> [Accessed July 26, 2018].

Wright, M.D., Ni, J. & Rudy, G.B., 2000. The L6 membrane proteins--a new four-transmembrane superfamily. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 9(8), pp.1594–1600. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2144728/pdf/10975581.pdf> [Accessed September 4, 2018].

Yalcin, A. et al., 2009. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), pp.174–179. Available at: [https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/S0014480009000082/1-s2.0-S0014480009000082-main.pdf?\\_tid=0db7451d-6f39-4a6c-b632-](https://ac-els-cdn-com.sire.ub.edu/S0014480009000082/1-s2.0-S0014480009000082-main.pdf?_tid=0db7451d-6f39-4a6c-b632-)

001047273846&acdnat=1523276371\_3a95b75239343e9b9ebf54a81dd1173b

[Accessed April 9, 2018].

- Yao, S.Y.M. et al., 2011. Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), pp.32552–32562.
- Yen, L. et al., 2006. Loss of Nrdp1 enhances ErbB2/ErbB3-dependent breast tumor cell growth. *Cancer Research*, 66(23), pp.11279–11286.
- Young, J.D. et al., 2008. Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica*, 38(7–8), pp.995–1021.
- Young, J.D. et al., 2013. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), pp.529–547. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.007>.
- Zhan, T., Rindtorff, N. & Boutros, M., 2017. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), pp.1461–1473. Available at: [www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc) [Accessed September 4, 2018].
- Zhang, C. et al., 2013. Targeted metabolomics analysis of nucleotides and identification of biomarkers associated with chemotherapeutic drugs in cultured cell models. *Acta Pharmaceutica*, 25(6), pp.254–262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2013.06.002>.
- Zhang, J. et al., 2007. The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(1), pp.85–110.
- Zhou, M. et al., 2007. Molecular determinants of substrate selectivity of a novel organic cation transporter (PMAT) in the SLC29 family. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), pp.3188–3195.
- Zwanziger, D. et al., 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, pp.278–287. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.017> [Accessed July 23, 2018].





