



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio de la interacción de hCNT3 y QDPR como nexo funcional entre la recuperación de nucleósidos y sus vías biosintéticas

Andrea Valentina Prieto Carruyo

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

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

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

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE
hCNT3 Y QDPR COMO NEXO FUNCIONAL ENTRE
LA RECUPERACIÓN DE NUCLEÓSIDOS Y
SUS VÍAS BIOSINTÉTICAS

TESIS DOCTORAL
ANDREA VALENTINA PRIETO CARRUYO
2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorado en Biomedicina
Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular
Facultad de Biología
Universitat de Barcelona

**Estudio de la interacción de hCNT3 y
QDPR como nexos funcionales entre la
recuperación de nucleósidos y sus vías
biosintéticas**

Andrea Valentina Prieto Carruyo
2023

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA POR LA UNIVERSITAT DE
BARCELONA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOMEDICINA MOLECULAR
FACULTAD DE BIOLOGIA

Estudio de la interacción de hCNT3 y QDPR como nexo funcional entre la recuperación de nucleósidos y sus vías biosintéticas

Memoria presentada por
ANDREA VALENTINA PRIETO CARRUYO

La interesada,



Visto bueno de los directores,

Dr. Marçal Pastor Anglada
Catedrático de Bioquímica y Biología
Molecular
Departamento de Bioquímica y
Biomedicina
Molecular
Universitat de Barcelona

Dra. Sandra Pérez Torras
Profesora Lectora
Departamento de Bioquímica y
Biomedicina
Molecular
Universitat de Barcelona

A las segundas oportunidades
y a los nuevos comienzos

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a Marçal. No solo me abriste las puertas del laboratorio sin conocerme, sino que te preocupaste de que mi perfil fuera tomado en cuenta para entrar al Doctorado. ¡Gracias por la confianza y el apoyo todo este tiempo!. Sandra, ¡Aprendí tanto de ti! no tengo palabras para agradecer toda la guía, apoyo y las palabras de ánimo. En todo momento fuiste la luz al final del túnel. ¡Gracias! Sin ustedes dos yo no estaría hoy con mi tesis en mano.

A mis compañeras de laboratorio, ustedes hicieron muy chévere este paseo. Marta, nuestra propia rocola rosa, canción que suena, canción que cantas, y Judit, el sol más grande que tiene el departamento. Que gusto ser junto ustedes una de las "niñas". Nerea, que me aceptaste en tu lado a pesar de lo blanco de mi corazón y me dejaste ser DJ tantos días. Laura my fav dog mom (que espero que algún día sepas perdonarme las cucarachas xD soy buena persona!), Liska, mi compañera de drama latino, que junto a Jose Antonio (el otro caribeño del grupo) me hicieron sentir un poquito más cerca de mi tierra <3. Andrea II, la verdadera 1º de un ranking que hay por ahí jajaja y last but not least, Aida ¿qué hubiera hecho sin ti? la Ravenslaw más crack! Todos los pre-docs necesitan una post-doc como tú en su vida!!! Mi gente MPET: En cadascú de vosaltres he pogut trobar una gran persona. No oblidaré els bons moments, les rialles, els Dunkin Donuts (i galetes, xocolata, pastissos...) els vermutts i els "aaaaniimooo" "vinga, tu poots". **¡A tothom, gràcies per tant!**. Y por cierto, que quede constancia de que ha sido un honor liderar el ranking - poco objetivo- de maldad del laboratorio todo este tiempo. Que OJO, jamás se repitió, pero bueno...que les puedo decir... En este punto no puedo dejar de recordar a toda mi gente del IVIC. Al Dr. Reinaldo Marín, mil gracias por todo. A los que me hicieron sentir en familia cuando la mía estaba lejos, en especial a Edglo y JoseL. Ustedes me vieron crecer. Gracias por tantos años de amistad. Creo que una parte de mi se quedó en esa montaña, tantas risas, tantas penas, pero sobre todo tantos amigos y recuerdos inolvidables. Tía Gabi, hiciste crecer en mí el amor por la ciencia, vos sabéis que siempre habéis sido mi referente más grande. A mi familia, mami, papi, Armando y Vigi. Gracias por apoyarme y acompañarme en cada decisión que he tomado hasta ahora. Hoy soy la mujer que soy gracias a ustedes. Ivan, me habéis acompañado en las buenas y en las no tan buenas. Desde que comenzó esta aventura del doctorado (y no hablo del 2020, ¡esto se ha hecho largo!) vos habéis estado ahí apoyándome siempre, sin entender nada de lo que hacía, jajaja. Gracias por cuidarme y animarme de más en estos últimos meses, hiciste que todo fuera mucho más fácil <3. Por mucho tiempo pensé que no iba a volver a pisar un laboratorio, pero como da vueltas la vida...

ABSTRACT

Balanced nucleotide pools are essential to maintain cell integrity. Intracellular purine and pyrimidine availability rely on *de novo* nucleotide synthesis pathways and salvage reactions. These processes are finely regulated to meet cellular demands. Concentrative nucleoside transporters (hCNTs) are responsible for the uptake of nucleosides and play an important role in nucleoside salvage pathways. Among hCNTs, hCNT1 and hCNT3 are high affinity pyrimidine transporters, although hCNT3 can also translocate purines. Regulation of their expression depending on nucleoside availability has been poorly studied. Therefore, our aim was to study the effect of metabolic changes linked to purines and pyrimidine availability upon hCNTs regulation. Transcriptional studies demonstrated that hCNT1 modulation in response to nucleotide metabolic stress stimulus might be related to its transporter function. However, hCNT3 expression is determined by the presence of hCNT1. Furthermore, nucleotide metabolism relies on the formation of protein complexes and on protein interactions with enzymes from different metabolic pathways. Therefore, we studied hCNT3 interaction with quinoid dihydropteridine reductase (QDPR), previously identified in our laboratory as a hCNT3 partner. Since QDPR prevents tetrahydrofolate (THF) degradation, we hypothesized that the functional relationship between these two proteins could connect hCNT3 to folate metabolism and nucleotide metabolism regulation. Our results showing upregulation of hCNT3 by QDPR pointed toward that direction. In addition, interaction studies using a NanoBRET approach determined that QDPR and hCNT3 interaction can be modulated by the imbalance of intracellular nucleoside and not by extracellular nucleoside availability. QDPR deficiency is characterized by hyperphenylalaninemia and causes neurological disorders. We studied two cases of QDPR deficiency, caused by different QDPR variants. The first one, with the c.44T>C (p.V15A) variant, presented QDPR low activity and unaltered urinary pyrimidine levels. The second one c.295+2_295+3delTG / c.68G>A (p.G23D) variant, presented undetectable activity and altered urinary pyrimidine levels. These alterations suggest a functional link between hCNT3 and QDPR deficiency. We demonstrated that QDPR activity protecting THF from degradation conditions hCNT3 and QDPR interaction. These results suggest that hCNT3 plays a role in the etiology of QDPR deficiency. Our data suggests that the functional link between hCNT3 and QDPR is related to nucleoside and folate intracellular pools.

Key words: hCNT3, Nucleotides, QDPR, Concentrative Nucleoside Transporters (CNT), hCNT3, QDPR deficiency, Folate metabolism.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ACRÓNIMOS.....	1
Introducción	5
1. Nucleótidos y su metabolismo.....	6
1.1 Metabolismo de pirimidinas.....	8
1.2 Metabolismo de purinas	10
1.3 Regulación de los niveles de nucleótidos	12
2. Transportadores de nucleósidos	15
2.1 Transportadores concentrativos de nucleósidos.....	17
2.2 Transportadores equilibrativos de nucleósidos.....	19
2.3 Ubicación tisular y celular de los transportadores de nucleósidos	21
2.4 Regulación de los transportadores de nucleósidos	23
3. Metabolismo de la tetrahidrobiopterina.....	26
3.1 Deficiencia de QDPR	28
4. Metabolismo de un carbono	29
Objetivos.....	34
Materiales y métodos.....	37
1. Cultivo celular.....	38
1.1. Líneas celulares	38
1.2. Pasaje de células	39
1.3. Descongelado y criopreservación	40
1.4. Test de micoplasma	41
1.5. Inactivación del suero fetal bovino.....	41
1.6. Diálisis del suero fetal bovino	42
1.7. Transfección de ADN	42
1.7.1. Transfección con lipotransfectina.....	43
1.7.2. Transfección con lipofectamina 3000.....	44
1.8. Transfección de ARN-Silenciamiento	44
1.9. Tratamientos	45
2. Biología molecular.....	47
2.1. Diseño de primers y clonamiento	47
2.2. Mutagénesis sitio-dirigida.....	49
2.3. Vectores de clonamiento	50
2.4. Digestión y ligación	51
2.5. Preparación de bacterias competentes	53
2.6. Transformación y amplificación de plásmidos	54

2.7.	Obtención del ADN plasmídico de bacterias competentes	54
2.8.	Verificación del inserto	55
2.9.	Secuenciación.....	56
3.	Análisis de la expresión de ARN	57
3.1.	Extracción de ARN y cuantificación	58
3.2.	Síntesis de cDNA.....	58
3.3.	RT-qPCR – TaqMan	58
4.	Análisis de la expresión de proteína.....	61
4.1.	Extracción de proteína a partir de cultivos celulares.....	61
4.2.	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	62
4.3.	SDS-PAGE.....	62
4.4.	Western Blot.....	63
5.	Ensayo nanobret.....	65
5.1.	Optimización de la transfección.....	66
5.2.	Ensayo de saturación del donador (DSA).....	67
5.3.	Lectura.....	68
5.4.	Cálculos / Análisis de datos.....	69
6.	Ensayos de transporte de nucleósidos	70
6.1.	Medios de transporte y reactivos.....	70
6.2.	Transporte en células en monocapa	71
6.3.	Cuantificación de proteína.....	71
6.4.	Cálculo de la actividad específica	72
7.	Inmunofluorescencia	72
8.	Análisis de metabolitos (folatos – aminoácidos)	73
8.1.	Análisis de folatos totales y de 5-MTHF	74
8.2.	Análisis de aminoácidos por UPLC-MS/MS.....	74
9.	Análisis estadístico.....	74
	Resultados.....	77
	Bloque I: Regulación funcional de los transportadores concentrativos de pirimidinas hCNT1 y hCNT3.....	78
1.	Interacción entre oligómeros de hCNT1 y hCNT3.....	79
2.	Regulación transcripcional entre elementos del metabolismo de nucleósidos y los transportadores hCNT1 y hCNT3.	88
	Bloque II: Papel de QDPR en la regulación de hCNT3.....	100
1.	Estudio de la regulación entre hCNT3 y QDPR	104
2.	Papel de las biopterinas en la regulación de hCNT3 por QDPR	111
3.	Papel de los nucleósidos en la regulación de hCNT3 por QDPR	114
4.	Papel de los nucleósidos en la interacción entre hCNT3 y QDPR	119

5. Papel de elementos del metabolismo de los folatos en la interacción entre hCNT3 y QDPR	124
Bloque III: Implicaciones de la patología asociada a la deficiencia de QDPR en el metabolismo de nucleótidos.	135
1. Regulación de hCNT3 por una variante patológica de QDPR.....	137
Discusión general	154
Conclusiones	167
Bibliografía.....	170

LISTA DE ACRÓNIMOS

5-MTHF- 5-Metiltetrahidrofolato

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ADSL - Adenosuccinato liasa

AICAR - Ribonucleótido aminoimidazol-4-carboxamida

ALDH1L2 - Aldehído deshidrogenasa

AMP - Adenosina monofosfato

AMPK - Proteína quinasa activada por AMP

APRT - Adenina fosforibosiltransferasa

ARN - Ácido ribonucleico

ARNm - ARN mensajero

ATIC - 5-aminoimidazol-4-carboxiamida formiltransferasa AICART / IMP ciclohidrolasa

ATP - Adenosina trifosfato

BH₂ - Dihidrobipterina

BH₄ - 5,6,7,8-tetrahidrobipterina

BQR - Brequinar

CAD - Carbamoil-fosfato sintasa (CPS-II), aspartato carbamoil-transferasa (ATC) y dihidroorotasa (DHO)

CDS – Secuencia codificante

cél/pocillo - células por pocillo

Cyt - Citidina

CNT (h) - Transportador concentrativo de nucleósidos (humano)

CTP - Citidina tri-fosfato

dFBS - Suero fetal bovino dializado

DHF - Dihidrofolato

DHFR - Dihidrofolato reductasa

DHODH - Dihidroorotato deshidrogenasa

dNTPs - Desoxi nucleótidos trifosfatos

dTMP - Desoxi timidina monofosfato

ENT(h) - Transportador equilibrativo de nucleósidos (humano)

FBSi - Suero fetal bovino

FGAMS - Fosforibosil formilglicinamida sintetasa

GAPDH - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GART - Fosforibosil-glicinamida sintetasa (GARS)/glicinamida-ribonucleótido transformilasa (GARTfasa)/ fosforibosil-aminoimidazol sintetasa (AIRS)

GMP - Guanosina 5'-monofosfato

GTP - Guanosina tri-fosfato

HPA - Hiperfenilalaninemia

HPRT1 - Hipoxantina fosforibosiltransferasa

HT - HaloTag

IMP - Inosina 5'-monofosfato

IMPDH - Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa

LLC - Leucemia linfocítica crónica

mBU - BRET ratio

MTHFD - Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa

mTORC1 - Mammalian target of rapamycin complex 1

MTX - Metotrexato

MYTH - *Membrane Yeast Two Hybrid*

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NBTI - 4-Nitrobenzil)-6-tioinosina

NFκB - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NL- NanoLuc

NTPs - Nucleótidos trifosfatos

NTs - Transportadores de nucleósidos

PAICS - (fosforibosil-aminoimidazol carboxilasa (CAIRS)/fosforibosil-aminoimidazol succino-carboxamida sintasa (SAICARS)

PKU - Fenilcetonuria

PPAT - PRPP aminotransferasa

PRPP - 5-fosforibosa-1-pirofosfato

qBH2 - Dihidropterina quinoide

QDPR - Dihidropteridina reductasa quinoide

RNR - Ribonucleótido reductasa

SAM - S-adenosilmetionina

SHMT - Serina hidroximetil transferasa

siRNA - *Small interfering RNA*

SP - Sepiapterina

THF - Tetrahidrofolato

TMP - Timidina monofosfato

TYMS - Timidilato sintasa

UA - Unidades arbitrarias

UMP - Uridina monofosfato

UMPS - Uridina monofosfato sintasa

Urd - Uridina

WT - *Wild type*

ZMP - 5-Aminoimidazol-4-carboxamida

Introducción

1. Nucleótidos y su metabolismo

Los nucleósidos son moléculas esenciales para numerosos procesos celulares como la replicación del ADN, la síntesis de ARN, la señalización celular y como fuentes de energía metabólica. Ellos son compuestos orgánicos cuya estructura está formada por una base heterocíclica que contiene nitrógeno y una pentosa, que puede ser una ribosa para el ARN o una desoxirribosa para el ADN. Además de poder ser agrupados según la pentosa que posean en su estructura, los nucleósidos pueden clasificarse según el tipo de nucleobase. Estas nucleobases pueden ser purinas (adenina o guanina) o pirimidinas (citosina, timina o uracilo) (**Tabla 1**). La base estructural de los ácidos nucleicos son los nucleótidos, que no son más que nucleósidos con por lo menos un grupo fosfato unido. Según el grado de fosforilación pueden existir nucleótidos mono- di- o tri- fosfato.

	Base	Nucleósido	Nucleótido mono-fosfato (NMP)
Purinas	Adenina	Adenosina	Adenosina monofosfato (AMP)
	Guanina	Guanosina	Guanosina monofosfato (GMP)
Pirimidinas	Citosina	Citidina	Citidina monofosfato (CMP)
	Timina	Timidina	Timidina monofosfato (dTMP)
	Uracilo	Uridina	Uridina monofosfato (URD)

Tabla 1.- Nomenclatura de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos. dTMP: desoxi-nucleótido timidina monofosfato.

Las funciones de los nucleótidos van mucho más allá que solo formar parte del ARN o del ADN. Como energía, los nucleótidos trifosfatos (NTPs) participan en múltiples vías metabólicas aportando su grupo fosfato como fuente de energía química, principalmente el ATP, la principal molécula portadora de energía de la célula, y GTP. La CTP participa en la biosíntesis de fosfolípidos como la fosfatidilcolina y la UTP es partícipe del metabolismo de la glucosa ayudando, entre otras funciones, a la formación del precursor de glucosaminoglicanos (Egger y col., 2011), implicado en el mantenimiento de electrolitos y el balance de los fluidos en la matriz extracelular. También participa en la glicosilación de proteínas. La adenosina forma parte de cofactores enzimáticos como el NAD, FAD o la coenzima A y también, junto a GTP, puede ser segundo mensajero en forma de cAMP y cGMP, respectivamente. Además, la adenosina por si sola está

implicada en la regulación de la neurotransmisión, la función cardiovascular, la función renal y la respuesta inmunológica, gracias a su interacción con receptores purinérgicos (P1) de membrana plasmática (Burnstock 2017).

Para mantener las reservas de nucleótidos intracelulares, la célula puede obtener nucleótidos de dos formas distintas: las vías de síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas o las reacciones de salvamento. Estas últimas reaprovechan nucleósidos o nucleobases recuperados del entorno extracelular o producidos en el catabolismo de los ácidos nucleicos (Villa y col., 2019; Buj y Aird 2018). En estas vías los nucleósidos y nucleobases son rescatados por la acción de diferentes reacciones enzimáticas sencillas para generar ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos. En cambio, la síntesis *de novo* es un proceso energéticamente costoso que para cubrir su demanda de carbono y nitrógeno utiliza glutamina, aspartato y diferentes metabolitos generados en las vías metabólicas de la pentosa fosfato, serina-glicina y el metabolismo de un carbono. A través de la vía de las pentosas fosfato, mediante la generación de ribosa 5-fosfato, se produce la 5-fosforibosa-1-pirofosfato (PRPP), la forma activa de la ribosa, esencial no solo para la síntesis *de novo* sino también para las reacciones de recuperación de nucleobases. Del metabolismo de un carbono se obtienen los cofactores 10-formil-tetrahidrofolato y 5,10-metil-tetrahidrofolato (THF), utilizados para la síntesis de las purinas y de timidina monofosfato (dTMP), respectivamente. Generalmente, las reacciones de salvamento son la principal fuente de nucleótidos para células completamente diferenciadas o en reposo (Fairbanks y col., 1995), mientras que las células con alta tasa de proliferación, como las células cancerígenas o células del sistema inmunológico, deben apoyarse en la síntesis *de novo* para cubrir la demanda metabólica (Villa y col., 2019; Lane y Fan 2015; Tong y col., 2009).

La alteración del metabolismo de nucleósidos está vinculado a patologías como el cáncer, pero también a un gran número de enfermedades raras producidas por errores innatos del metabolismo que alteran la actividad de diferentes enzimas de las vías de biosíntesis (Villa y col., 2019; Garcia-Gil y col., 2018; Vander Heiden y DeBerardinis 2017; Balasubramaniam y col., 2014; Camici y col., 2010; Jurecka 2009; Jinnah 2009). Estas enfermedades raras pueden generar problemas renales, neuropatologías y defectos inmunológicos.

1.1 Metabolismo de pirimidinas

La síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas es una vía de 6 pasos catalizada por tres enzimas, dos de ellas con más de una función catalítica (**Figura 1**). La primera enzima, CAD forma un hexámero de dos trímeros (Moreno-Morcillo y col., 2017). Ella realiza las tres primeras reacciones de la vía gracias a sus cuatro dominios funcionales: glutamina amidotransferasa /carbamoil-fosfato sintasa (CPS-II), aspartato carbamoil-transferasa (ATC) y dihidroorotasa (DHO). La formación del anillo de pirimidina inicia en el citoplasma a partir de glutamina, bicarbonato y ATP, que después de tres reacciones secuenciales catalizadas por cada uno de los dominios de CAD, y habiendo gastado también un aspartato, genera el dihidroorotato (Rabinovich y col., 2015; Grande-García y col., 2014). Este dihidroorotato luego es convertido en ácido orótico por la segunda enzima de la vía, la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), una enzima ubicada en la membrana interna de la mitocondria. En esta reacción DHODH transfiere dos electrones a la coenzima Q a través de la ubiquinona en la cadena transportadora de electrones, asociando la vía de síntesis *de novo* de pirimidinas directamente con la cadena respiratoria (Mailloux 2015). Por último, el ácido orótico es transformado en dos reacciones a uridina monofosfato (UMP) por la enzima bifuncional uridina monofosfato sintasa (UMPS). El anillo de pirimidina es unido a un PRPP en la primera reacción de la UMPS. Estas dos últimas reacciones de la vía ocurren nuevamente en el citoplasma y es a partir del UMP que pueden formarse los nucleótidos CMP y dTMP. Como no existe un precursor ribonucleótido para el dTMP, este es sintetizado a partir de metilación del dUMP, catalizado por la timidina sintasa (TYMS), en una reacción que necesita del folato 5,10-metil-THF como cofactor. dUMP se forma a partir del dUTP o por desaminación del dCMP producto de la hidrólisis del ADN (Cory y Sato 1983).

Recientemente, fue demostrado que las tres enzimas de la vía de síntesis *de novo* de pirimidinas junto a la productora de aspartato, la glutamato oxalacetato transaminasa 1 (GOT1) y VDAC3 (*voltage-dependent anion-selective channel protein 3*) pueden formar un complejo multienzimático al que denominaron pirimidinosoma (Yang y col., 2023). Gracias a este complejo, las enzimas citoplasmáticas pueden conectarse con la DHODH en la membrana interna de la mitocondria, a través del canal VDAC3 ubicado en la membrana externa del organelo. La formación de esta estructura esta modulada por AMPK, que puede unirse directamente al pirimidinosoma y evitar su ensamblaje (Yang y col., 2023).

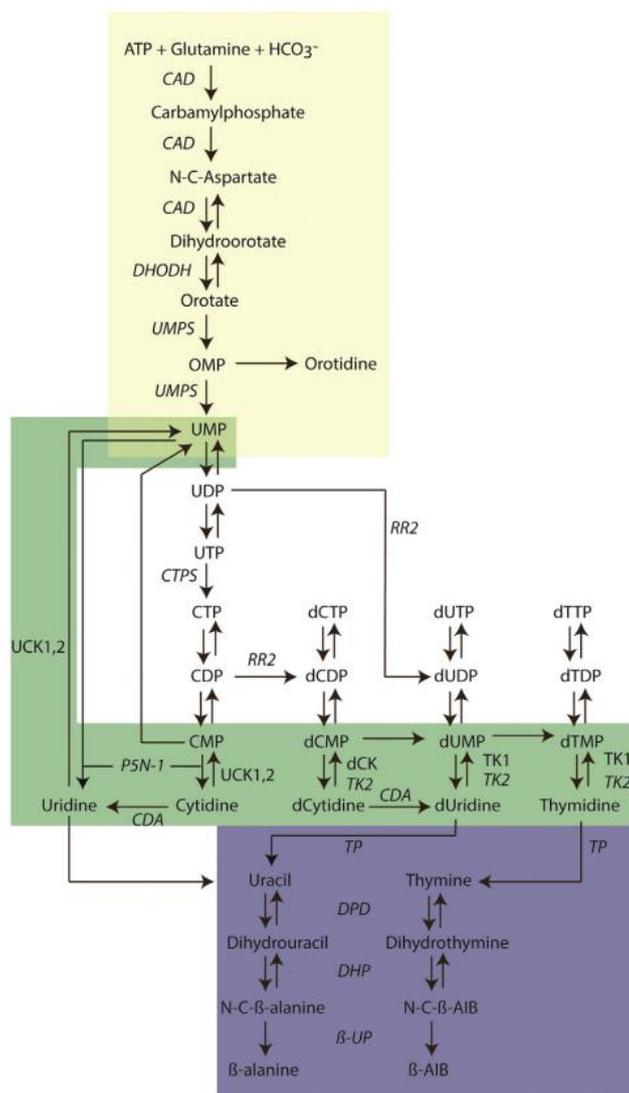


Figura 1.- Representación esquemática del metabolismo de las pirimidinas. Se representa en amarillo la síntesis *de novo* de las pirimidinas, hasta la formación de UMP. Las vías de salvamento están señaladas con fondo verde, mientras que las vías de degradación se muestran en morado. Acrónimos explicados en el texto. Tomado de Perez-Torras y col., 2019.

En células de mamífero, las nucleobases uracilo, citosina y timina no pueden ser recuperadas por enzimas fosforibosil transferasas (Li y col., 2007) ni pueden ser convertidas a orotato para entrar de nuevo a la vía de síntesis *de novo* y por eso las nucleobases de pirimidinas no son recuperadas de forma eficiente (Pérignon y col., 1987). La recuperación de las pirimidinas se logra por la fosforilación de los (d)nucleósidos para formar (d)NMPs en reacciones sencillas dependientes de ATP. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas uridina-citidina quinasa 1 y 2 (UCK1 y UCK2), desoxicitidina quinasa (dCK) y timidina quinasa 1 y 2 (TK1 Y TK2). La desoxicitidina y la citidina pueden ser convertidas en desoxiuridina y uridina por la

citidina desaminasa (CDA) respectivamente. Luego, la uridina puede ser fosforilada a UMP por la UCK. Este cambio de bases de C a U también puede ocurrir a partir de las formas monofosfato (Evans y Guy 2004).

La degradación del anillo de pirimidina genera metabolitos que pueden alimentar otras vías metabólicas. Las vías de degradación de las pirimidinas utilizan las mismas enzimas para todas las moléculas. dTMP y dUMP son desfosforilados hasta volver a generar sus nucleobases timina y uracilo. La citidina es desaminada a uridina y luego todas las bases son degradadas a β -alanina o β -aminoisobutirato (β -AIB). La β -alanina luego es convertida a malonil-CoA y es utilizada para la síntesis de ácidos grasos y la β -AIB es convertida en metilmalonil-CoA y luego a succinil-CoA y utilizada en el ciclo del ácido tricarboxílico.

1.2 Metabolismo de purinas

A diferencia de las pirimidinas, toda la síntesis de las purinas ocurre en el citoplasma. La síntesis *de novo* de las purinas es una vía de 10 reacciones enzimáticas secuenciales catalizadas por 6 enzimas diferentes (**Figura 2**). El objetivo de la vía es la formación de un anillo de purina directamente sobre la estructura de un fosforibosil pirofosfato (PRPP) y así generar una inosina 5'-monofosfato (IMP). En estos 10 pasos secuenciales de la vía, el anillo de purina es sintetizado a partir de varios sustratos tales como la glutamina, glicina, aspartato, bicarbonato y el 10-formil-THF. Después de su formación, el intermediario IMP puede ser convertido a guanosina 5'-monofosfato (GMP) o a adenosina 5'-monofosfato (AMP). La primera reacción de la vía convierte al PRPP, un producto de la vía de la pentosa fosfato, a 5-fosforibosilamina (PRA), en una reacción catalizada por la PRPP aminotransferasa (PPAT). Las dos reacciones siguientes son realizadas de forma secuencial por dos de los tres dominios funcionales de la enzima GART: la fosforibosil-glicinamida sintasa (GARS) y la glicinamida-ribonucleótido transformilasa (GARTfasa), que generan un ribonucleótido N-formilglicinamida (FGAR). Luego, en el cuarto paso se genera ribonucleótido N-formilglicinamida (FGAM) por la fosforibosil formilglicinamida sintasa (FGAMS). En este punto, el tercer dominio de GART, la fosforibosil-aminoimidazol sintasa (AIRS) genera un ribonucleótido aminoimidazol (AIR). Los siguientes pasos, seis y siete, son catalizados por otra enzima multifuncional, PAICS (fosforibosil-aminoimidazol carboxilasa (CAIRS) / fosforibosil-aminoimidazol succino-carboxamida sintasa (SAICARS), generando ribonucleótido N-succinocarboxamida-5-aminoimidazol (SAICAR). SAICAR luego es transformado a

ribonucleótido aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) por la enzima adenosuccinato liasa (ADSL). En los dos últimos pasos por la vía, catalizados ambos por acciones secuenciales de la 5-aminoimidazol-4-carboxiamida formiltransferasa AICART / IMP ciclohidrolasa (ATIC), generan 5-formamido-4-imidazol-carboxamida ribonucleótido (FAICAR) y luego inosina monofosfato (IMP).

Las purinas también pueden ser obtenidas a través de las reacciones de recuperación, que ocurren principalmente a partir de la adenina, guanina e hipoxantina. Estas nucleobases pueden ser fosforibosiladas a sus nucleótidos correspondientes en reacciones catalizadas por dos enzimas, la hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1), que cataliza la conversión de las nucleobases hipoxantina y guanina a IMP o GMP, respectivamente, y la enzima adenina fosforibosiltransferasa (APRT), que cataliza la conversión de adenina a AMP. Estas dos enzimas transfieren un PRPP a cada una de las nucleobases, por lo que la disponibilidad de esta molécula regula y vincula la síntesis *de novo* y la vía de salvamento.

La actividad de las enzimas de las vías de síntesis *de novo* de las purinas puede ser regulada por su estado de oligomerización. Por ejemplo, GART forma dímeros, PAICS octámeros, ADSL tetrámeros y ATIC está en equilibrio monómero-dímero, en función de la cantidad de sustrato presente en el medio (Vergis y col., 2001). Además, para que la síntesis *de novo* de las purinas pueda ocurrir, las enzimas de la vía deben formar en el citoplasma un complejo multienzimático transitorio y ordenado denominado purinosoma, capaz de formarse cuando hay un aumento en la demanda de purinas intracelulares (French y col., 2016; Chan y col., 2015; An y col., 2008). Esta estructura se ubica cerca de la mitocondria para aprovechar el ATP y los sustratos generados por el organelo para asegurar un correcto flujo metabólico por proximidad y por estabilización de productos intermediarios (De Vitto y col., 2021).

A diferencia de las pirimidinas, el anillo de las purinas no puede ser degradado, por lo que el catabolismo de las purinas lleva a la producción de ácido úrico que luego es excretado en la orina. El AMP debe ser convertido a IMP o adenosina para generar inosina y posteriormente hipoxantina. A partir de la guanina y de la hipoxantina pueden generarse xantina. El último paso, catalizado por la xantina oxidasa (XO), produce ácido úrico con producción en paralelo de peróxido de hidrógeno.

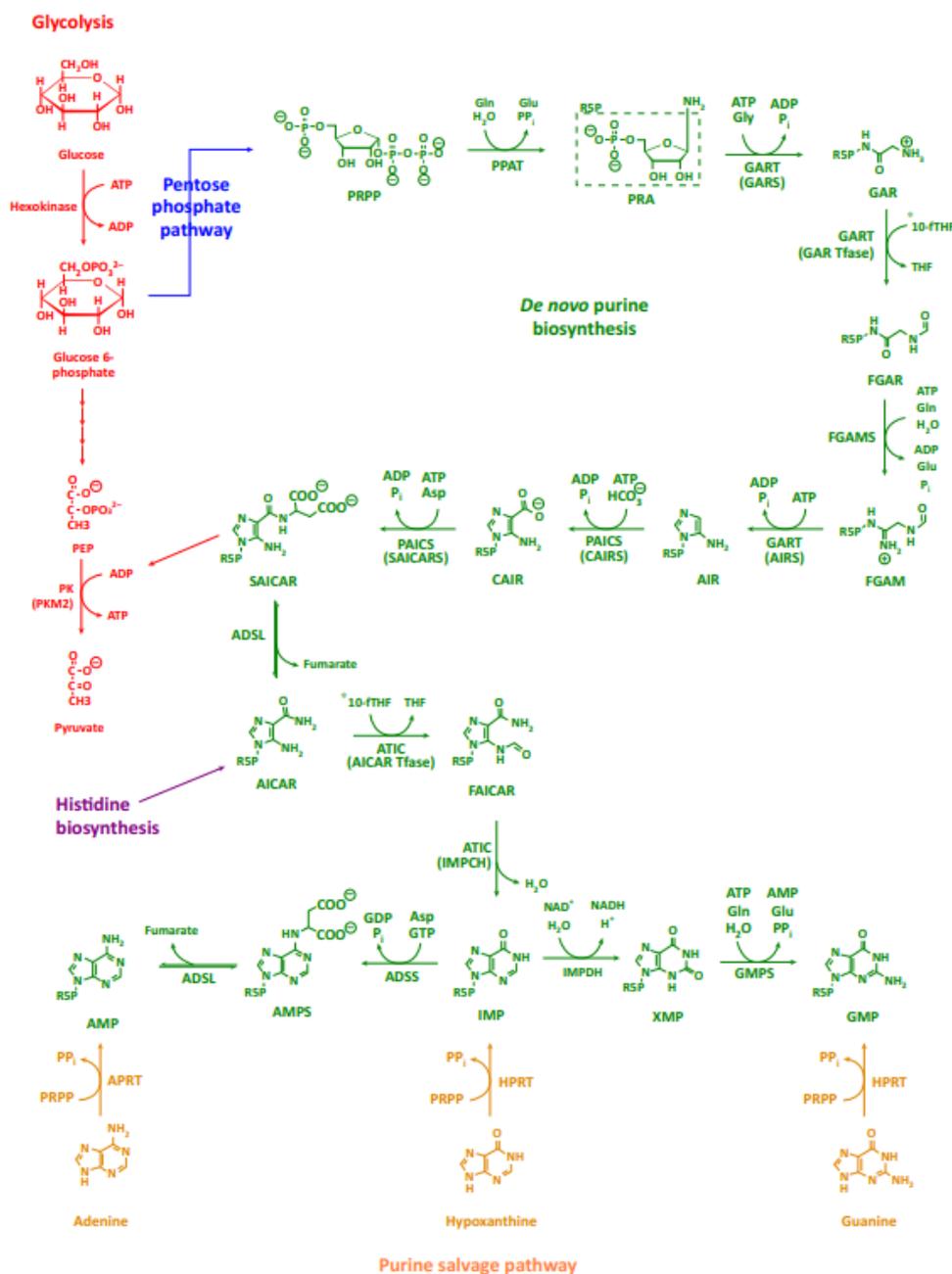


Figura 2.- Representación esquemática del metabolismo de las purinas. La glicolisis y la vía de las pentosas fosfato generan PRPP, indicado en color rojo. Se representa en verde la síntesis *de novo* de las purinas, hasta la formación de nucleósidos monofosfato. El salvamento de las purinas se da a partir de guanina, hipoxantina y adenina, siendo necesario también un PRPP, y están señaladas en color amarillo. Acrónimos explicados en el texto. Tomado de Pedley y Benkovic 2017.

1.3 Regulación de los niveles de nucleótidos

El mantenimiento de los niveles de nucleótidos y la rápida respuesta a los cambios en sus niveles son procesos a los que la célula debe responder rápidamente para mantener

su viabilidad y proliferación. Esto implica que los niveles de nucleós(t)idos citoplasmáticos deben ir variando en función de las necesidades celulares y en función del ciclo celular. Además, así como estas moléculas pueden ser necesarias para diferentes procesos metabólicos, las cantidades intracelulares de purinas y pirimidinas no son iguales. Existen diferencias en las concentraciones fisiológicas de cada uno de los cuatro tipos de NTPs y dNTPs y sus cantidades son finamente reguladas en función al ciclo celular y a las necesidades celulares (Traut 1994) para asegurar la proliferación y el crecimiento, y evitar el estrés metabólico.

El trabajo coordinado de dos enzimas permite a la célula mantener los niveles óptimos de dNTPs, en una regulación basada en síntesis y degradación y dependiente del ciclo celular. Cuando se sintetizan los nucleótidos trifosfatos (NTP), estos pueden ser utilizados para la síntesis de ARN. Sin embargo, para poder ser incorporados a las cadenas nacientes de ADN son necesarios dNTPs. Los dNDPs se obtienen en el citoplasma a partir de la reducción del grupo 2'-OH del anillo de ribosa de los NDPs por la enzima ribonucleótido reductasa (RNR) (Nordlund y Reichard 2006). RNR es una enzima hetero-tetramérica que consta de dos subunidades α que forman la proteína R1 y dos pequeñas subunidades β que forman la proteína R2. Estas proteínas pueden tener una regulación alostérica que responde a los niveles de ATP, dATP, dGTP y dTTP y que permite que se haga un ajuste en la especificidad de la enzima para los cuatro sustratos NDPs, en función de la necesidad metabólica (Hofer y col., 2012). Una vez reducidos los dNDPs, la enzima nucleósido difosfato quinasa (NDPK) puede convertirlos en dNTPs. Como ya se comentó, la síntesis de dTMP (un nucleótido único del ADN) se da por metilación del dUMP por la timidilato sintasa (TYMS) en una reacción dependiente de una unidad de un carbono. La síntesis de dTMP es regulada por la asociación y desplazamiento al núcleo de las enzimas que lo sintetizan al inicio de la fase S del ciclo celular. TYMS también es regulada a nivel transcripcional y a nivel de proteína en función del ciclo celular (Lan y col., 2018). Cuando la síntesis de ADN finaliza, los niveles de dNTPs deben ser regulados nuevamente, esta vez para remover el excedente y evitar daños celulares provocados por el desbalance en los reservorios. La enzima SAMHD1 es la encargada de degradar los dNTPs a su respectivo (d)nucleósido y a sus fosfatos (Powell y col., 2011; Goldstone y col., 2011), sobre todo en la fase G1 del ciclo celular, donde su expresión se ve aumentada (Franzolin y col., 2013).

Más allá de la acción de la RNR y de SAMHD1, existe una regulación a nivel de vías metabólicas de nucleósidos. Como ya se ha explicado anteriormente, las vías de síntesis de purinas y pirimidinas están activas durante los procesos de alta proliferación. Varias de las enzimas que participan en la vía de síntesis de las pirimidinas, pueden ser

reguladas de forma alostérica por diferentes productos de sus vías, como es el caso de las enzimas CAD y PPAT (Evans y Guy 2004; Graves, Guy, Kozlowski, Huang, Lazarowski, Pope, Collins, Dahlstrand, Earp, y col., 2000). El dominio funcional CPS de CAD puede ser inhibido por el producto final de la vía, el UTP, pero también puede ser activado alostéricamente por PRPP (Evans y Guy 2004). Los nucleótidos de adenina y de guanina también pueden controlar la vía de síntesis de las purinas en diferentes puntos. Algunas de las enzimas inhibidas alostéricamente por ellos son las enzimas PRPP sintetasa, y la PPAT, primera enzima de la síntesis *de novo*. AMP y GMP también pueden regular su síntesis a partir de IMP por inhibición de las enzimas ADSS y a IMPDH, respectivamente (Lane y Fan 2015). La PRPP sintetasa también puede ser activada por fosforilación durante la progresión del ciclo celular, a través de la actividad de CDK1 (Jing y col., 2019).

Un elemento importante en el mantenimiento de la homeostasis celular es mTORC1. Esta proteína quinasa puede controlar procesos de biosíntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, respondiendo rápidamente a cambios en los niveles de nutrientes y señales de crecimiento. La vía PI3K/AKT/mTORC1 es activada por factores de crecimiento y señales hormonales (Ali y Ben-Sahra 2023; Pareek y col., 2021). La p70 S6 quinasa, activada por mTORC1, puede activar por fosforilación a CAD (Ben-Sahra y col., 2013; Robitaille y col., 2013) y promover el metabolismo de un carbono para la producción de cofactores folatos necesarios para la síntesis de purinas y dTMP (Ben-Sahra y col., 2016). La GTPasa activadora de mTORC1, Rheb, también interactúa con CAD y aumenta su actividad (Sato y col., 2015). La actividad de mTORC1 al mismo tiempo puede ser regulada por los niveles de purinas (Hoxhaj y col., 2017; Emmanuel y col., 2017). Otras vías que regulan la expresión de genes de las enzimas del metabolismo de los nucleótidos son las vías de señalización MAPK, más específicamente a través de ERK, una vía que estimula la actividad de Myc (Ali y Ben-Sahra 2023). ERK puede fosforilar directamente a la enzima PFAS y así aumentar la vía de síntesis de las purinas.

Además de la regulación postraduccional, la biosíntesis de nucleósidos está regulada por diferentes factores de transcripción, entre los que destaca c-Myc, quien no solo controla los genes que codifican para las enzimas de las vías de síntesis *de novo* de los nucleótidos, sino también de las vías metabólicas que los alimentan (Sato y col., 2017; Liu y col., 2008; Mannava y col., 2008).

En la síntesis *de novo* de las purinas, c-Myc puede regular transcripcionalmente a PPAT y a PAICS (Mannava y col., 2008), y también puede aumentar la expresión de CAD,

UMPS y CTPS (CTP sintetasa) en la síntesis *de novo* de pirimidinas (Wang y col., 2021). Su mutación o sobreexpresión se asocia a una proliferación celular descontrolada y al desarrollo del cáncer como consecuencia de una reprogramación metabólica. En cáncer, la expresión de *MYC* esta frecuentemente alterada. Estudios multi-ómicos en cáncer colorectal demostraron que *MYC* regula la reprogramación metabólica global en tumores colorrectales, controlando la expresión de gran número de genes, sobre todo en etapas tempranas de la progresión tumoral (Satoh y col., 2017). Los genes afectados son partícipes de las vías de síntesis de purinas y pirimidinas, de la vía de las pentosas fosfato, las vías de oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de 1C, entre otras, así como los transportadores de estas vías (Satoh y col., 2017).

Recientemente se demostró que el desbalance en los niveles de nucleótidos puede inhibir la proliferación celular, sin alterar el crecimiento celular, pero este desbalance no es detectado por las vías de regulación metabólica clásicas como mTORC1, AKT o AMPK (Diehl y col., 2022). A pesar de que la depleción de nucleósidos puede inhibir el crecimiento celular y la proliferación, aún es incierto como las células son capaces de detectar los cambios en los niveles de nucleósidos.

2. Transportadores de nucleósidos

Para que la célula pueda reutilizar los nucleósidos y las nucleobases producto de la degradación de nucleótidos en otros tejidos o provenientes de la dieta, estos primeros deben ser internaizados por transportadores especializados. Los transportadores de nucleósidos (*Nucleoside transporters* - NTs) son los encargados del movimiento de nucleósidos y nucleobases a través de la membrana plasmática o de algunos compartimientos intracelulares. Los transportadores juegan un papel importante en las vías de salvamento de nucleósidos naturales, pero también tienen relevancia en la terapia antineoplásica y antiviral ya que a través de ellos pueden ser transportados fármacos derivados de nucleósidos.

Los transportadores de nucleósidos humanos están agrupados en dos grandes familias génicas, pertenecientes a la superfamilia de los *Solute Carriers* (SLC) y no relacionadas evolutivamente entre ellas: *SLC28* y *SLC29*. En estas dos familias se clasifican los transportadores concentrativos (CNTs) y equilibrativos (ENTs) de nucleósidos, respectivamente. Evolutivamente los CNTs se expresan en muchas eubacterias y eucariotas, mientras que los ENTs están presentes únicamente en eucariotas. Los CNTs

son transportadores Na-dependientes de gran afinidad (**Tabla1**), que mueven nucleósidos en contra de su gradiente de concentración, mientras que los ENTs son proteínas que permiten el transporte bidireccional y facilitado de nucleósidos y nucleobases, con una afinidad inferior a la que tienen los CNTs (Young y col., 2013; Yao y col., 2011; Baldwin y col., 2004) (**Tabla 1**). En el caso de ENT4, además de nucleósidos, puede transportar monoaminas.

		Sustrato	Km (μ M)
Transportadores concentrativos (SLC28)	hCNT1 (SLC28A1)	Citidina	3,1
		Timidina	27
		Uridina	38
	hCNT2 (SLC28A2)	Guanosina	ND
		Adenosina	8
		Inosina	13,7
	hCNT3 (SLC28A3)	Uridina	116
		Citidina	3,5
		Timidina	10,6
		Guanosina	8,5
		Adenosina	2,4
	Transportadores equilibrativos (SLC29)	hENT1 (SLC29A1)	Inosina
Uridina			5,3
Citidina			580
Timidina			3000
Guanosina			140
hENT2 (SLC29A2)		Adenosina	40
		Inosina	170
		Uridina	240
		Citidina	5610
		Timidina	710
hENT3	Guanosina	2700	
	Adenosina	140	
	Inosina	50	
	Uridina	200	
	Citidina	ND	

(<i>SLC29A3</i>)	Timidina	ND
	Guanosina	ND
	Adenosina	1900
	Inosina	ND
	Uridina	2000

Tabla 1.- Selectividad de sustrato de los transportadores concentrativos y equilibrativos de nucleósidos. Constantes de afinidad aparente (Km) expresadas en μM . Adaptado de Pastor-Anglada y Perez-Torras 2018).

2.1 Transportadores concentrativos de nucleósidos

La familia génica *SLC28* comprende tres proteínas transportadoras: hCNT1, hCNT2 y hCNT3 (Ritzel y col., 2001; Ritzel y col., 1998; Ritzel y col., 1997), codificadas por los genes *SLC28A1*, *SLC28A2* y *SLC28A3*, respectivamente. Los hCNTs pueden ser diferenciados en función a su afinidad: hCNT1 es un transportador específico de pirimidinas, hCNT2 de purinas y hCNT3 es el único capaz de transportar ambos tipos de nucleósidos (**Figura 3**). Sin embargo, todos pueden transportar uridina, aunque con diferentes afinidades.

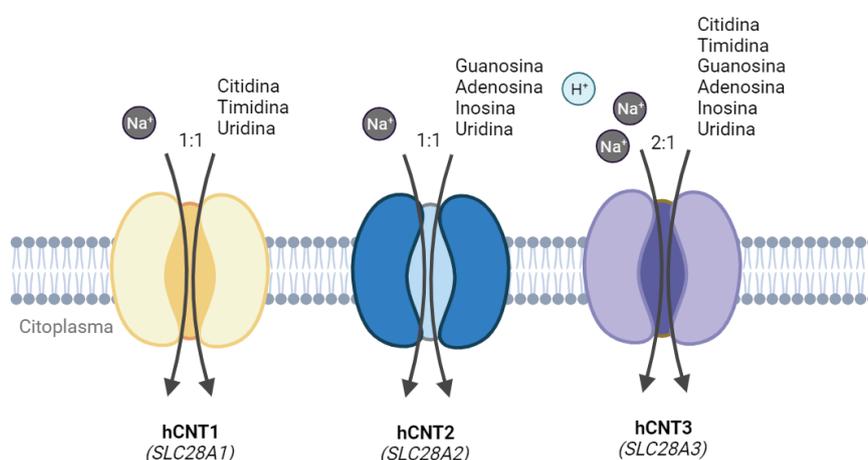


Figura 3.- Esquema representativo de los transportadores concentrativos de nucleósidos humanos (hCNTs).

Los CNTs acoplan el transporte de nucleósidos al transporte de iones de Na con una estequiometría Na^+ /nucleósido de 1:1 para hCNT1 y hCNT2, mientras que para hCNT3 es 2:1. hCNT3 también puede utilizar protones, pero en ese caso la estequiometría se modifica a 1:1. La localización de los hCNTs se ha descrito sobre todo en membrana

plasmática, pero para hCNT3 fue descrita una variante de *splicing* que es retenida en la membrana del retículo endoplasmático (Errasti-Murugarren y col., 2009).

Hasta el momento, hCNT3 ha sido el único transportador concentrativo humano en ser cristalizado y su elucidación permitió demostrar que su estructura cuaternaria corresponde a un homo-trímero (Zhou y col., 2020), confirmando así estudios previos de crosslinking (Stecula y col., 2017). La elucidación previa de las estructuras de CNTs de *Vibrio cholerae* (vcCNT) (Johnson y col., 2012) y de *Neisseria wadsworthi* (nwCNT) (Yao y Young 2018), así como diferentes estudios de homología, permitieron plantear una posible estructura y disposición de los monómeros de hCNTs. Los CNTs procariotas cuentan con 8 dominios transmembrana (Johnson y col., 2012; Hirschi y col., 2017). A partir de esta información, la predicción de la estructura de los hCNTs mostró tres dominios adicionales que no se encuentran en procariotas por lo que se pudo establecer que la estructura monomérica de los hCNTs cuenta de 11 dominios transmembrana (TM1-11) y sus extremos quedan ubicados en lados contrarios de la membrana celular (**Figura 4**) (Mulinta y col., 2017). En la cara extracelular de la membrana citoplasmática queda expuesto el extremo C-terminal que cuenta con múltiples sitios de glicosilación (Mulinta y col., 2017; Hamilton y col., 2001), mientras que la región N-terminal es citoplasmática y específica de organismos eucariotas (Johnson y col., 2012; Hamilton y col., 2001). Las colas N-terminal son específicas para cada tipo de transportador y tienen longitudes de 83, 80 y 103 aminoácidos para los transportadores hCNT1, hCNT2 y hCNT3, respectivamente. Este N-terminal no está vinculado a la capacidad del transporte de ninguna de las isoformas (Hamilton y col., 2001). Por su ubicación citoplasmática, esta región ha sido postulada como un sitio de unión probable de proteínas de interacción. En el caso de hCNT3, galectina 4 (Gal-4) fue identificada como una proteína de interacción en colon utilizando la región N-terminal completa como cebo en un ensayo de GST-pull down y proteómica (Fernandez-Calotti y col., 2016).

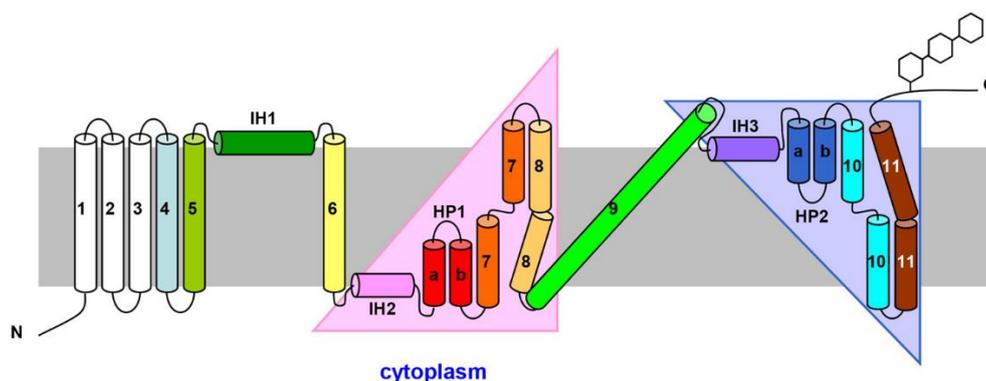


Figura 4.- Topología predicha para los hCNTs. La topología de hCNT3 fue predicha a partir de homología con su contraparte en *V. cholerae*. Tomado de Mulinta y col., 2017.

2.2 Transportadores equilibrativos de nucleósidos

Los hENTs se dividen en cuatro subtipos: hENT1, hENT2, hENT3 y hENT4, correspondientes a los genes *SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* y *SLC29A4* de la familia génica *SLC29*, respectivamente. Ellos median el transporte facilitado de nucleósidos y nucleobases, con distintos grados de afinidad (**Tabla 1**). Todos ellos, a excepción de hENT4, tienen una amplia permeabilidad y pueden transportar tanto purinas como pirimidinas (Young y col., 2013; Pastor-Anglada y col., 2018). Evolutivamente, los hENTs no tienen homología estructural con los CNTs, e incluso carecen de proteínas homólogas en organismos procariotas (Young y col., 2013). Otra diferencia con los hCNTs es que su transporte, al ser facilitado, no depende de un co-transporte de Na⁺ sino de un gradiente de concentración del sustrato. hENT1 y hENT2 son los transportadores equilibrativos más estudiados (**Figura 5**) y pueden ser diferenciados entre ellos porque hENT1 es más sensible al inhibidor nitrobenziltioinosina (NBTI) que hENT2, con K_is en el rango nM y μM respectivamente. Sin embargo, ambos pueden ser inhibidos por dipiridamol.

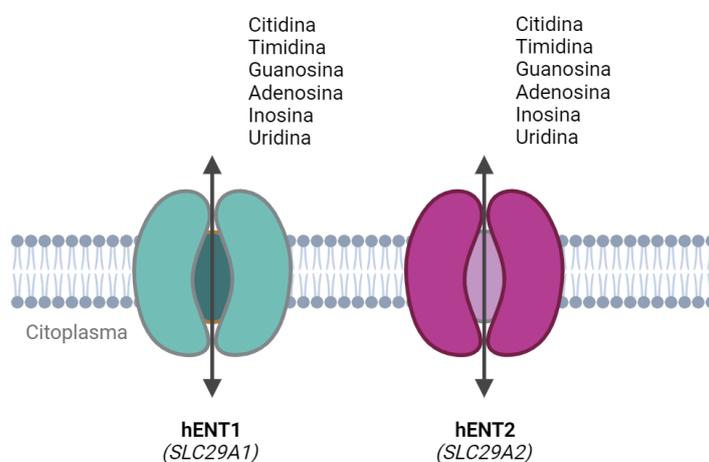


Figura 5.- Esquema representativo de los transportadores equilibrativos de nucleósidos (hENT1 y hENT2) humanos.

La estructura cristalográfica de hENT1 fue elucidada en complejo con S-4-nitrobenzil-6-tioinosina (NBMPR/NBTI) y dilazep, dos inhibidores de recaptación de adenosina (Wright y Lee 2019), y este trabajo permitió determinar que hENT1 tiene 11 dominios transmembrana, con un extremo N-terminal citosólico y un C-terminal extracelular (**Figura 6**). La estructura es asimétrica, con 6 hélices formando el dominio N y 5 hélices formando el dominio C. Aunque en principio funcionan como monómeros, se sabe que

este transportador puede formar también estructuras oligoméricas (Grañé-Boladeras y col., 2016).

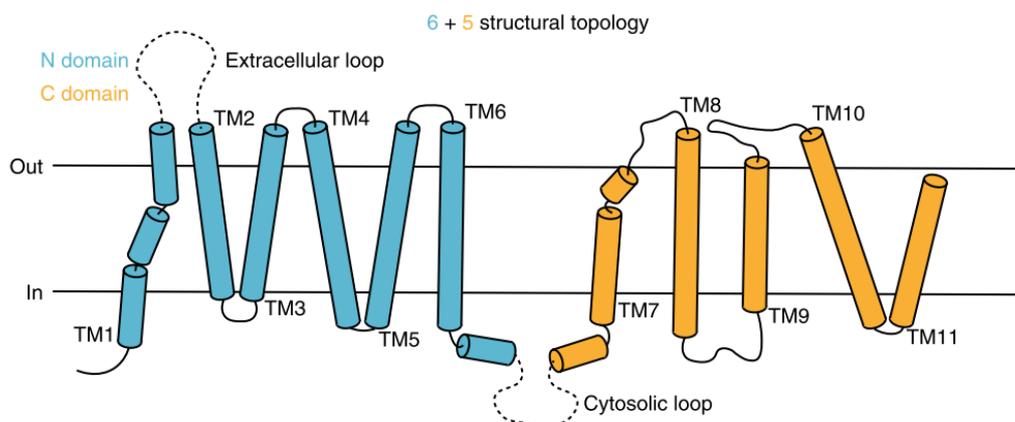


Figura 6.- Topología de hENT1. Los dominios N- y C- terminal están representados de color azul y naranja, respectivamente. Modificado de Wright y Lee 2019.

Los hENTs están ampliamente distribuidos y pueden ser encontrados en la mayoría de las células del organismo (Boswell-Casteel y Hays 2017). hENT1 y hENT2 están ubicados en la membrana plasmática y se distribuyen en muchos tipos de tejidos mediando el transporte de un amplio rango de nucleósidos de purinas y de pirimidinas, aunque también pueden transportar nucleobases (ENT2 mejor que ENT1) (Yao y col., 2011; Baldwin y col., 2004). hENT3 también está ampliamente distribuido y tiene amplia selectividad de sustrato, pero, a diferencia de hENT1 y hENT2, se ubica principalmente en membranas internas de lisosomas y mitocondria (Baldwin y col., 2005; Govindarajan y col., 2009). hENT1 también ha podido ser detectado en la mitocondria, y en la envoltura nuclear (Lee y col., 2006; Lai y col., 2004; Mani y col., 1998). En envoltura nuclear también fueron detectadas dos isoformas de hENT2, producto de *splicing* (Grañé-Boladeras y col., 2016). hENT4 se diferencia del resto de los hENTs por ser evolutivamente divergente. hENT4 se localiza en la membrana plasmática y puede transportar adenosina con baja afinidad a pH extracelular bajo (Barnes y col., 2006) pero también puede transportar monoaminas por lo que primero fue clasificado como un transportador de cationes orgánicos (Engel y col., 2004). En hENT1 y hENT2 el transporte de adenosina puede ser regulado por pH en células HUVECs (Celis y col., 2017). Además, está descrito que hENT3 puede transportar ácidos biliares en lisosoma y que este transporte es dependiente de un pH ácido (Persaud y col., 2021). Los hENTs tienen relevancia clínica ya que pueden mediar el transporte de diferentes

fármacos basados en nucleósidos utilizados en tratamientos antineoplásicos o antivirales (Pastor-Anglada y col., 2018; Yao y col., 2011; Zhang y col., 2007).

2.3 Ubicación tisular y celular de los transportadores de nucleósidos

La distribución en los tejidos, así como los niveles de expresión, pueden variar según los diferentes transportadores. La expresión de ARNm de los hCNTs está ampliamente distribuida en muchos tejidos especializados, principalmente en epitelio intestinal y renal (Elwi y col., 2006; Ritzel y col., 2001), siendo hCNT3 el que tiene la distribución más amplia. Se han encontrado niveles altos de ARNm de hCNT3 en páncreas, médula ósea y glándula mamaria, y en niveles más bajos en intestino, pulmón, próstata, testículos y riñón (Ritzel y col., 2001). También se ha detectado en cerebro, en macrófagos y monocitos y tráquea. hCNT2 se expresa abundantemente en el sistema nervioso central, así como también en el corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, intestino, páncreas y placenta. Por su parte, hCNT1 se expresa en cerebro, riñón, intestino delgado e hígado. Los tres hCNTs pueden ser detectados en órganos con características (re)-absortivas como el intestino, hígado o riñón, lo cual también les otorga un papel relevante en la farmacocinética de sus derivados de uso terapéutico. En estos tipos de epitelios polarizados, los transportadores pueden conseguirse distribuidos en distintos dominios de la membrana.

Los hENTs son mucho más ubicuos que los hCNTs. Sin embargo, sus niveles de expresión pueden ser variables entre diferentes tejidos. Para el transportador equilibrativo hENT1 se ha descrito una expresión alta en, entre otros, placenta, eritrocitos, sistema nervioso central, corazón, hígado, pulmón y colon (Pennycooke y col., 2001; Jennings y col., 2000), mientras que hENT2 abunda en endotelio vascular, corazón, sistema nervioso central, placenta, timo, páncreas, próstata, riñón, y músculo esquelético. hENT3, si bien en membrana lisosomal, está muy expresado en placenta. Si se analiza la distribución de los diferentes transportadores, se hace notoria su redundancia en los diferentes tejidos. Al estudiar la localización de estos transportadores en epitelios polarizados se ha podido observar que, los hCNTs se ubican preferentemente en la membrana apical, a diferencia de los hENTs, preferentemente ubicados en la membrana basolateral (**Figura 7**) (Mangravite y col., 2001; Mangravite y col., 2003; Lai y col., 2002 Errasti-Murugarren y col., 2007). Este tipo de distribución favorece el flujo transepitelial de nucleósidos, sobre todo en epitelios absortivos y reabsortivos como en el tracto gastrointestinal, en epitelio renal o en el hígado. El

movimiento de nucleósidos en una dirección se conseguiría gracias a la capacidad de concentrar de los CNTs y de su ubicación en la cara apical de las células que conforman estos tejidos. Los CNTs permitirían la entrada de nucleósidos a la célula, más no la salida. El movimiento bidireccional de nucleósidos estaría a cargo de los hENTs, en las membranas basolaterales. Según el modelo celular, esta distribución asimétrica de transportadores puede ser variada. En riñón, por ejemplo, hENT1 puede ubicarse también en la cara apical (Damaraju y col., 2007). El modelo explicado previamente se correspondería a la distribución en enterocitos y células renales (Errasti-Murugarren y col., 2007; Lai y col., 2002) donde la fuente principal de obtención de nucleósidos es de los alimentos o de vías excretoras.

El hígado es el órgano con la mayor tasa de síntesis de nucleósidos de purinas y pirimidinas en el organismo. Por lo tanto, la distribución de transportadores de nucleósidos en sus membranas se ajusta a esta característica. En este órgano, hCNT1 y hCNT2 están expresados en mayor abundancia que hCNT3 (Govindarajan y col., 2009) y pueden detectarse en la membrana sinusoidal, en contacto con el sistema circulatorio, y también en la membrana canalicular, en contacto con el canaliculo biliar. En ambas membranas los hCNTs están acompañados por hENT1 ya que hENT2 solo está ubicado en la membrana sinusoidal.

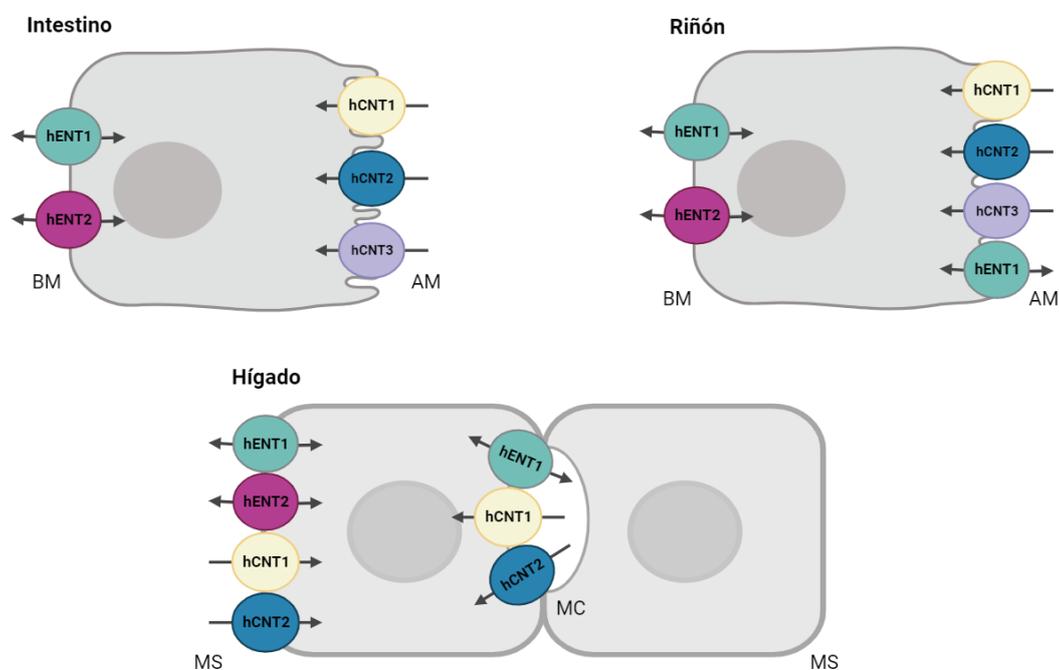


Figura 7.- Representación esquemática de la distribución de los transportadores de nucleósidos en la membrana plasmática de células de epitelio absorptivo. Se muestra la distribución en enterocito (intestino), célula del túbulo renal (riñón) y hepatocito (hígado). MB: membrana basal; MA: membrana apical; MS: membrana sinusoidal; MC: membrana canalicular. Adaptado de; Young y col., 2013 Errasti-Murugarren y Pastor-Anglada, 2010

2.4 Regulación de los transportadores de nucleósidos

La expresión de los transportadores de nucleósidos cambia en función del estado de diferenciación de las células y su expresión se ha visto disminuida en diferentes tipos de cáncer (Boces-Pascual y col., 2021; Urtasun y col., 2017; Farre y col., 2004; Pennycooke y col., 2001; Dragan y col., 2000). Los análisis de expresión de hCNT1, hENT1 y hENT2 en diferentes tipos de tumores ginecológicos, mostraron que la expresión de hCNT1 es la que se pierde más frecuentemente en ellos (Farre y col., 2004). En hepatocarcinoma, los cambios en la expresión de hENT1, hENT2, hCNT1 y hCNT3 han sido vinculados a un aumento en la quimio-resistencia a los tratamientos (Carter y col., 2021; Pastor-Anglada y Perez-Torras 2015). Además en muchas de las líneas celulares disponibles la expresión de los hCNTs está disminuida o es incluso ausente (Pastor-Anglada y col., 2018).

La relevancia de la ubicación tisular y celular de los transportadores fue comentada previamente. Para lograr la distribución que tienen los transportadores en el epitelio absorptivo el tráfico hacia la membrana debe estar muy bien regulado, aspecto que ha sido abordado por nuestro grupo de investigación. Los transportadores CNT1, CNT2 y CNT3 son regulados de forma coordinada por la proteína RS1 (Errasti-Murugarren y col., 2012). RS1 puede modular el tráfico de los CNTs desde la red trans-Golgi hasta la membrana plasmática, lo que regula a su vez la actividad de los transportadores. hCNT3 también puede ser modulado por sus proteínas de interacción. Gal-4 es una proteína que juega un papel importante en las células epiteliales, regulando la ubicación apical de diferentes glicoproteínas. Esta lectina forma parte del interactoma de hCNT3, promoviendo su localización y retención en la membrana apical en células de cáncer de colon (Fernandez-Calotti y col., 2016). En células de leucemia linfocítica crónica (LLC) el ácido trans-retinóico puede promover el tráfico a la membrana plasmática de hCNT3 por inducción de la transcripción y secreción de TGF- β 1 y mediante un mecanismo de señalización a través de RhoA y ERK1/2 (Fernandez-Calotti y Pastor-Anglada 2010). Para hCNT1, se demostró que el transportador es glicosilado y que el estado de glicosilación puede modular su actividad y ubicación en la membrana plasmática (Perez-Torras y col., 2019), por lo que la regulación de los transportadores también puede venir dada por modificaciones postraduccionales.

Existen otros elementos que pueden regular la actividad de los CNTs más allá de su localización en la membrana. En células epiteliales de intestino de rata, la actividad y expresión de rCNT2 es regulada por el glucocorticoide dexametasona, un agente de

diferenciación de células intestinales, afectando también la expresión de rCNT1 pero no su actividad (Aymerich y col., 2004). Además, rCNT2 puede estar bajo control purinérgico y se ha planteado una interacción entre el transportador y el receptor de adenosina A₁ en hígado (Duflot y col., 2004), pero también con los receptores A₁ y A_{2A} en neuronas (Medina-Pulido y col., 2013). La actividad de rCNT3 también puede ser modulada por ATP y adenosina a través de los receptores P2Y y A_{2a}, respectivamente, en una modulación dependiente de si el estímulo se encuentra en la cara apical o basolateral del colangiocito y dependiente de cAMP/PKA/ERK/CREB y de fosforilación de AMPK (Godoy y col., 2014).

Existe poca información sobre la regulación transcripcional de los hCNTs. En hepatocitos se sabe que hCNT1 es modulado por el factor nuclear 4 α (HNF4 α), quien puede unirse al dominio DR-1 del promotor del gen (Klein y col., 2009; Fernandez-Veledo y col., 2007). En adenocarcinoma pancreático y cáncer colorrectal hCNT1 está regulado por los miRNAs miR-106a y miR-17 (Boces-Pascual y col., 2021). El gen de CNT2 puede ser activado por el factor nuclear de hepatocitos 3 γ (HNF3 γ), por C/EBPs (*CCAAT enhancer-binding protein- α*) y por el factor de crecimiento- β (TGF- β) (Yee y col., 2009; Fernandez-Veledo y col., 2007; Valdes y col., 2006). En células de hepatoma de rata se propuso a las citoquinas IL-6 y TNF- α como las principales reguladoras de rCNT1 (Fernandez-Veledo y col., 2004). El aumento de la expresión se da por vías independientes: la regulación por IL-6 es dependiente de MAPK pero la vía PI3K quinasa/Akt es quien media la regulación por TNF- α (Fernandez-Veledo y col., 2004). En intestino de ratas se estudió la expresión de estos dos transportadores en función del estado nutricional. Estos experimentos mostraron que la carencia de nucleósidos en la dieta de estos animales podía incrementar de forma específica la expresión de CNT1 en intestino delgado y en el corazón (Valdes y col., 2000), permitiendo relacionar la expresión de los transportadores a una respuesta de regulación transcripcional en función del desbalance de metabolitos en el medio extracelular. Sin embargo, los mecanismos moleculares que llevan a esta regulación aún están por determinarse.

La regulación de los ENTs ha sido mucho más estudiada y la regulación por modificaciones postraduccionales está bien descrita. hENT1 y hENT2 pueden ser glicosilados en el *loop* entre los dominios transmembrana 1 y 2 y esta glicosilación determina la localización de los transportadores en la membrana plasmática (Bicket y Coe 2016; Ward y col., 2003). Para hENT1 la importancia de esta glicosilación van más allá ya que puede regular su actividad y la capacidad de interacción entre sus monómeros (Bicket y Coe 2016). De la misma forma, muchas quinasas han sido relacionadas con la regulación de los ENTs y su ubicación en la membrana plasmática

en diversos modelos de mamíferos. hENT1 puede ser fosforilado por las proteínas quinasas A (PKA) y C (PKC) (Grañé-Boladeras y col., 2019; Reyes y col., 2011; Coe y col., 2002) en el *loop* de unión de los dominios transmembrana 6 y 7. Posteriormente se demostró que hENT2 también puede ser fosforilada por CKII (Grañé-Boladeras y col., 2019). La fosforilación de los transportadores y su posterior ubicación en membrana estaría aumentando la posibilidad de formación de oligómeros, que según el tipo (homo-oligómeros o hetero-oligómeros) podrían modular las afinidades del transporte (Grañé-Boladeras y col., 2019).

La regulación de ENT1 y ENT2 ha sido ampliamente estudiada en diferentes condiciones fisiopatológicas como la vasoconstricción, modelos de diabetes o en hipoxia. Esta última puede llevar a cambios en la expresión de hENT1 y hENT2, y por tanto a cambios en la captación de adenosina. En modelos de hipoxia, la expresión de hENT1 está alterada a nivel de ARN y de proteína, pero los niveles relativos de proteína en membrana de hENT2 se mantienen iguales (Aguayo y col., 2005; Casanello y col., 2005). En estos modelos, la captación de adenosina or hENT1 está disminuida. En modelos de ratón los resultados han sido similares, y se determinó que la expresión de mENT1 y de mENT2 es reprimida por el factor de transcripción HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) (Morote-Garcia y col., 2013; Morote-Garcia y col., 2009; Eltzschig y col., 2005). Una disminución en la expresión de ENT2 favorecería la acumulación de adenosina extracelular, disminuyendo la inflamación asociada a la hipoxia en la mucosa (Morote-Garcia y col., 2009).

Los cambios en los niveles de glucosa también alteran la expresión de los hENTs, El aumento de la síntesis y liberación de óxido nítrico (NO) y de TGF- β 1 están asociados a la diabetes gestacional y a la hiperglicemia. En células HUVEC, la expresión y el transporte de adenosina de hENT1 está regulado por TGF- β 1 (Vega y col., 2009) a través de la activación del factor de transcripción hCHOP-C/EBP α (Farias y col., 2010). Hasta ahora, han sido descritos muchos factores de transcripción que pueden controlar al promotor de los hENTs, y para hENT1 esto está bien caracterizado. Según las secuencias consenso identificadas al promotor de hENT1 pueden unirse factores de transcripción como GATA, ERE, SP-1, IRF-2, y CREB, entre otros (Abdulla y Coe 2007; Choi y col., 2000). En células de leucemia murina, la activación de la vía c-JNK disminuye la expresión de ENT1 por la fosforilación del factor de transcripción c-Jun, que luego puede unirse al promotor del gen (Leisewitz y col., 2011). JNK es una vía de estrés que puede ser activada por drogas anticancerígenas, por lo que este mecanismo podría producir resistencia a los fármacos en pacientes con cáncer.

3. Metabolismo de la tetrahidrobiopterina

Las pteridinas constituyen un grupo estructuralmente variado de compuestos naturales involucrados en las vías biosintéticas de cofactores y vitaminas. Son compuestos heterocíclicos que tienen un motivo pteridina como base de su estructura. Los derivados que forman la estructura 2-amino-4-hidroxi- reciben el nombre de pterinas (Kaufman 1967) y pueden ser divididas en dos grupos: las pterinas conjugadas que contienen un ácido para-aminobenzoico (PABA), y un glutamato (en este grupo se encuentran los folatos), y las pterinas no conjugadas que no cuentan con ninguno de esos dos grupos y, en cambio, las sustituciones ocurren principalmente en la posición 6 del anillo (Blau 2001; Kaufman 1967). Las pterinas pueden existir en su forma oxidada y reducida, pero solo la forma 5,6,7,8-tetrahidro es activa.

La 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄) es un cofactor enzimático no proteico necesario para la función de hidroxilasas de aminoácidos aromáticos: la fenilalanina hidroxilasa (PH) (Kaufman, 1963), la tirosina hidroxilasa (TH) (Nagatsu y col., 1964) y la triptófano hidroxilasa (TPH) (Lovenberg y col., 1967), así como también para todas las isoformas de la sintasa de ácido nítrico (NOS) (Kwon y col., 1989; Tayeh y Marletta 1989) y la alquilglicerol monooxigenasa (AGMOS) (Werner 2013, Tietz y col., 1964). La síntesis de este cofactor es una vía metabólica que involucra muchos metabolitos vinculados a otros procesos como al metabolismo energético, funciones antioxidantes y protección a la inflamación.

La BH₄ puede ser obtenida por síntesis *de novo* a partir de GTP, o a través de las vías de salvamento o de reciclaje (**Figura 8**). La vía de biosíntesis forma, a partir de GTP, dos intermediarios, 7,8-dihidroneopterina trifosfato y 6-piruvoil-BH₄, en reacciones dependientes de Mg²⁺, Zn²⁺ y NADH. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas GTP ciclohrolasa I (GTPCH), 6-piruvoil-tetrahidropterina sintasa (PTPS) y sepiapterina reductasa (SPR), respectivamente. En ausencia de la SPR, dos reductasas no específicas, la aldosa reductasa (AR) y la carbonil-reductasa (CR) también pueden llevar a cabo la misma reacción ya que comparten el mismo sustrato que la SPR. Aparte de la síntesis *de novo*, SPR, AR y CR pueden participar en la vía de salvamento de las pteridinas catalizando la conversión de la sepiapterina a 7,8-dihidrobiopterina (BH₂), la que luego es transformada a BH₄ por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), una enzima que también es partícipe del metabolismo de los folatos. La sepiapterina es generada en una reacción no enzimática a partir de la 6-lactoil-tetrahidropterina.

Como se mencionó anteriormente, BH₄ es necesaria para la hidroxilación de la fenilalanina, la tirosina y el triptófano. En estas reacciones la BH₄ es oxidada a BH₄-4a-carbinolamina. Esta forma oxidada puede ser regenerada gracias a dos enzimas: la pterina-4a-carbinolamina deshidratasa (PCD) que genera BH₂ quinoide (qBH₂), molécula que luego es reducida por la dihidropteridina reductasa (DHPR/QDPR) para regenerar a BH₄. Esta regeneración enzimática es esencial para el metabolismo de la fenilalanina ya que asegura la disponibilidad del cofactor en su forma reducida y evita la acumulación de antimetabolitos producidos a partir de BH₄-4a-carbinolamina (Werner y col., 2011).

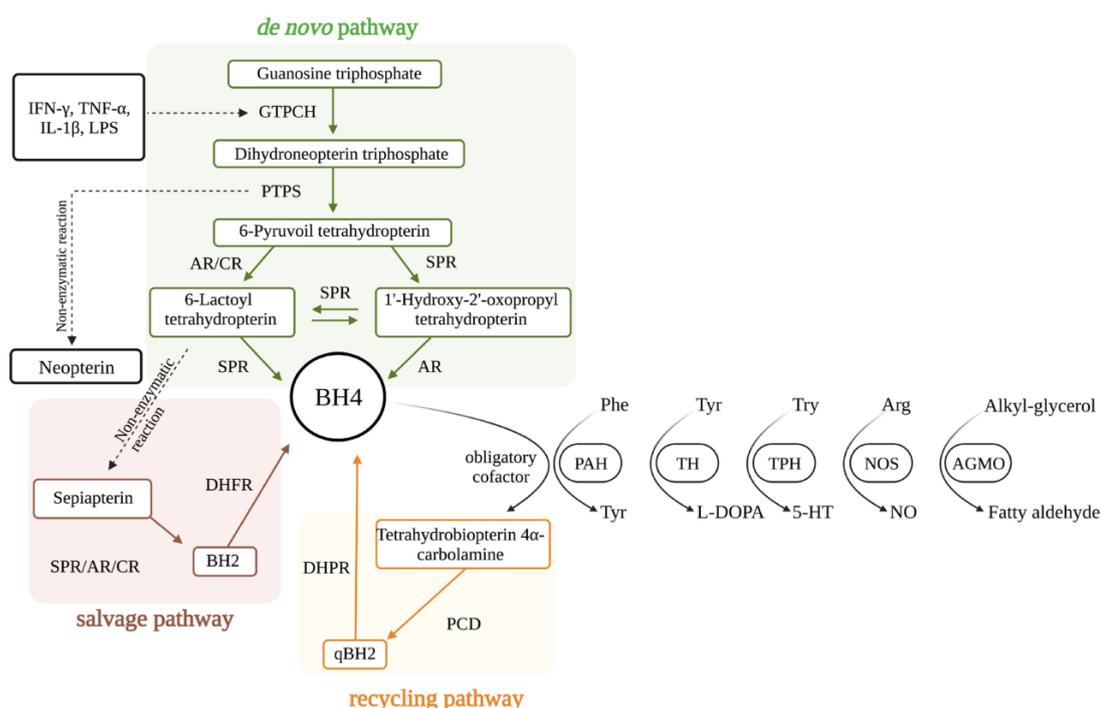


Figura 8.- Metabolismo de la BH₄. La vía de síntesis *de novo* se indica con un fondo color verde, la vía de salvamento con un fondo de color rojo y la vía de reciclaje con uno color amarillo. Los acrónimos están explicados en el texto. Tomado de Eichwald y col., 2023.

Más allá de su importancia para el funcionamiento de las hidroxilasas de aminoácidos, esta vía metabólica ha sido vinculada a funciones anti-inflamatorias y anti-oxidantes inhibiendo el ensamblaje del inflamasoma, además de ser activador mitocondrial y de mejorar la memoria (Eichwald y col., 2023). Además, la activación exacerbada de su síntesis es patológica, ya que puede causar disfunción mitocondrial, aumento en la agresividad del sistema inmunológico, inducir hipersensibilidad al dolor y progresión de síntomas en diferentes condiciones crónicas (Staats Pires y col., 2020; Fujita y col., 2020; Cronin y col., 2018).

3.1 Deficiencia de QDPR

La hiperfenilalaninemia (HPA) resulta de la imposibilidad de convertir fenilalanina a tirosina. Los problemas en el metabolismo de la fenilalanina generan un incremento de este aminoácido en sangre y conlleva una deficiencia de monoaminas, como la dopamina o la serotonina, que son sintetizadas a partir de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano, respectivamente. La mayoría de las HPA están ocasionadas por defectos en la enzima fenilalanina hidroxilasa, un desorden genético conocido como fenilcetonuria (PKU), pero existe un grupo de estas HPAs donde los defectos no son en la PHA sino en las enzimas que participan de la síntesis o en el reciclaje de su cofactor, la BH_4 . Las deficiencias de BH_4 son un grupo heterogéneo de desórdenes neurometabólicos hereditarios causados por mutaciones en las enzimas que participan del metabolismo de BH_4 . En general los pacientes con HPA responden bien al tratamiento dietético, restringiendo la ingesta de fenilalanina de una forma muy estricta, o a la administración de BH_4 sintética. Sin embargo, este tratamiento no es efectivo en algunos casos de deficiencia de la enzima QDPR (Ponzzone y col., 2004), la enzima encargada de reciclar la BH_4 a partir de qBH_2 .

La deficiencia de QDPR (OMIM: 261630) es la segunda forma más severa de deficiencia de BH_4 (Blau 2016), llegando a ser la responsable del 33% de los casos (Opladen y col., 2012). Al ser extremadamente poco frecuente, se desconoce la prevalencia en la población. En la clínica se puede presentar de forma muy variable pero sus formas más severas están entre las más agresivas de las deficiencias de BH_4 . Entre sus síntomas se encuentra el deterioro neurológico progresivo producido por una pérdida neuronal extensa, proliferación vascular anormal en el cerebro, calcificación de los ganglios basales y, si no se da un tratamiento oportuno, la muerte súbita (Schmidt y col., 1988 ;Woody y col., 1989; Gudinchet y col., 1992). Además, en el líquido cerebroespinal se pueden observar niveles alterados de folatos (Ponzzone y col., 2004). Esta deficiencia puede ser diagnosticada rápidamente mediante los cribajes neonatales, donde se miden los niveles de fenilalanina y la actividad de la enzima en sangre (Muntau y col., 2018). La detección temprana ayuda a que los pacientes tengan una mejor prognosis evitando defectos neurológicos a largo plazo. La patología puede ser considerada severa o leve en función de la respuesta al tratamiento y si este incluye o no el uso de precursores de neurotransmisores (Blau 1993).

En los años más recientes, el uso de tecnologías como la secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido clasificar las deficiencias de QDPR según su genotipo

(Tendi y col., 2022, Yubero y col., 2016) aunque no parece haber suficiente información para correlacionar éste con el fenotipo de la patología (Opladen y col., 2020). La deficiencia de QDPR fue considerada por mucho tiempo como una hiperfenilalaninemia atípica ya que la dieta baja en fenilalanina no era suficiente para su tratamiento óptimo (Smith y Lloyd 1974).

Actualmente el tratamiento utilizado en casos de severidad cuenta con una dieta baja en fenilalanina acompañada de la administración de los precursores de neurotransmisores L-Dopa y 5-hidroxitriptofano acompañados del inhibidor de descarboxilasas periféricas (carbidopa) y de ácido fólico (Pope y col., 2019, Blau 2016, Ponzzone y col., 2004). Quienes sufren de formas leves de la deficiencia pueden responder a la monoterapia con BH₄, o pueden incluso no necesitar de tratamiento (Blau y col., 1992).

4. Metabolismo de un carbono

El metabolismo de un carbono (1C) es una vía metabólica universal encargada de generar unidades intermediarias transferibles de 1C (en forma de formil, metileno y metil), indispensables para muchos procesos fisiológicos que mantienen la integridad celular. Esta vía es relevante para la estabilidad de los ácidos nucleicos a través del metabolismo de los nucleótidos, así como también lo es para el control epigenético del ADN y de las histonas. El metabolismo de 1C es una red metabólica integrada por los ciclos del folato y de la metionina, y está mediado por intermediarios de folatos para la transferencia de unidades de 1C. Estos dos ciclos se vinculan también con la vía de transulfuración, la cual a través de la producción de glutatión tiene un rol importante para la regulación del estado redox. Entre las vías biosintéticas que utilizan unidades de 1C derivadas de los folatos están las que originan purinas, timidina, metionina y glicina, y estas vías soportan la proliferación celular, el desarrollo embrionario, y la homeostasis de los tejidos. Debido a su estrecho vínculo con la síntesis de ácidos nucleicos, la inhibición del metabolismo de los folatos afecta la proliferación celular y es por esto que los antifolatos son ampliamente usados como agentes antitumorales.

A diferencia de otros organismos, los animales no pueden sintetizar folatos. El término genérico "folato" hace referencia a una gran familia de compuestos formados, como se mencionó anteriormente, por una pterina unida a un ácido para-aminobenzoico (PABA), que a su vez está unido al grupo α -amino de un monoglutamato o poli- γ -glutamato. La

forma reducida del folato, el tetrahidrofolato (THF), es el aceptor universal de unidades 1C y es sintetizado a partir del ácido fólico ingerido en la dieta. Los folatos son distribuidos por la circulación en su forma THF-monoglutamato, principalmente en la forma reducida 5-MTHF, en el humano (Wright y col., 2007), y son transportados activamente a través de la membrana plasmática por el transportador de folatos reducidos (RFC - *SLC19A1*).

Una vez que las unidades de 1C se unen al THF, estas pueden ser interconvertidas entre diferentes estados de oxidación. En las células eucariotas el metabolismo de un carbono está compartimentado entre citoplasma, mitocondria y núcleo, siendo los dos primeros los compartimientos con el mayor reservorio de donadores de 1C. Se ha sugerido que los folatos monoglutamato pueden ser transportados a la mitocondria por el antiportador SLC5A32, miembro de la familia de transportadores mitocondriales (Zheng y Cantley 2019). La vía mitocondrial de 1C también genera glicina, un aminoácido necesario para la síntesis *de novo* de las purinas (Ducker y Rabinowitz 2017; Tibbetts y Appling 2010; Christensen y MacKenzie 2006).

En el citoplasma, las unidades de un carbono pueden generarse directamente por la conversión de THF y serina a glicina y 5,10-metilen-THF, catalizado por la enzima serina hidroximetil transferasa en citoplasma o en núcleo (SHMT1 o SHMT2 α , respectivamente) (**Figura 9**). De manera alternativa, el 10-formil-THF puede formarse a partir de THF, ATP y el formato mitocondrial, en una reacción catalizada por la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1 (MTHFD1), en el citoplasma y en el núcleo. Son múltiples las fuentes de carbonos con las que cuenta la célula eucariota para suplir el metabolismo de 1C, donde las principales son la serina y el formato. El formato es la mayor fuente de unidades 1C y se deriva del catabolismo de la serina y glicina en la mitocondria. Otras fuentes de 1C provienen de la degradación de la histidina en el citosol y de la degradación de especies metil-glicina derivadas de la colina (betaina, dimetilglicina y sarcosina) en la mitocondria (Ducker y Rabinowitz 2017).

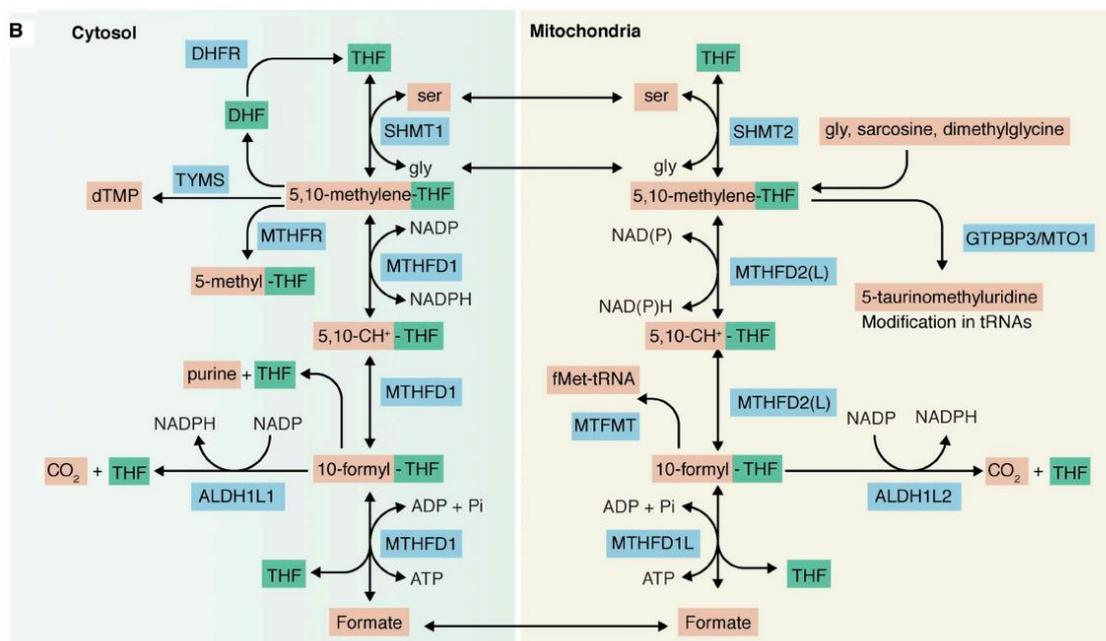


Figura 9. Metabolismo de los folatos. Compartimentación del metabolismo de los folatos en el citoplasma y la mitocondria. Modificado de Zheng y Cantley 2019.

La síntesis de dTMP por TYMS es una reacción dependiente de 5,10-metilen-THF. La metilen-THF reductasa (MTHFR) también requiere de 5,10-metilen-THF para la síntesis de la forma más reducida de unidad de 1C unido a folato, el 5-metil-THF (5-MTHF), en una reacción dependiente de NADPH. El 5-MTHF es necesario para la re-metilación de la homocisteína para formar metionina. La re-metilación de la homocisteína tiene relevancia fisiológica ya que a partir de este aminoácido se sintetiza la S-adenosilmetionina (SAM), un portador reactivo de grupos metilo importante en reacciones de metilación. El 10-formil-THF es la forma de folato 1C más oxidada y es necesaria para la síntesis de purinas, específicamente en las reacciones catalizadas por las enzimas GART (segunda reacción) y ATIC (primera reacción). En los procesos proliferativos de células de mamífero, es la síntesis *de novo* de las purinas el proceso metabólico con la mayor demanda de unidades de 1C.

La activación del metabolismo de 1C en el núcleo se da durante las fases S y G₂/M del ciclo celular, o después de haber un daño en el ADN. En estos casos, las enzimas vinculadas a la síntesis de dTMP son SUMOiladas y translocadas al núcleo para la replicación o reparación del ADN (Anderson y col., 2012). En el núcleo se forma un complejo multienzimático asociado a la lámina nuclear y con otras enzimas participes de la replicación de ADN (Anderson y col., 2012; Anderson y col., 2007; Woeller y col., 2007).

Las reacciones centrales que se dan en el citoplasma y en la mitocondria son paralelas (Appling 1991; Barlowe y Appling 1988) y ambas vías están metabólicamente conectadas por el transporte unidireccional a través de la membrana mitocondrial de unidades de un carbono en la forma de aminoácidos como la serina o la glicina y el formato. La separación de las vías predice que el flujo ha de ser unidireccional, con un flujo neto de formato hacia afuera de la mitocondria, ya que las altas ratios de NAD(P):NAD(P)H mitocondriales favorecen la oxidación de la serina, mientras que las altas ratios de NADPH:NADP favorecen la reducción del formato (Ducker y Rabinowitz 2017; Meiser y col., 2016; Tibbetts y Appling 2010; Christensen y MacKenzie 2006). Por lo tanto, en principio, los cofactores generados en la vía citoplasmática para la síntesis de purinas, timidilato y metionina provienen del formato generado en la vía de 1C mitocondrial.

Objetivos

Aún queda mucho por conocer sobre la regulación de la función de los transportadores concentrativos de nucleósidos hCNTs. A pesar de que se expresan en muchos tipos de tejidos, su localización no es ubicua y varía según el tipo de transportador. Además, su distribución en la membrana celular tampoco es homogénea y pueden conseguirse principalmente en la membrana apical de los epitelios polarizados, desde donde favorecen el movimiento vectorial de nucleósidos. Esta expresión y ubicación de los hCNTs debe ser finamente regulada en función a los factores ambientales y las necesidades celulares para asegurar la disponibilidad de nutrientes y mantener la homeostasis.

Los distintos hCNTs comparten importantes características estructurales y de localización. Sin embargo, que cada uno de ellos tenga diferencias en la especificidad de sustrato abre la posibilidad a que cumplan diferentes papeles en la regulación de los niveles de nucleós(t)idos y que además puedan regularse entre ellos. Por sus características y por estar estrechamente vinculados al salvamento de nucleósidos, como hipótesis de esta tesis se plantea que la expresión de los hCNTs podría responder a cambios metabólicos producto de alteraciones extra- e intracelulares en los niveles de estas moléculas, tal como se ha observado en otros transportadores de nutrientes.

Para entender mejor la participación de los hCNTs en la regulación de la disponibilidad de nucleósidos es importante conocer las diferentes proteínas con las que podrían establecer interacciones. En nuestro grupo se han identificado proteínas del interactoma de hCNT3 vinculadas al metabolismo de nucleótidos o a alguna de las vías metabólicas que lo alimentan. Con base en estas observaciones se planteó como objetivo principal estudiar el papel de hCNT3 en la regulación del metabolismo de purinas y de pirimidinas, evaluándolo a través de su interacción con otras proteínas vinculadas a estas vías.

Para lograrlo, los siguientes objetivos específicos fueron planteados:

- I. Estudiar la regulación de los transportadores concentrativos de pirimidinas hCNT1 y hCNT3 en respuesta a la modulación del metabolismo de los nucleótidos.
- II. Estudiar los factores que afectan la interacción y regulación entre hCNT3 y QDPR.
- III. Estudiar las posibles implicaciones de la patología asociada a la deficiencia de QDPR en el metabolismo de nucleótidos.

Materiales y métodos

1. Cultivo celular

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal bovino inactivado (FBSi - Gibco) a diferentes porcentajes, 2 mM de L-Glutamina (Gln - Gibco) y una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (p/s: 20 U/mL y 20 µg/mL, respectivamente). Los suplementos adicionales y específicos para cada línea celular se detallan en el apartado de cada una.

Para evitar contaminaciones, las células fueron trabajadas en campana de flujo laminar con filtro HEPA, previamente esterilizada con 15-20 minutos de luz UV y luego limpiada con etanol al 70%. Además, se utilizó material estéril, puntas y líquidos (Agua miliQ, PBS 1X) autoclavados, y todo fue limpiado con etanol al 70% antes de introducirlo en la campana. En aquellos casos donde el líquido no pudiera ser autoclavado, se filtró con filtros de 0,22 µm, adentro de la campana.

Todas las células fueron mantenidas en condiciones estables de temperatura a 37°C en una atmósfera húmeda relativa del 95% y al 5% de CO₂. Se hicieron controles de micoplasma en todos los cultivos cada dos semanas.

1.1. Líneas celulares

1.1.1. HEK293 (ATCC/CRL-1573)

Son células epiteliales, provenientes de riñón embrionario humano. Estas células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de FBSi, Gln y una mezcla de p/s, a las concentraciones indicadas anteriormente.

1.1.2. HEK293-CNT3

Son células HEK293 que expresan de forma estable la proteína hCNT3. Esta línea celular fue establecida en nuestro laboratorio mediante el sistema Flp-In™. Este sistema permite la inserción y posterior expresión de un gen de interés dentro del genoma de células de mamífero. Las condiciones de cultivo fueron iguales a las utilizadas para las HEK293.

1.1.3. HeLa (ATCC/CCL-2)

Son células epiteliales, provenientes de adenocarcinoma de cérvix. Estas células crecen en monocapa y fueron cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de FBSi, Gln y una mezcla de p/s, a las concentraciones indicadas anteriormente.

1.1.4. Células linfoblastoides B (B-LCLs)

Son células en suspensión y se generan al inmortalizar linfocitos B de sangre periférica por transformación con el virus de Epstein-Barr (EBV). Para esta tesis, las B-LCLs fueron obtenidas de pacientes pediátricos diagnosticados con deficiencia de QDPR. Aparte, se obtuvieron B-LCLs de personas sin la deficiencia de QDPR, las cuales fueron usados como control. Para su cultivo, fue utilizado el medio RPMI 1640 suplementado con FBSi al 15%, Gln, p/s (estas dos últimas a las concentraciones indicadas anteriormente) y adicionalmente 10 mM de HEPES y 50 µg/mL de gentamicina.

1.2. Pasaje de células

1.2.1. Células adherentes – crecimiento en monocapa

Estas células fueron mantenidas en placas de Petri plásticas de 10 centímetros de diámetro y con 10 mL de medio de cultivo a 37°C. El pasaje de las células se realizó cuando la monocapa alcanzaba un 80-90% de confluencia, lo que representó realizar el mantenimiento cada 3-4 días, con cambios de medio cada 2 días.

Para su pasaje, el medio de cultivo fue retirado para luego hacer un lavado con PBS 1X autoclavado (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM y Na₂HPO₄ 4,3 mM, pH 7,4) y a temperatura ambiente. Al retirar el PBS se añadió tripsina-EDTA (Ácido etilendiaminoacético – 0,05%) a 37°C, hasta cubrir toda la monocapa. La tripsina es una proteasa mientras que el EDTA es un quelante de Ca²⁺ y juntos son utilizados para la disgregación celular. Para facilitar esta disgregación, las células con la tripsina se incubaron a 37°C el tiempo necesario para que estas se desprendan del fondo de la placa. Llegado este punto, la proteólisis de la tripsina se inhibió con por lo menos un volumen igual de medio suplementado con FBSi, siendo este dependiente de la dilución que se le deseara realizar a las células en mantenimiento. Por último, 1 mL de estas células diluidas se pasaron a una nueva placa de Petri con 9 mL de medio fresco + FBSi.

1.2.2. Células en suspensión

Estas células fueron mantenidas en frascos de cultivo (75cm²) para células en suspensión, es decir, sin tratamiento adherente en el fondo, y con 30 mL de medio. El mantenimiento se hizo cuando el cultivo alcanzaba una densidad celular de 1×10^6 cél/mL, cada 3-4 días aproximadamente, pudiendo refrescar el medio añadiendo 5 mL de medio fresco cada 2 días (solo si se veía el medio muy amarillo).

Estas células crecen formando agregados macroscópicos que pueden ser vistos a simple vista. Para disgregarlos, se pipeteó con una pipeta de 10 mL contra las paredes del frasco hasta ver que el medio se ponía turbio y los agregados ya no estaban. Todo el medio se recogió en un tubo de 15 mL y se centrifugó 4 minutos a 1200 rpm. Pasado ese tiempo, el medio fue aspirado y el pellet resuspendido en 6 mL de medio fresco. Luego se pasaron 2mL a un frasco nuevo, ajustando el volumen final del cultivo a 30 mL (con medio fresco + FBSi). La dilución del pasaje fue 1/3, correspondiente a una densidad de $3,3 \times 10^5$ cél/mL.

1.3. Descongelado y criopreservación

Las células utilizadas en esta tesis se mantuvieron en cultivo por no más de 4 meses continuos. Pasado ese tiempo, las células fueron renovadas con células en pases más jóvenes, provenientes del stock criopreservado del laboratorio.

El descongelado de células se realizó de forma rápida a 37°C, y de inmediato la alícuota se transfirió a un tubo con medio de cultivo fresco. Ya que los agentes criopreservantes producen toxicidad celular a temperatura ambiente, este paso debe ser rápido, evitando que la alícuota esté descongelada en contacto con el medio de congelación durante más del tiempo necesario. Seguidamente, las células en el medio fresco fueron centrifugadas durante 4 minutos a 1200 rpm y luego el medio con DMSO fue retirado. Por último, el pellet de células se resuspendió en medio fresco suplementado al 20% de FBSi y se sembró en placas para su mantenimiento.

Para asegurar el mantenimiento del stock, cada vez que un vial de células fue descongelado se reemplazó con nuevas células provenientes del siguiente pasaje de la línea. Para congelar, las monocapas se dejaron crecer en placas de Petri de 10 cm. Al llegar a la confluencia deseada fueron tripsinizadas, desprendidas con medio de cultivo y centrifugadas de la misma forma que al descongelarlas (4 minutos x 1200 rpm). El medio de cultivo fue aspirado y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de congelación (FBSi + 10% DMSO). Rápidamente, el vial se pasó al contenedor de

congelación, que contiene isopropanol y ayuda a la congelación gradual (-1°C/minuto). El contenedor se guardó a -80°C durante mínimo 4 horas y hasta un mes. Luego, los crioviales se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido. Cada criovial se identificó con la línea celular, el pase, fecha de congelación y responsable de hacerlo. También se indicó que la línea estaba libre de micoplasma.

1.4. Test de micoplasma

Esta prueba se hizo de forma rutinaria cada 15 días para comprobar que las líneas celulares activas no tuvieran contaminación con micoplasma. La comprobación se hizo por PCR utilizando los primers:

Fw: 5'- GGCGAATGGGTGAGTAACACG

Rv: 5' - CGGATAACGCTTGCGACTATG

Se tomaron alícuotas del medio de cultivo (en contacto con las células 72 horas) y se hirvieron 100 µL durante 5 minutos a 95°C. Se hizo un spin y de allí se tomó el volumen necesario para usarlo de muestra en la PCR. El mix de PCR se describe en la **tabla 2**.

	Volumen (µL)
	1X
DreamTaq Green PCR 2X (Thermo Scientific)	12,5
Primer fw [25 µM]	0,5
Primer rv [25 µM]	0,5
Medio previamente hervido	2,5
H ₂ O	9

Vf: 20 µL

Tabla 2.- Mezcla de PCR utilizada para la detección de micoplasma en las líneas celulares.

1.5. Inactivación del suero fetal bovino

Para lograr la inactivación del sistema de complemento, que podría dañar a las células en cultivo, todas las líneas celulares utilizadas en esta tesis fueron mantenidas con suero inactivado por calor. La inactivación se realizó calentando el suero a 56°C durante

30 minutos. Pasado el tiempo, el suero se enfrió en hielo y luego fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso.

1.6. Diálisis del suero fetal bovino

Según los requerimientos de cada experimento, era necesario mantener condiciones extracelulares enriquecidas o libres de nucleósidos. Esto se consiguió suplementando el medio de cultivo con FBSi o con FBSi dializado (dFBSi), respectivamente. Para obtener el medio libre de nucleósidos, se dializó un volumen de 50 mL de FBSi contra una membrana de 3500 *molecular weight cutoff* (MWCO) (Spectrum – Thermo Fisher Scientific). La diálisis se realizó en agua destilada, permitiendo que la membrana de diálisis girara en el agua durante 24 horas. y a 4°C. El volumen de agua utilizado fue 1 L/10 mL de FBSi. Pasado ese tiempo, se recogió el suero y se suplementó con 9 g/L de NaCl. Por último, el suero fue filtrado en campana, alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso (Musmanno y col., 1992).

1.7. Transfección de ADN

Para lograr la modulación de genes, se utilizó la lipotransfección como técnica para incorporar material genético externo a las células. Esta técnica utiliza liposomas catiónicos artificiales que forman complejos con el ADN (el cual tiene una carga negativa), permitiendo así el transporte del material genético externo de manera eficiente a través de la membrana plasmática. En esta tesis se utilizó la técnica para lograr la expresión de proteínas que no se expresan de forma endógena en las líneas celulares utilizadas, o bien para potenciar la expresión de proteínas que de forma endógena están en muy baja cantidad.

Se utilizaron dos reactivos diferentes, según el rendimiento de cada uno con las diferentes líneas celulares que fueron utilizadas. Para la transfección de las HEK293 se utilizó Lipotransfectina (Nitorlab), mientras que para las HeLa se utilizó la Lipotransfectina 3000 (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific). En todos los casos se trabajó con incubaciones de 48 horas después de la transfección. Como control experimental, se transfectó el vector pcDNA3.1 vacío. En esta tesis, la sobreexpresión de genes en HEK293 fue analizada principalmente por expresión de ARN (RT-qPCR) o expresión de proteínas (Western blot). En cualquiera de los casos, previo al análisis y después de haberse cumplido el tiempo de incubación, las células en monocapa fueron lavadas con PBS 1X y congeladas con nitrógeno líquido. Luego, las células fueron

guardadas a -80°C hasta su análisis. En el caso de las células HeLa, cuyo análisis fue por inmunofluorescencia, las células fueron lavadas con PBS 1X durante 5 minutos y luego se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 min y a temperatura ambiente. Luego, se mantuvieron en PBS 1X a 4°C hasta el marcaje con anticuerpos.

1.7.1. Transfección con lipotransfectina

La lipotransfectina se utilizó para la expresión heteróloga de genes en células HEK293. Todas las transfecciones se realizaron pasadas unas 24 horas post-siembra. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad células de $3,5 \times 10^5$ cél/pocillo, asegurando una confluencia de 50-60% (óptimo 50-70%) para el momento de la transfección. La mezcla de transfección se hace en ausencia de FBSi y se preparan dos mezclas por separado: una de OptiMEM + ADN a transfectar (Mezcla A) y otra de OptiMEM + Lipotransfectina (a temperatura ambiente) (Mezcla B) (**Tabla 2**). Luego, las mezclas A y B se unieron y se incubaron durante 15 min. Pasado este tiempo, cada mezcla de transfección se añadió gota a gota al pocillo correspondiente, sobre medio fresco.

Mezcla A		Mezcla B	
OptiMEM	125 µL	OptiMEM	125 µL
ADN	1,5 µg	Lipotransfectina	5 µL
Volumen final en el pocillo		2,5 mL	
(mezcla de transfección + medio)			

Tabla 3.- Condiciones de transfección con lipotransfectina en placas de 6 pocillos.

En el caso de co-transfecciones, la cantidad de ADN de cada gen sería la mitad de la cantidad total indicada en la tabla anterior (**Tabla 3**), es decir 750 ng cada uno. La mezcla de transfección se incubó con las células durante 5 horas. Pasado el tiempo, se realizó un cambio de medio, añadiendo DMEM fresco. Las monocapas transfectadas fueron incubadas durante 48 horas, hasta su análisis.

En los ensayos donde se suplementó con ácido fólico, el medio de cultivo añadido después de las 5 horas de transfección fue diferente a DMEM. En este caso se utilizó medio RPMI-1640 que puede ser adquirido sin ácido fólico en su formulación. Este RPMI-1640 fue suplementado con 10% dFBSi con o sin 9 µM ácido fólico (Thermo Fisher Scientific). El medio se mantuvo durante las 48 horas de incubación hasta su análisis.

Las transfecciones para los ensayos NanoBRET también fueron realizadas con lipotransflectina, pero las especificaciones están explicadas en el apartado de la técnica apartado.

1.7.2. Transfección con lipofectamina 3000

La lipofectamina 3000 se utilizó para transfectar las células HeLa ya que permite un rendimiento de transfección superior al que se obtiene en estas células con la lipotransflectina. Este tipo de transfección se utilizó principalmente para estudios posteriores de ubicación subcelular de proteínas por inmunofluorescencia, por lo que siempre se transfectó en placas de 24 pocillos. Previo a la siembra de las células, se colocaron cubreobjetos redondos dentro de cada pocillo a ser sembrado. Las células HeLa fueron sembradas a $1,5 \times 10^5$ cél/pocillo y se permitió la adhesión al cubreobjetos durante 4-6 horas. La mezcla de transfección se hace en ausencia de FBSi y, al igual que en la transfección con lipotransflectina, se preparan dos mezclas por separado: una de OptiMEM + ADN a transfectar + p3000 (Mezcla A) y otra de OptiMEM + Lipofectamina 3000 (Mezcla B) (**Tabla 4**). Tanto la Lipofectamina 3000 y el reactivo p3000 se mantuvieron en frío hasta la preparación de las mezclas. Luego, las mezclas A y B se unieron y se incubaron durante 15 min. Pasado este tiempo, cada mezcla de transfección se añadió gota a gota al pocillo correspondiente, sobre medio fresco. La mezcla de transfección se incubó durante 48 horas más.

Mezcla A		Mezcla B	
OptiMEM	25 µL	OptiMEM	25 µL
ADN	500 ng	Lipofectamina 3000	1,5 µL
p3000	1 µL		
Volumen final en el pocillo (mezcla de transfección + medio)			500 µL

Tabla 4.- Condiciones de transfección con Lipofectamina 3000 en placa de 24 pocillos.

1.8. Transfección de ARN-Silenciamiento

Otra forma de regulación de la expresión de genes utilizada en esta tesis fue a través del silenciamiento génico. En este caso, en vez de ADN, se introducen a las células moléculas de ARN interferente (siRNA – *Small interfering ARN*) para suprimir la expresión de genes específicos. En esta tesis, en todos los casos, los siRNA fueron co-transfectados con ADN de genes que se querían sobre-expresar y se trabajó con células

HEK293 utilizando el reactivo lipotransfectina. Al ser co-transfección, se aumentó el número de células para placas de 6 pocillos, sembrando en este caso 5×10^5 cél/pocillo. La preparación de la mezcla de transfección y los tiempos de incubación fueron iguales a los explicados anteriormente, los cambios de las cantidades de las mezclas de transfección están explicadas en la **tabla 5**.

Mezcla A		Mezcla B	
OptiMEM	125 μ L	OptiMEM	125 μ L
ADN	1,5 μ g	Lipotransfectina	8 μ L
siRNA	100 nM		
Volumen final en el pocillo (mezcla de transfección + medio)			2,5 mL

Tabla 5.- Condiciones de co-transfección con lipotransfectina en placa de 6 pocillos.

Como control se silenciamiento se utilizó un siRNA irrelevante (siControl) a la misma concentración del siRNA específico. Los diferentes siRNAs utilizados están indicados en la **tabla 6**.

siRNA	ID	Casa comercial
siControl Silencer	AM4637	Thermo Fisher Scientific
siControl Silencer Select	4390843	Thermo Fisher Scientific
siDHFR (Silencer Select)	S4080	Thermo Fisher Scientific
siDHODH (Silencer Select)	S4083	Thermo Fisher Scientific
siPAICS (Silencer)	AM51333	Thermo Fisher Scientific

Tabla 6.- Listado de siRNAs utilizados en esta tesis. Las concentraciones de uso están especificadas en el apartado de resultados.

1.9. Tratamientos

Además de la modulación de genes diana con las técnicas antes mencionadas, en algunos casos se quiso analizar la expresión de los transportadores como respuesta a incubaciones con diferentes sustratos o a tratamientos que bloqueaban en distintos puntos el metabolismo de nucleótidos (**Tabla 7**). El primer inhibidor utilizado fue el Brequinar (BQR), un inhibidor específico de la DHODH mitocondrial de mamíferos (vía de síntesis *de novo* de las pirimidinas), a una concentración de 10 μ M. El segundo

inhibidor utilizado fue el inhibidor específico de ATIC, el Cpd14 (Spurr y col., 2012), capaz de bloquear la homodimerización de esta enzima (de síntesis *de novo* de las purinas). Este se utilizó a las concentraciones 10, 100 y 200 μM . Por último, se utilizó el inhibidor Nitrobenziltioinosina (NBTI), específico del transportador ENT1, participe de la recaptación de nucleósidos y por tanto de las vías de salvamento. NBTI también se utilizó a 10 μM , una concentración que inhibe también a hENT2. Las constantes de inhibición de todos los inhibidores se encuentran en el orden de nM, con lo que se eligieron concentraciones un orden de magnitud por arriba para asegurar una inhibición alta.

En los casos donde se quiso estudiar el efecto de un tratamiento sobre la regulación, los inhibidores fueron añadidos después de la transfección. Las células HEK293 transfectadas fueron tratadas con BQR, Cpd14 y/o NBTI durante las 6 horas previas al análisis. El tiempo de tratamiento se eligió en función a datos previos generados en el laboratorio. La evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Cpd14 se hizo de forma indirecta, evaluando el estado de fosforilación de la AMPK. Se trabajó con células HEK293 sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 cél/pocillo. Después de 24 horas, se incubaron las células durante 18 horas con Cpd14 a 100 o 200 μM . El análisis de la fosforilación de AMPK se hizo por western blot.

Inhibidor	Diana	IC50 (nM)	Referencia	Casa comercial
Brequinar (BQR)	DHODH	20	HY-108325	MedChemExpress
Cpd14	ATIC	691 (Ki)	118490	Merck
S-(4-Nitrobenzil)-6-tioinosina (NBTI - NBMPR)	ENT1	3,6	N2255	Sigma-Aldrich
Metabolito				
BH₄ - ((6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin dihydrochloride)			<u>T4425</u>	Merck
BH₂ (7,8-Dihydro-L-biopterin)			37272	Merck

Tabla 7.- Listado de inhibidores y sustratos utilizados en esta tesis. Las concentraciones de uso están especificadas en el texto.

Además del tratamiento con inhibidores, las células fueron tratadas con los metabolitos BH₂ o BH₄. Brevemente, las células HEK293 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 3,5x10⁵ cél/pocillo. Después de 24 horas se incubaron con medio de cultivo suplementado con BH₂ o BH₄ a una concentración de 50 µM, con base en bibliografía consultada (Ohashi y col., 2017; Ohashi y col., 2011). La incubación se mantuvo durante 24 o 48 horas.

Al finalizar todos los tratamientos con inhibidores o metabolitos, las células fueron congeladas y guardadas para su posterior análisis por RT-qPCR, como se detalla en el apartado 1.7.

2. Biología molecular

Se utilizaron estrategias de biología molecular para incorporar la secuencia codificante de los genes de interés en el vector de expresión pcDNA3.1 o en los vectores del sistema NanoBRET (pNLF1-N, pNLF1-C, pHTN y pHTC), así como para luego amplificar y purificar el ADN plasmídico. A menos que se especifique lo contrario, todas las secuencias fueron amplificadas utilizando la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific).

2.1. Diseño de primers y clonamiento

Se diseñaron primers para clonar los genes QDPR, hCNT1 y hCNT3 en cada uno de los 4 vectores del sistema NanoBRET. Estos vectores tienen una región Multi Cloning Site (MCS) de donde fueron elegidas diferentes dianas de restricción para cada uno de los genes. Estas dianas fueron incluidas en la secuencia de todos los primers diseñados. Se muestra en la **tabla 8** los primers utilizados para el clonamiento en el sistema NanoBRET y la diana de restricción elegida en cada caso. Este sistema está diseñado para generar proteínas fusión y por ello sus vectores incorporan a la secuencia del gen de interés la secuencia de uno de los dos tags del sistema. Los vectores pNLF1-N y pNLF1-C incorporan a la proteína un NanoLuc (NL) en el extremo N o C terminal, respectivamente, mientras de los vectores pHTN y pHTC incorporan un HaloTag (HT) en el extremo N o C terminal, respectivamente. Para asegurar la expresión del NL o HT en la región C-ter de las proteínas fusión, en los primers Rv diseñados para clonar en los vectores de expresión con el tag en el C-ter (pNLF1-C y pHTC), el codón STOP del gen fue eliminado.

Gen	Vector	Secuencia 5' – 3'	Diana de restricción
QDPR	pNLF1-N pHTN	Fw- 5'- ATT CGATCG ATATGGCGGCGGGCGGCG Rv: 5'- TTA CCGCGG TTAAAAATATGCTGGGGT GAGTTCCG	PvuI SacII
	pNLF1-C pHTC	Fw- 5'- ATT CGATCG ATGGCGGCGGGCGGCG Rv: 5'- TAA CCGCGG AAAATATGCTGGGGTGA GTTC	PvuI SacII
hCNT3	pNLF1-N pHTN	Fw: 5'- TAA CCGCGG ATGGAGCTGAGGAG TACAG Rv: 5'- GGC CCTGCAGG TTAAAATGTATTAGA GATCCC	SacII SbfI
	pNLF1-C pHTC	Fw: 5'- CTA GCTAGC ATGGAGCTGAGGAGTAC AG Rv: 5'- TCC CCGCGG AAATGTATTAGAGATCC CATTGC	NheI SacII
hCNT1	pNLF1-N pHTN	Fw 5'- CG GAATTC ATGGAGAACGACCCCTCG AGAC Rv: 5'- TCT TAGAT CACTGTGCACAGATCGT GTGGTTG	EcoRI XbaI
	pNLF1-C pHTC	Fw: 5'- CG GAATTC ATGGAGAACGACCCCTCG AGAC	EcoRI

Rv: 5' – CG <u>TCTAG</u> ACTGTGCACAGATCGTGTG XbaI G
--

Tabla 8.- Primers diseñados para la clonación de los CDS de los genes QDPR, hCNT3 y hCNT1. Se indican las secuencias de las dianas de restricción en negrita y subrayado.

2.2. Mutagénesis sitio-dirigida

La sustitución V15A fue introducida a la secuencia de QDPR pcDNA3.1(+) o QDPR pHTN utilizando la enzima ADN polimerasa *Phusion* y con pares de primers diseñados para introducir la sustitución T>C en la posición 44 de la secuencia. El detalle de los primers utilizados se muestran en la **tabla 9**. Previo a la PCR, cada *primer* tuvo que ser fosforilado para que la secuencia luego pudiera auto-ligarse. Para ello, se utilizó la enzima T4 Polinucleótido Quinasa (PNK, Thermo Fisher Scientific – 10 U por reacción), incubando cada primer por separado a 37°C durante 20 minutos, en presencia de ATP a concentración final de 1 mM. La enzima luego se inactivó a 75°C durante 10 minutos. La PNK tiene un límite máximo de fosforilación de 50 pmol de extremo 5'. El cálculo de la cantidad de moles de primer correspondiente se calculó de la siguiente forma:

Si se considera que: 1µg 20mer = 150 pmol de extremo 5' (siendo mer el número de bases del *primer*), se puede calcular la equivalencia de pmol extremo 5' según la longitud de cada primer que se iba a fosforilar. Luego, se calcularon los ng correspondientes a los 50 pmol de extremo 5' y luego se transforman a pmol (porque los *stocks* de *primers* están en unidades de molaridad), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{pmol ssDNA} = \frac{1\mu\text{g ssDNA}}{1\text{Nb}} \cdot \frac{103\text{ng}}{1\mu\text{g}} \cdot 3030$$

Gen	Mutación	Secuencia 5'-3'
QDPR	44 T>C	FwI: GGGCGCTCTGGGTTCTCGATG RvI: CTGCCGCCGTAC <u>G</u> CC

Tabla 9.- Primers diseñados para la generación del mutante V15A de QDPR. La base sustituida se indica en negrita y subrayada.

La PCR de mutagénesis se realizó utilizando 10 pmol de cada *primer* y una mezcla de dNTPs (dTTP, dCTP, dGTP) sin dATP, ya que este estaba incluido en el volumen de los primers utilizados (de la mezcla de fosforilación). Ya que la sustitución se hizo en la secuencia de QDPR WT previamente clonada en los vectores pcDNA3.1 o pHTN, la secuencia mutante fue subclonada a nuevos vectores utilizando las mismas secuencias de restricción que habían sido previamente incorporadas a la secuencia WT (pcDNA3.1: KpnI + XhoI; pHTN: PvuI + SacII).

2.3. Vectores de clonamiento

- **pcDNA3.1 (+) (Clontech):** Este es un vector de expresión mamífero de 5,4 kb y permite la selección por ampicilina. Cuenta con el promotor de citomegalovirus (CMV) que permite una gran eficiencia en la expresión del plásmido. Se muestra un esquema representativo del vector donde se detalla su multicloning site (MCS) (**Figura 10**). En esta tesis se utilizó para clonar el mutante QDPR V15A (KpnI + XhoI).

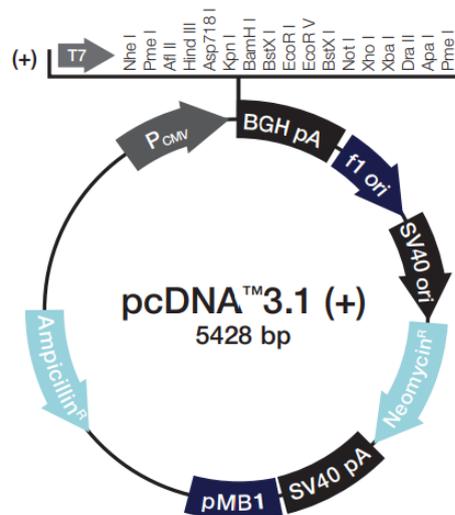


Figura 10. Esquema representativo del vector pcDNA3.1(+). Imagen obtenida de Invitrogen.

- **Vectores del sistema NanoBRET (Promega):** El sistema NanoBRET está formado por cuatro vectores de expresión que permiten la creación de proteínas fusión con NanoLuc (NL) o HaloTag® (HT). Estos son pHTC HaloTag® CMV-Neo (6,1 kb), pHTN HaloTag CMV-neo (6,1 kb), pNLF1-C [CMV-Hygro] (5,9 kb) y pNLF1-N [CMV-Hygro] (5,9 kb). Cada uno de los cuatro vectores del sistema cuentan con un promotor CMV antes del MCS y cada uno de los MCS son específicos para cada vector. Todos ellos permiten la selección por ampicilina.

Los diferentes tags están ubicados después del promotor y antes del MCS, en el caso de pHTN y pNLF1-N. Esto permite que las proteínas fusión generadas a partir de estos vectores presenten el tag en el extremo N-terminal. En cambio, pHTC y pNLF-C presentan el tag después del MCS para asegurar que este quede en el extremo C-terminal de la proteína fusión. El esquema representativo de los vectores, así como el detalle de sus MCS se detallan en la **figura 11**. En esta tesis, los vectores del sistema NanoBRET se utilizaron para clonar a QDPR hCNT1 y hCNT3. La variante V15A de QDPR se clonó solo en pHTN.

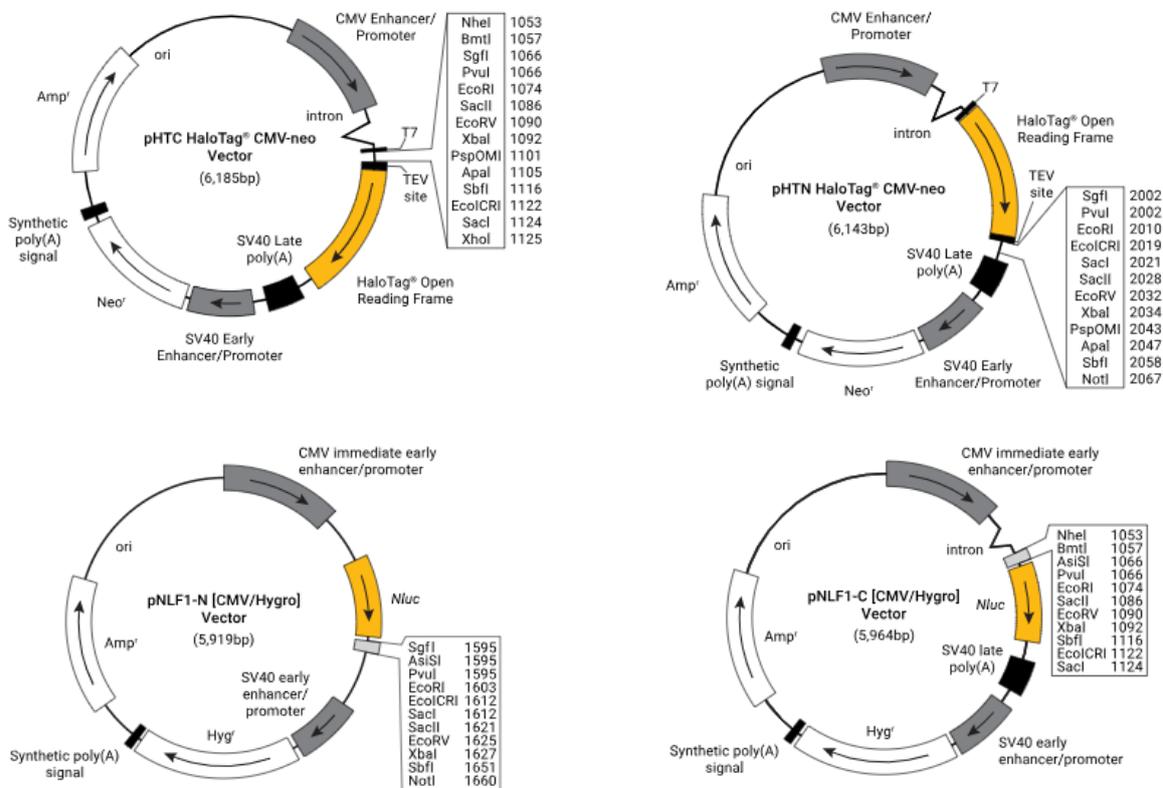


Figura 11. Esquema representativo de los vectores del sistema NanoBRET. Imagen obtenida de Promega.

2.4. Digestión y ligación

Para clonar un inserto de ADN en un vector específico, se digirieron ambos con las mismas enzimas utilizadas para el diseño del primer, cuidando de utilizar un tampón 10X compatible para ambas enzimas utilizadas, asegurando condiciones óptimas para la reacción, y 5-10 U de enzima por reacción. Todas las enzimas de restricción utilizadas

en esta tesis fueron de la casa comercial Thermo Fisher Scientific. En el caso de que no existiera un tampón óptimo para hacer una digestión doble (como fue el caso con SacII + SbfI), se hicieron digestiones sencillas con una sola enzima, se purificó con el kit DNA *Clean & Concentrator* (Zymo Research) y se hizo una segunda digestión con la segunda enzima, tanto para el inserto como para el vector. Las digestiones de 1,5 µg de ADN se realizaron a durante 1 hora a 37°C (**Tabla 10**).

1x	
ADN plasmídico	1 µg
Tampón de la enzima 10x	1X
Enzima de restricción	10U total (5U cada una, sí es doble digestión)
H₂O	Hasta 20 µL

Tabla 10. Mezcla general de digestión, sencilla y doble.

Para evitar que el vector una vez digerido volviera a circularizarse se trató con fosfatasa alcalina (*FastAP*, - ThermoScientific - 1U/1 µg de vector linealizado) para eliminar el fosfato 5'. En general, la fosfatasa fue añadida después de haberse completado el tiempo de digestión, sobre la misma mezcla, ya que es activa en los tampones de las enzimas de la misma casa comercial. Otra opción menos frecuente fue la de la preparación de la mezcla de digestión directamente con la *FastAP* (**Tabla 11**).

1x	
ADN plasmídico	1 µg
Tampón de la enzima 10x	1X
Enzima de restricción	10U total (5U cada una, sí es doble digestión)
FastAP*	1U
H₂O	Hasta 20 µL

Tabla 11. Mezcla de digestión con tratamiento con fosfatasa alcalina en simultáneo.

Después de las digestiones y el tratamiento con fosfatasa alcalina (en el caso de los vectores), todo el ADN digerido fue purificado utilizando nuevamente el kit DNA *Clean & Concentrator* (Zymo Research). Según el tamaño del vector fue necesario calcular la

cantidad de inserto que podía ser ligado. Esto fue calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{ng inserto} = \text{ng vector} \frac{Kb \text{ inserto}}{Kb \text{ vector}}$$

Para ligar, se utilizaron 1U de la enzima Ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific), el tampón de la ligasa 10X, el vector y los ng previamente calculados de inserto (**Tabla 12**). Esta mezcla fue incubada a 22 °C durante 1 hora. Las ligaciones fueron hechas con 50 ng de vector y se realizaron dos ratios vector:inserto; 1:1 y 1:3, para mejorar la eficiencia de la ligación, y además un control sin inserto como control de autoligación.

1x	
Inserto	ng calculados por vector
Vector	50 ng
Tampón T4 Ligasa 10X	1X
Ligasa T4	1U
H₂O	Hasta 10 µL

Tabla 12. Mezcla de ligación.

2.5. Preparación de bacterias competentes

Todos los plásmidos utilizados en esta tesis se amplificaron en bacterias *Escherichia coli* cepa XL1-blue previamente tratadas con CaCl₂ y almacenadas en el *stock* del laboratorio. Todo el procedimiento se realizó en esterilidad. Para su preparación, se inoculó 3 mL de medio LB (*Luria-Broth* - autoclavado: triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v)) con una pequeña cantidad del *stock* de *E. coli* y se incubó en agitación a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se tomó 1 mL de este crecimiento y se inoculó 75 mL de medio SOB (triptona 2% (p/v); extracto de levadura 0,5% (p/v); NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM - Se autoclava y luego se suplementa con 2,5 mL de cada una de las soluciones filtradas de: MgCl₂·6H₂O 10 mM y MgSO₄·7H₂O 10 mM). El crecimiento se incubó a 37°C hasta alcanzar la densidad óptica que corresponde a la fase de crecimiento exponencial (DO= 0,375-0,4). Para verificar la densidad óptima se tomaron alícuotas del crecimiento, en esterilidad, cada 15-20 minutos y la absorbancia fue determinada a 550 nm. Cuando se alcanzó la DO deseada, se llevó el crecimiento al hielo durante 15 minutos. Luego, fue centrifugado a 4500G a 4°C y durante 15 minutos y luego el sobrenadante se descartó por decantación. El pellet de bacterias fue resuspendido en 25 mL de medio RF1 (Filtrado: RbCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM,

CaCl₂·2H₂O 10 mM, acetato de potasio 30 mM, glicerol-87% 15% (v/v), ácido acético 10 mM) y se incubó en hielo durante 20 minutos. Pasado el tiempo, se volvió a centrifugar a 4500G a 4°C y durante 15 minutos y luego el sobrenadante se descartó por decantación de nuevo. El pellet se resuspendió en 6 mL de medio RF2 (Filtrado: RbCl 10 mM, CaCl₂·2H₂O 75 mM, MOPS 10 mM, glicerol-87% 15% (v/v), NaOH 100 mM). Las bacterias fueron incubadas 15 minutos más en hielo y luego se hicieron alícuotas de 50-100 µL, que fueron congeladas de inmediato en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C.

2.6. Transformación y amplificación de plásmidos

Para amplificar los plásmidos es necesario introducir la secuencia de ADN en bacterias competentes, en este caso por choque térmico. El stock de bacterias competentes se almacena a -80°C y su preparación está detallada en el apartado 2.5. Para transformar las ligaciones se mezclaron 50 µL de las bacterias (en frío) con 5 µL de la mezcla de ligación. Luego esta mezcla se incubó durante 15 minutos en hielo y posteriormente se realizó el choque térmico incubando la mezcla durante 1 minuto 45 segundos a 42°C y luego 1-2 minutos en hielo. Para permitir que las bacterias se recuperasen después del choque térmico, se le añadió 1 mL de medio LB autoclavado: 1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura, 1% (p/v) NaCl) y se llevó a 37°C en agitación. En el caso de la transformación de un plásmido circular, se utilizó el mismo volumen de bacterias competentes, pero se le añadieron 50-200 ng del ADN. Luego se incubó en hielo por 5 minutos y se realizó el choque térmico y la recuperación igual a como se explicó anteriormente.

Pasado el tiempo de incubación, las bacterias se centrifugaron durante 5 min a 3500 rpm. Se descartaron 700 µL del sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen restante. Las bacterias fueron sembradas en placas de agar con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 16-18 horas aproximadamente. Las colonias bacterianas obtenidas son bacterias que han podido incorporar correctamente el ADN después de la transformación.

2.7. Obtención del ADN plasmídico de bacterias competentes

Para la amplificación de los plásmidos generados se hicieron crecimientos bacterianos en medio LB a partir de las colonias obtenidas después de la transformación. La colonia

aislada seleccionada se pasó a 3 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100µg/mL) y se dejó crecer durante 16-18 horas a 37°C, en agitación. El ADN se purificó de este crecimiento mini-prep utilizando el kit comercial *E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit* (OmegaBiotek). Este ADN en general fue utilizado para verificar la ligación y posteriormente la secuencia insertada en el plásmido por secuenciación.

También se hicieron crecimientos midi-prep para purificar más cantidad de ADN que luego fue el utilizado para las diferentes transfecciones. Este se hizo añadiendo 150 µL del crecimiento mini-prep a 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100µg/mL) y se dejó crecer durante 16-18 horas a 37°C, en agitación. El ADN luego fue purificado utilizando el kit comercial *NucleoBond Xtra Midi/Maxi* (Macherey-Nagel).

2.8. Verificación del inserto

Para la verificación de la correcta inserción del inserto de interés en el plásmido, se utilizaron dos estrategias: la verificación por digestión o la verificación por PCR. En ambos casos, los resultados de la digestión o de la PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa. Para esta, se utilizaron geles de agarosa de 1% preparados en tampón TBE 0,5X (dilución 1/10 de TBE 5X: Tris-base 0,5M, ácido bórico 0,45M, EDTA 5 mM), tampón que también fue utilizado para la corrida de electroforesis. A la mezcla del gel también le fue añadido *SYBR Safe* (Invitrogen), un tinte que permite visualizar el material genético utilizando luz azul o UV.

Por último, a todas las muestras (digestiones o productos de PCR) se les añadió un tampón de carga. Las muestras se corrieron en paralelo al marcador de peso molecular ADN 1Kb Plus (Thermo Fisher Scientific).

- **Verificación por digestión:**

Se realizó aprovechando el ADN extraído del crecimiento mini (apartado 2.6). Se digirieron 500-600 ng de ADN con las mismas enzimas de restricción utilizadas para clonar el gen a verificar, siguiendo el protocolo previamente explicado (**Tabla 10**). La visualización del inserto se hizo por electroforesis en gel de agarosa, donde el inserto liberado del plásmido después de la digestión de verificación pudo ser identificado por su peso molecular. Se consideró una buena ligación cuando el producto de la digestión permitió visualizar bandas de ADN en los pesos moleculares esperados para el inserto de interés.

- **Verificación por PCR:**

Se realizaron crecimientos mini-prep tal y como fue explicado anteriormente, habiendo hecho previamente una estría con la misma colonia en una placa de agar con el antibiótico correspondiente. Del cultivo mini-prep se tomaron 250 μL y se centrifugaron durante 5 min a 6000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en el mismo volumen de agua (250 μL). Posteriormente, se hirvió durante 10 minutos a 95°C. Pasado el tiempo, la muestra volvió a ser centrifugada durante 5 min a 6000 rpm. El sobrenadante fue utilizado como muestra para la PCR de verificación (**Tabla 13**). Esta PCR se realizó con los mismos primers utilizados para la incorporación de las dianas de restricción a la secuencia (**Tabla 8**) y se utilizó la mezcla de ADN polimerasa *DreamTaq Green PCR 2X* (Thermo Fisher Scientific).

	Volumen (μL)
	1X
DreamTaq Green PCR 2X	10 μL
Primer fw [25 μM]	1 μL
Primer rv [25 μM]	1 μL
Medio previamente hervido	5 μL

Tabla 13. Mezcla de PCR de verificación de inserto.

2.9. Secuenciación

Las secuencias de los genes clonados y la correcta sustitución de bases por mutagénesis sitio-dirigida fueron verificadas mediante secuenciación por el método Sanger. Se utilizó el kit de secuenciación *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit v3.1* (Applied Biosystems). Se utilizaron pares de primers específicos para secuenciar cada vector del sistema NanoBRET y en los casos de hCNT1 y hCNT3 se utilizaron además primers internos a la secuencia (**Tabla 14**).

Vector	Secuencia (5'-3')
CMV fw (pcDNA3.1)	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGH rv (pcDNA3.1)	TAGAAGGCACAGTCGAGG
pNLF1-N fw	GCGCCTGATCAACCCCGACG
pNLF1-N rv	GGTTTGTCCAAACTCATCAATG
pNLF1-C fw	GGTCTTACTGACATCCACTT

pNLF1-N rv	CACACCTCCCTGTTCAAGGAC
pHTN fw	GAAGACAACCCGGACCTGAT
pHTN rv	GTGGTTTGTCCAAACTCATC
pHTC fw	GGCACCTATTGGTCTTACTG
pHTC rv	TGCATGCGCTCGCCCAGGAC
hCNT1 – Internos	
hCNT1 seq fw	ACAGAACCAGGATTCATTGC
hCNT1 seq rv	GCAATCAGGTTGGCAGCGAT
hCNT1 seq final fw	TGGTGAACGCCTGTATGGCA
hCNT1 seq principio rv	CGAAACAGCTGCATGTGCTC
AdhCNT1 seq int fw	GAGCACATGCAGCTGTTTCG
AdhCNT1 seq int rv	GCAATGAATCCTGGTTCTGT
hCNT3 - Internos	
CNT3 int 1 Fw	ACAGGTCACAGTTGAGCAGG
CNT3 int 3 Rv	GTATGCACCTAGCACGCTTC
CNT3 int 4 fw	GACCTGTCTTATGGGGAATCG
CNT3 int 5 rv	GGTGCTCATAAGCCACAAATTC

Tabla 14.- Primers diseñados para la secuenciación de los diferentes clones generados en esta tesis.

Las PCR se hicieron en el laboratorio y el producto de PCR se procesó en la Unidad de Genómica de los Centros Científicos y Tecnológicos (CCiTUB) de la Universitat de Barcelona. Se utilizó la herramienta de bioinformática *Emboss Needle Pairwise Sequence Alignment* (*European Bioinformatics Institute* - https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) para comparar la secuencia obtenida con la secuencia de referencia para cada gen.

3. Análisis de la expresión de ARN

La expresión de ARN se analizó por PCR en tiempo real (RT-qPCR), utilizando SYBR green o sondas TaqMan. Para evitar la degradación del ARN por RNasas, la extracción fue realizada en frío y con material autoclavado o libre de RNasas. Para evitar contaminaciones, la síntesis de cDNA y la preparación de la reacción de RT-qPCR se hizo en campana de flujo vertical y utilizando puntas con filtro, libres de RNasas.

3.1. Extracción de ARN y cuantificación

El ARN analizado en esta tesis se obtuvo a partir de células en monocapa, previamente transfectadas o tratadas con fármacos y congeladas como fue explicado en los apartados 1.7, 1.8, 1.9, o células en suspensión sin tratamiento previo. En el caso de las células en suspensión, el medio de cultivo más las células fueron recogidas en tubos de 15 mL después de 24, 48 o 72 horas de cultivo y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y el pellet fue congelado en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción. La extracción del ARN de las células en monocapa y de las células en suspensión se hizo utilizando el kit de extracción de ARN *E.Z.N.A Total RNA Kit I* (Omega BIO-TEK), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para conseguir buenas concentraciones de ARN, la elución se hizo con 50 μ L de agua libre de nucleasas.

Para cuantificar, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 a una longitud de onda de 260 nm para medir ácidos nucleicos y a 280 nm para medir los posibles remanentes de proteína. La ratio entre las dos densidades ópticas 260/280 debe estar entre 1,8-2, indicando un material genómico libre de contaminación por proteínas.

3.2. Síntesis de cDNA

La retrotranscripción del ARN a cDNA es necesaria para el posterior análisis por RT-qPCR. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 μ g del ARN extraído en 10 μ L de agua libre de nucleasas y utilizando la enzima transcriptasa reversa *M-MLV RT* (Invitrogen) y el inhibidor de ARNasas *Ribolock* (Thermo Scientific). El ARN se desnaturalizó a 65 °C durante 5 minutos. Aparte, se preparó cDNAmix (preparado con el tampón *5X first strand* de la retrotranscriptasa suplementado con 0,1 M DTT, 10 mM dNTPs y 240 ng de random primers) y, una vez finalizada la incubación de 5 minutos se añadió a cada muestra de ARN el mismo volumen de la mezcla de cDNAmix (10 μ L), para un volumen final de 20 μ L. Esta nueva mezcla se incubó a 37°C durante 50 minutos y luego la enzima fue desnaturalizada a 70°C durante 10 minutos.

3.3. RT-qPCR – TaqMan

El análisis de los transcritos de ARN se realizó utilizando el sistema *TaqMan Gene Expression Assays* (Apply Biosystems), en la mayoría de los experimentos. Las determinaciones relativas se hicieron comparando los niveles de expresión en cada condición con respecto a un control y, en el caso de las determinaciones absolutas, la

comparación se hizo con respecto a una recta patrón del gen de interés. Para la reacción, se preparó, para cada gen y por duplicado, una mezcla con 10 µL *TaqMan Universal PCR MasterMix 2X* (Applied Biosystems), 1 µL de la mezcla de sonda 20X más primer (Tablas 15 y 16) y 9 µL (50 ng) de cDNA, en placas ópticas de 96 pocillos. El sistema TaqMan utiliza sondas fluorogénicas, con un reportero fluorescente en el extremo 5' y un *quencher* en el extremo 3'. Al reconocer la secuencia diana, los primers permiten su amplificación y así la sonda puede unirse a la nueva cadena de ADN. La actividad 3' exonucleasa de la polimerasa degrada la sonda y separa la sonda reportera del *quencher*, permitiendo la emisión de fluorescencia de la sonda. Esta fluorescencia es detectada y va aumentando a medida que avanzan los ciclos. Se determinan así dos límites: un límite basal donde se considera que existe amplificación del producto de PCR por encima de esta línea y, por arriba de esta, un límite umbral (*Threshold*). Cuando la fluorescencia supera este umbral se determina el ciclo límite, o C_T. Las reacciones se realizaron en el termociclador *7500 Real Time PCR system* (Applied Biosystems).

Gen	Referencia	Reportero	Quencher
DHFR	Hs07291712_m1	FAM	MGB
DHODH	Hs00361406_m1	FAM	MGB
GAPDH	4310859	VIC	TAMRA
MTHFD1	Hs01068263_m1	FAM	TAMRA
MTHFD2	Hs00741165_m1	FAM	MGB
PAICS	Hs00935017_gH	FAM	MGB
QDPR	Hs01077088_m1	FAM	MGB
SHMT1	Hs00541038_m1	FAM	MGB
SHMT2	Hs00193658_m1	FAM	MGB

Tabla 15.-Sondas comerciales TaqMan utilizadas.

Gen	Primers	Sonda	Quencher
SLC28A1	Fw: TGATTTCTTGGAAAGCCTGGA Rv: CTGCTCCTGATCTCTGCGG	FAM	TAMRA
SLC28A2	Fw: AAGTAGAGCCTGAGGGAAGCAA Rv: GCCCAGTCCATCCCC	FAM	TAMRA
SLC28A3	Fw: GAGCTGTGCAAAGCAGGGA Rv: TGGAGAATCCTGCTCAACTGTG	FAM	TAMRA

SLC29A1	Fw: GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA Rv: TTCATTGGTGGGCTGAGAGTT	FAM	TAMRA
SLC29A2	Fw: CCCTGGATCTTGACCTGGAG Rv: GGTTTTCTGGCTTCTGGG	FAM	TAMRA

Tabla 16.- Sondas TaqMan diseñadas en el laboratorio. (Molina-Arcas y col., 2003).

Al ser una RT-qPCR relativa, se utilizó como control el gen endógeno GAPDH. Con la media de los C_T duplicados por gen de interés y del gen endógeno se calculó la ΔC_T , restándole al C_T de la muestra el C_T del control endógeno. También se calcula el error estándar de este ΔC_T , ($\sqrt{\text{SE muestra} - \text{SE endógeno}}$). Luego, el $\Delta\Delta C_T$ se determina restando el ΔC_T del endógeno al ΔC_T de cada condición. El resultado final se expresa en $2^{-\Delta\Delta C_T}$ como unidades arbitrarias y corresponde a la cantidad de veces que cada condición aumenta con respecto al control experimental. Para calcularlo se le aplica una potencia en base 2 a $-\Delta\Delta C_T$.

3.3.1. RT-qPCR absoluta - Recta patrón

En esta tesis la RT-qPCR absoluta se utilizó para determinar la presencia de mensajeros correspondientes a los transportadores de nucleósidos en las células B-LCLs. Para analizar los resultados obtenidos, fue necesario tener una recta patrón a diferentes concentraciones del gen a analizar clonado en un vector y previamente linealizado. Después de calcular el número de copias por μL , se preparó una recta patrón diluyendo hasta $10^2 - 10^3 - 10^4 - 10^5 - 10^6 - 10^7$ (número de copias).

Los resultados de la RT-qPCR de las muestras fueron comparados a los C_T s obtenidos a partir de la recta patrón para la determinación de la cantidad de ARN.

3.3.2. RT-qPCR - SYBR

En los casos donde se quiso hacer un screening rápido para determinar si un gen en particular era modulado bajo cierta condición experimental se optó por la RT-qPCR con SYBR *green*. Esta también fue utilizada para verificar el silenciamiento de la DHFR en los ensayos de NanoBRET.

En primer lugar, se hizo una mezcla de *primers* (stock $100\mu\text{M}$) (**Tabla 17**) de tal forma que la concentración final de cada uno (Fw y Rv) fuera de $2\mu\text{M}$. Los *primers* fueron diseñados de tal forma que cada uno de ellos se ubicara en exones diferentes de la secuencia del gen de interés, evitando así la detección de ADN genómico. Para la reacción de SYBR, se preparó una mezcla con $10\mu\text{L}$ SYBR 2X (Applied Biosystems) y

2 μ L de *primers* 2 μ M. De esta se colocaron 12 μ L por pocillo en placa de 96 pocillos. Después se añadieron 8 μ L de cDNA diluido (10 ng) por pocillo. Cada muestra se colocó por duplicado. El gen endógeno utilizado como control también fue GAPDH.

El SYBR *green* es un agente intercalante de ADN de doble cadena, no específico. Permite la cuantificación de la cantidad de ADN que está siendo amplificado en cada ciclo de PCR ya que al unirse a la doble cadena la fluorescencia que tiene la molécula se incrementa. Al igual que la RT-qPCR con TaqMan, a medida que aumenta el producto de PCR va aumentando la fluorescencia en cada ciclo hasta sobrepasar un umbral para el cálculo de las C_T. Las RT-qPCR SYBR green fueron utilizadas para *screenings* rápidos necesarios en experimentos como el NanoBRET para confirmar el silenciamiento de un gen. Todas fueron cualitativas, por lo que el análisis de los datos se hizo igual al análisis de datos de la RT-qPCR TaqMan.

Gen	Secuencia
DHFR SYBR Fw	TCACCCAGGCCATCTTAAAC
DHFR SYBR Rv	CCTCCTGGACATCAGAGAGA
GAPDH 2 SYBR Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
GAPDH 2 SYBR Rv	GAAGATGGTGATGGGATTTTC

Tabla 17.- Primers diseñados para la reacción de RT-qPCR con SYBR *green*.

4. Análisis de la expresión de proteína

4.1. Extracción de proteína a partir de cultivos celulares

Se obtuvieron extractos de proteína de células en monocapa previamente transfectadas y/o tratadas con diferentes fármacos (apartados 1.7, 1.8, 1.9). En el caso de las células en suspensión, que no tuvieron tratamiento, después de 48 horas de sembradas se recogieron en tubos de 15 mL el medio de cultivo más las células y luego se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y el pellet fue congelado en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción. Todo el procedimiento se hizo en hielo para evitar la degradación de las proteínas. Para la lisis y extracción se utilizó el tampón NP40 (50 mM Tris pH 7.4, 250 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM pirofosfato sódico y 50 mM NaF), suplementado con coctel de inhibidores de proteasas 1X *cComplete Mini* (Roche) y ortovanadato sódico 1 mM. Para la detección de proteínas fosforiladas, se utilizó un tampón diferente, que asegura la preservación de las fosforilaciones (20 mM

Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM EDTA, 10 mM pirofosfato sódico, 2 mM ortovanadato 100 mM NaF y 1 mM β -glicerofosfat), suplementado con inhibidores de fosfatasa 1X *PhoSTOP* (Roche) e inhibidores de proteasas 1X. Usualmente se añadieron 60-80 μ L de tampón suplementado a cada condición. Las células en monocapa se recogieron con ayuda de un *scraper* y luego se homogenizaron con una jeringa 25G. Los extractos proteicos fueron centrifugados en frío (4°C) durante 15 min y a 13200 rpm. Se recogieron los sobrenadantes en un nuevo tubo y se almacenaron a -20°C.

4.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó usando el reactivo comercial *Protein Assay Kit* (BioRad) en proporción 1:5 en agua destilada. Esta solución comercial está basada en la técnica colorimétrica Bradford. La recta patrón se preparó a partir de albúmina sérica bovina (BSA) 2 mg/mL, teniendo un rango de concentraciones de 0-500 mg/mL.

En general se hicieron diluciones 1:20 y 1:40, tanto para las HEK293 como para las B-LCLs. La cuantificación por dilución de cada muestra se hizo por duplicado, cargando 10 μ L de cada una por pocillo de placas de 96 pocillos. La recta patrón se cargó al mismo volumen, por triplicado. Por pocillo se añadieron 200 μ L del reactivo Bradford diluido y luego la absorbancia fue medida a 595 nM.

4.3. SDS-PAGE

Según su peso, las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturalizantes por la presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y luego fueron analizadas por western blot.

Los geles de poliacrilamida constan de dos partes: la primera es el gel concentrador o *stacking*, donde se cargan las muestras y permite el alineamiento de las proteínas antes de entrar al segundo gel, el resolutivo, que puede ser de diferentes concentraciones de acrilamida y donde se hace la separación de las proteínas por peso molecular. La elección de la concentración de acrilamida se hace en función de la proteína que se desee detectar, proteínas grandes requerirán un tamaño de poro mayor y por tanto una concentración de acrilamida menor a la necesitada por una proteína pequeña. En esta tesis, los geles resolutivos fueron hechos al 10 o 12% de acrilamida. Se especifican las cantidades para un gel del 10% de acrilamida:

- Gel concentrador o *stacking*: 2,7 mL de agua destilada; 670 μ L de mezcla comercial de acrilamidas (Bio-Rad); 500 μ L Tris 1 M pH 6,8; 40 μ L SDS al 10%; 40 μ L de persulfato de amonio (APS, Bio-Rad) al 10% y 4 μ L de tetrametiletilendiamina (TEMED, Bio-Rad).
- Gel resolutivo o *resolving*: 1,9 mL de agua destilada; 3,3 mL de mezcla de acrilamidas; 2,5 mL Tris 1,5 M pH 8,8; 100 μ L SDS al 10%; 100 μ L APS al 10% y 4 μ L de TEMED.

Se preparó el gel resolutivo y, una vez polimerizado, se le añadió arriba el gel concentrador con el peine elegido (10 o 15 pocillos) según el número de muestras que se desearan cargar.

Las muestras fueron preparadas calculando 10 o 20 μ g de proteína (variable según experimento) a volumen final de 20 μ L, con tampón de carga 1x (5X – 50 % glicerol, 5% SDS, 0.5 % azul de bromofenol, 312 mM Tris pH 6,8) suplementado con β -mercaptoetanol 5% al momento del uso. Después, las muestras preparadas se calentaron durante 5 minutos a 95°C o 30 minutos a 37°C en el caso de hCNT1 y hCNT3. Para la electroforesis se cargó en el gel el volumen completo de muestra y 4 μ L del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BioRad) y se llenó la cubeta con tampón de electroforesis 1X (10X: Tris-Base 250 mM, Glicina 1,9M, 1% SDS). La separación se hizo a 40 mA o 80 mA, dependiendo de si se montaba uno o más de un gel en paralelo, respectivamente.

4.4. Western Blot

Al finalizar la electroforesis en gel de acrilamida, se pasó a transferir las proteínas separadas a una membrana que permite la incubación con anticuerpos específicos para detectar una proteína de interés. Se utilizaron membranas de polivinilo difluoruro (PVDF) (Inmobilon-P, Millipore) que antes de ser utilizadas fueron activadas durante 15 segundos con metanol, lavadas con agua mili-Q durante 2 minutos y equilibradas en el tampón de transferencia 1X (10X: Tris-Base 250 mM, Glicina 1,9M).

El montaje para a transferencia se hizo dentro de un *cassette*, colocando esponjas y papel Whatman empapados del tampón de transferencia a cada lado, y asegurando de que el gel de acrilamida y la membrana activada quedaran en el medio. Una vez que el *cassette* estuvo dentro de la cubeta, esta se llenó con tampón de transferencia y un bloque de hielo. La transferencia se realizó a 180 mA durante 70 minutos.

Para verificar que las proteínas se hubieran transferido de forma correcta a la membrana, se hizo una incubación con una solución de rojo Ponceau (en agua destilada: 5% ácido acético, 0,1% Ponceau) y luego se lavó con agua destilada. La membrana luego fue bloqueada con leche al 5% (p/v) preparada en tampón TBS-Tween20 al 0,1% (TBS 10X: Tris-Base 200 mM, NaCl 1,5M), durante 1 hora y a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron preparados según las especificaciones de cada casa comercial (**Tabla 18**). En general, los anticuerpos fueron preparados en 5% de leche en TBS-T 1X, a excepción de aquellos en que la casa comercial indicara que tenían que prepararse en una solución de 5% de BSA en TBS-T (como es el caso de aquellos que detectan residuos de fosforilación). Los anticuerpos que no pueden ser congelados se prepararon en 5% de leche en TBS-T 1X con 0,1% de azida de sodio. Todos los anticuerpos primarios fueron recuperados después de cada incubación para reutilizarlos más adelante.

Anticuerpos primarios	Origen	Dilución	Peso molecular (kDA)	Referencia	Casa comercial
Actina	Conejo	1:2000	42	A2066	Sigma
AMPK α	Conejo	1:1000	62	5831s	Cell Signalling
hCNT1	Ratón	1:1000	60	sc-515874	Santa Cruz Biotechnology
hCNT3	Conejo	1:1000	75	HPA024729	Sigma
c-Rel	Conejo	1:1000	69	ab31413	Abcam
HaloTag	Conejo	1:1000	33 (+ proteína fusión)	G9281	Promega
NFkB p65	Conejo	1:400	64	ab7970	Abcam
NFkB p105 / p50	Conejo	1:400	50	ab7971	Abcam
NanoLuc	Ratón	1:500	19 (+ proteína fusión)	N700A	Promega
Phospho-AMPK α (Thr172)	Conejo	1:1000	62	2531S	Cell Signalling
QDPR	Conejo	1:1000	26	ab174310	Abcam

ReIB	Conejo	1:5000	62	ab33907	Abcam
Tubulina	Ratón	1:1000	50	T6074	Sigma
Anticuerpos secundarios					
α-Rabbit	Conejo	1:5000	-	sc-2027	BioRad
α-Mouse	Ratón	1:5000	-	sc-2025	BioRad

Tabla 18.- Anticuerpos utilizados para detección de proteínas por Western Blot.

Después del bloqueo, la membrana fue pasada a una bolsa de plástico en donde se le añadió el anticuerpo seleccionado antes de sellarla. La incubación se hizo durante toda la noche, a 4°C y en un agitador orbital. Pasado el tiempo, el anticuerpo primario se retiró y la membrana fue lavada con TBS-T 1X 3 veces durante 10 minutos (cada lavado). Los anticuerpos secundarios fueron preparados en 5% de leche en TBS-T 1X y la incubación se realizó en una bolsa plástica cerrada, a temperatura ambiente en un orbital y durante 1 hora.

Antes del revelado, la membrana fue lavada nuevamente 3 veces con TBS-T 1X. Todos los anticuerpos secundarios utilizados están conjugados a una peroxidasa, con lo que la detección de las proteínas se hizo por quimioluminiscencia. Para ello, se utilizó el reactivo ECL (Thermo Fisher Scientific) y el revelado se hizo en el equipo *iBright FL1500* (Thermo Fisher Scientific).

5. Ensayo nanobret

Es un ensayo basado en *bioluminiscencia de transferencia de energía* de resonancia (BRET) y la proximidad entre proteínas. Permite detectar interacciones entre proteínas próximas entre sí al medir la transferencia de energía entre una proteína donadora bioluminiscente a una proteína fluorescente aceptora. En el caso del NanoBRET la molécula donadora es un NanoLuc luciferasa (NL) y la aceptora es un HaloTag (HT) unido a un ligando fluorescente. Todos los ensayos NanoBRET realizados en esta tesis fueron del tipo *endpoint*, es decir, una única lectura a “tiempo final”.

Los NanoBRET se realizaron en células HEK293, sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad celular de 8×10^5 células/pocillo. Después de 4-6 horas, las células se co-transfectaron con los diferentes pares QDPR y hCNT3. En el caso del silenciamiento, en la mezcla de transfección se incluyó el siRNA a 100 nM. En ningún caso hubo cambio de medio. Después de 20 horas postransfección, las células transfectadas fueron lavadas con PBS 1X y tripsinizadas. Estas células se recogieron y se ajustó la densidad

a 2×10^5 cél/mL con el medio en el que se fuera a hacer en ensayo (OptiMEM o DMEM sin rojo fenol). Después, las células fueron separadas en dos *pools*, uno “experimental” al que se añadió el *HaloTag NanoBRET Ligand 618* (Promega) y otro “control sin aceptor” al que se le añadió el vehículo DMSO, ambos en dilución 1:1000. De estos dos *pools* separados se sembraron 100 μ L por pocillo en placas de 96 pocillos blancos (para cultivo celular), por triplicado. Las células luego fueron incubadas nuevamente durante 16-18 horas, hasta la lectura. Como referencia positiva, en algunos ensayos fue incluido el par optimizado p53-HT:MDM2-NL.

En el caso de realizar tratamientos con fármacos, el protocolo seguido fue el mismo, solo que la densidad celular a la que se ajustó fue de $2,2 \times 10^5$ células/mL. Después de separar los *pools* y añadir a las células el ligando 618 o DMSO, fueron sembradas 90 μ L por pocillo en placas de 96 pocillos blancos, por triplicado. Los tratamientos fueron preparados en el medio en el que se fuera a hacer el ensayo, a una concentración 10 veces mayor que la deseada para la concentración final (10X). Luego, de este tratamiento 10X fueron añadidos 10 μ L en cada pocillo y se incubó durante 16-18 horas, hasta la lectura.

Se utilizaron los inhibidores BQR y NBTI a una concentración final de 10 μ M cada uno, mientras que los nucleósidos (Citidina y Uridina) se agregaron a una concentración final de 5 μ M o 1 mM. En el caso de los experimentos que incluyeron tratamientos con siRNAs, se realizaron controles de silenciamiento. Las células remanentes después del replaqueado fueron sembradas en placas de 12 pocillos y se incubaron en paralelo al experimento NanoBRET. Después de la lectura de la placa de 96 pocillos (NanoBRET), las células fueron congeladas. El ARN fue extraído utilizando el kit *E.Z.N.A. MicroElute Total RNA Kit* (Omega BIO-TEK), y el silenciamiento fue verificado por RT-qPCR – SYBR *green*.

5.1. Optimización de la transfección

Esta optimización se hizo para la pareja o parejas de aceptor-donador elegidas en función del par con mejor mBU (BRET ratio) de todas las combinaciones posibles. El cálculo del mBU está detallado en el apartado 5.4.

Las células HEK293 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 8×10^5 cél/pocillo. 4-6 horas después fueron transfectadas con diferentes ratios de donador-aceptor (1:1, 1:10, 1:100, o 1:1000). Se siguió el mismo protocolo estándar de transfección explicado anteriormente. Brevemente, se mezcló 125 μ L de OptiMEM + 5 μ L

de Lipotransflectina. En otro eppendorf se mezcló 125 μ l de OptiMEM + la cantidad de ADN de aceptor y de donador, resumida en la **tabla 19**.

Ratio deseada (NanoLuc a HaloTag)	Cantidad usada
1:1	1 μ g pHTN + 1 μ g pNL1-N
1:10	2 μ g pHTN + 0,2 μ g pNL1-N
1:100	2 μ g pHTN + 0,02 μ g pNL1-N
1:1000	2 μ g pHTN + 0,002 μ g pNL1-N

Tabla 19. – Esquema de ratios NL – HT utilizada para la optimización de las condiciones de transfección del par QDPR pHTN:hCNT3 pNL1-N. Fuente:Promega.

Luego se incubaron juntas las mezclas de lipotransflectina y la de ADN, durante 15 min a temperatura ambiente y luego se añadió cada una al pocillo correspondiente en placas de 12 pocillos. Pasadas aproximadamente 20 horas, se siguió el protocolo de tripsinización y replaqueo explicado anteriormente para el NanoBRET estándar.

5.2. Ensayo de saturación del donador (DSA)

Como es el caso de la interacción estudiada en esta tesis (hCNT3:QDPR), para una interacción que no tenga descritos moduladores (inhibidor o potenciador), es necesario realizar un ensayo de especificidad para la validación del par. En este ensayo, llamado ensayo de saturación del donador (DSA), la cantidad del donador se mantiene constante (NL) mientras que la cantidad de aceptor (HT) se incrementa gradualmente. De esta forma, si la interacción de proteínas está forzada por la proximidad, se genera un BRET inespecífico y la señal aumentará a medida que se aumenta la cantidad de donador. Sin embargo, en una interacción específica, el incremento del aceptor logrará una saturación total de todas las moléculas aceptoras y donadoras, observándose una gráfica en forma de hipérbola donde el BRET irá aumentando hasta llegar a un plató.

El ensayo DSA se llevó a cabo sembrando células HEK293 en placas de 12 pocillos, a una densidad celular de 4×10^5 cél/pocillo. Pasadas 4-6 horas, las células se transfectaron con una cantidad constante de donador NL (hCNT3 NL, 10 ng) y diluciones seriadas del aceptor HT (QDPR HT). La ratio donador/aceptor utilizada para el DSA entre QDPR WT y hCNT3 fue de 1:100, mientras que para QDPR V15A y hCNT3 fue 1:1000. Se mezclaron 500 μ l de OptiMEM más 10 μ l de hCNT3 NL previamente diluido a 0,01 μ g/ μ l. Así se obtuvo un *master mix* del donador con una concentración de hCNT3 NL de 0,2 ng/ μ l. Luego se hicieron ocho diluciones seriadas 1:3 de QDPR HT, partiendo

de 1000ng/ μ l hasta 0,46 ng/ μ l. Se muestra a continuación una tabla con el esquema de diluciones y las diferentes ratios aceptor-donador (**tabla 20**):

	Cantidad de donador hCNT3 NL-N (ng)	Cantidad de aceptor QDPR HT-N (ng)	Ratio aceptor-donador
1	10	1000	100
2	10	333	33,3
3	10	111	11,1
4	10	37	3,7
5	10	12,3	1,2
6	10	4,1	0,41
7	10	1,4	0,14
8	10	0,46	0,046
9	10	0	-

Tabla. 20.- Esquema de diluciones del ensayo DSA. Se toma como referencia un ensayo a ratio 1:100.

Fuente: Promega.

Cada una de las 9 mezclas de transfección se hizo de la siguiente forma: 1 μ l de la dilución de QDPR HT-N correspondiente + 50 μ l del *master mix* de hCNT3 NL+ 2,5 μ l de lipotransfectina. Se incubó cada mezcla durante 15 minutos, a temperatura ambiente, y luego se añadió a las células, en el pocillo correspondiente. Pasadas aproximadamente 20 horas, se siguió el protocolo de tripsinización y replaqueo explicado anteriormente para el NanoBRET estándar. Los valores mBU se graficaron contra los valores de la ratio aceptor-donador para determinar la forma de la curva.

Para determinar la cantidad de proteína en el DSA después de ajustar la cantidad relativa de proteína entre QDPR-WT pHTN y QDPR V15A pHTN, las células transfectadas fueron incubadas con un ligando permeable de HT marcado con el fluoróforo Janelia Fluor 549 (Promega). La incubación con Janelia 546 se realizó a 37°C, durante 1 hora - 30 minutos antes del análisis. Luego, las células fueron lisadas y el extracto celular completo fue cargado en un gel SDS-PAGE. Las cantidades de proteína fueron detectadas por fluorescencia.

5.3. Lectura

Se preparó una solución 5X del sustrato añadiendo *NanoBRET NanoGlo substrate* (Promega) en el medio de cultivo del ensayo (OptiMEM o DMEM) en dilución 1:100. De

esta solución 5X se añadieron 25 μ L por pocillo. Para la lectura del NanoBRET se utilizó el lector de placas PHERAstar FS (BMG LABTECH) con el módulo de luminiscencia NanoBRET (Emisión 1: LP-610 - Emisión 2: 450-80). Se midió la emisión dual 450 nm/610 nm para cada pocillo, en simultáneo. La detección se realizó durante los primeros 10 minutos después de añadir el sustrato.

5.4. Cálculos / Análisis de datos

En NanoBRET, la unidad utilizada para expresar los resultados es el NanoBRET ratio (o BRET ratio – mBU). Para calcularlo, los valores crudos de la emisión del aceptor (Valores 618nm) fueron divididos por los valores de la emisión del donador (Valores 460nm), para cada pocillo. Así se obtuvo la ratio NanoBRET cruda (BU), que suele estar en valores decimales. Luego, este BU fue convertido a unidades miliBRET (mBU - NanoBRET ratio) multiplicando BU x 1000.

$$\frac{Em_{618nm}}{Em_{460nm}} = BU \times 1000 = mBU$$

Después, para determinar la media del NanoBRET ratio para cada set de muestras se restó la media de las muestras sin aceptor (Control – DMSO) de la media de las muestras experimentales (con ligando 618 HaloTag). Este paso elimina el *background* residual del donador.

$$\text{Media mBU experimental} - \text{Media mBU control sin ligando} = \text{mBU corregido}$$

Los resultados de esta tesis fueron expresados en BRET Ratio (mBU) o en unidades arbitrarias al normalizar con respecto al control experimental.

Aparte, como control interno para cada experimento, se calcularon los factores Z' y Z, que indican la consistencia del ensayo. Se consideró como un ensayo correcto con poca variabilidad aquellos en donde los valores de Z' o Z estuvieran entre 0,5 -1.

El factor Z' compara los valores de medias y desviación estándar de las muestras experimentales y el control.

$$\text{Factor } Z' = 1 - \left[\frac{(3X \text{ STDV experimental} + 3X \text{ STDV control sin ligando})}{(\text{Media mBU experimental} + \text{Media mBU control sin ligando})} \right]$$

En el caso del factor Z, se utilizó al realizar tratamientos con un modulador (fármacos) y toma en cuenta tanto la variabilidad del ensayo como la diferencia entre las muestras tratadas y el control sin tratamiento. * NOTA: los valores se revierten si es un enhancer, la formula es ejemplo para un inhibidor*

$$\text{Factor Z} = 1 - \left[\frac{(3X \text{ STDV sin tratamiento} + 3X \text{ STDV con tratamiento})}{(\text{Media mBU sin tratamiento} + \text{Media mBu con tratamiento})} \right]$$

6. Ensayos de transporte de nucleósidos

6.1. Medios de transporte y reactivos

Para determinar la actividad de los transportadores equilibrativos y concentrativos de nucleósidos, es necesario disponer de dos medios de cultivo diferentes. El primer medio contiene sodio (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂·2H₂O, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM Hepes y 0,1 mg/L rojo fenol. pH = 7,4). En este consideramos que tanto ENTs como CNTs tienen actividad transportadora. El segundo medio utilizado, el medio colina, es libre de sodio (137 mM ChoCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂·2H₂O, 1,2 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM Hepes y 15 mg/L rojo fenol. pH = 7,4). Al ser sodio dependiente, los transportadores concentrativos no pueden transportar nucleósidos en este medio, con lo que se asume que todo el transporte corresponde a la actividad de los transportadores equilibrativos. Por tanto, la diferencia entre el transporte en el medio colina y el transporte en el medio sodio daría como resultado la medida de transporte dependiente de sodio y correspondiente a la actividad de los CNTs, en el caso de esta tesis, de hCNT3. Además, para parar el transporte de todos los transportadores se utiliza el medio *stop* frío (NaCl 137mM y 10mM HEPES, a pH 7,4 – ajustado con Tris base 1M). Los nucleósidos utilizados como sustrato estuvieron marcados con tritio (Moravek Inc.). Se utilizaron [5-³H(N)] citidina y [5,6-³H] uridina. Para el transporte se suplementaron los medios sodio y colina con nucleósido frío a concentración final de 1 μM (Sigma – 1 mM el *stock*), y el mismo nucleósido marcado radioactivamente a una cantidad que permitiera tener 1μCi de concentración final.

Para los ensayos de competencia se utilizó el sustrato *7,8-Dihydro-L-biopterin* (BH₂ - Merck). Estos ensayos se hicieron con el fin de determinar si BH₂ podía ser transportado por hCNT3. A los medios sodio y colina ya suplementados con citidina 1 μM se le añadieron concentraciones saturantes de BH₂ (100 μM, 500 μM o 1 mM).

Las concentraciones seleccionadas fueron mucho más altas que la Km del transportador por citidina, intentando que la cantidad de sustrato compitiera por la entrada a la célula.

6.2. Transporte en células en monocapa

En esta tesis se midió la actividad del transportador hCNT3 sobreexpresado en células HEK293. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos considerando cada condición por triplicado. Después de 24 horas, se sobreexpresó hCNT3 clonado en diferentes vectores. Los ensayos de transporte se hicieron a 24 y 48 horas postransfección. En una misma placa se realizó el ensayo en ambos medios de transporte, es decir que para cada condición se hizo la medición con o sin sodio.

Brevemente, las células fueron lavadas con el medio correspondiente (sodio o colina), eliminando bien el exceso de medio en cada pocillo. Luego, se añadieron 240 µL de cada medio ya preparado con los nucleósidos y se permitió el transporte durante 1 minuto. Pasado el tiempo, el transporte se detuvo con dos lavados con medio *stop* frío. Se retiró bien el medio *stop* y las placas fueron guardadas a -20°C hasta su análisis y cuantificación de proteína.

Para preparar las muestras para la cuantificación por centelleo líquido, se añadió en cada pocillo 100 µL de tampón de lisis (Tritón X-100 0,5%, 100mM NaOH) y se agitó durante 1 hora. Las muestras fueron homogenizadas con pipeta. Luego, se recogieron 10 µL de cada pocillo para la cuantificación de proteína por el método de BCA (apartado 6.3). Los 90 µL restantes del homogenizado se recogieron en viales que previamente habían sido llenados con líquido de centelleo (Ecoscint™ H, National Diagnostics). Para poder determinar la actividad específica, se recogieron 5 µL de cada medio de transporte en viales que contenían líquido de centelleo (por triplicado). Los datos de desintegraciones por minuto (dpm) de isótopo radioactivo se obtuvieron con un contador beta (Tri-Carb 2100TR – Packard) ubicado en las instalaciones radioactivas (IRA) de la facultad de Biología

6.3. Cuantificación de proteína

La corrección de los valores de la actividad se hizo con la cantidad de proteína de cada pocillo. Se utilizó el *kit* comercial *BCATM Protein assay kit* (Pierce). Para la cuantificación se colocaron 10 µL de cada muestra homogenizada en una placa de 96 pocillos. También se cargó una recta patrón de BSA, en un rango de 0-2 mg/mL. Por último, se colocaron 200 µL de una mezcla de los reactivos A y B y se incubó a 37°C

por 30 minutos seguido de una segunda incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. La lectura de la absorbancia se hizo a 550 nm.

6.4. Cálculo de la actividad específica

Los resultados del contador de centelleo vienen dados como desintegraciones por minuto (dpm) de tritio. Para determinar la captación de sustrato (pmol) por mg de proteína, por minuto, primero es necesario calcular la actividad específica (AE) del medio de transporte radioactivo. Esto se hizo con la siguiente fórmula:

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

Una vez obtenida la AE, y teniendo previamente la concentración de proteína, se puede entonces calcular la actividad que hay en la muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad}\left(\frac{\text{pmol}}{\text{mg proteína}} \cdot \text{min}\right) = \frac{\text{dpm de la muestra} \cdot 10^3}{AE \cdot \text{volumen de la muestra} \cdot \left[\text{proteína} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}\right]} \cdot \text{min}$$

7. Inmunofluorescencia

El estudio de la ubicación intracelular de QDPR y de hCNT3 se hizo por inmunofluorescencia y microscopía confocal, aprovechando la disponibilidad de estas proteínas fusionadas a diferentes tags. Todos los ensayos de inmunofluorescencia fueron hechos en células HeLa crecidas sobre cubreobjetos. Las especificaciones de sembrado, transfección y fijado fueron explicadas previamente (apartado 1.7). Se utilizaron anticuerpos primarios dirigidos contra los tags (**Tabla 21**). Después de la fijación con PFA 4%, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X y luego se añadió la solución de bloqueo (PBS 1X, 5% BSA y 1% Tritón X-100) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los cubreobjetos con las células fueron puestos en contacto e incubados con los anticuerpos primarios seleccionados preparados en una solución con 1% BSA y 0,5% Tritón X-100, en PBS 1X, a 4°C y durante toda la noche. Al día siguiente los cubreobjetos fueron lavados tres veces con PBS 1X y luego fueron puestos nuevamente en contacto e incubados con los anticuerpos secundarios correspondientes, según el origen del anticuerpo primario utilizado. Esta incubación se hizo en oscuridad y durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado el tiempo y luego de otros tres lavados con PBS 1X, los núcleos de tiñeron incubando por 5 minutos con Hoechst en dilución 1:1000. Después de hacer

nuevamente tres lavados con PBS 1X, se realizó el montaje de los cubreobjetos sobre el portaobjetos utilizando la solución de montaje *ProLong Gold antifade reagent* (Invitrogen) de tal manera que la cara del cubreobjetos donde estaban las células estuviera en contacto con la solución de montaje. Las muestras se dejaron secar a oscuras y a temperatura ambiente durante 24 horas.

La visualización del marcaje se hizo por microscopía confocal, utilizando el microscopio confocal Zeiss 880 del Servicio de Microscopía de la facultad de biología. Se utilizó el objetivo de inmersión x63 y las imágenes fueron procesadas con el software de procesamiento de imágenes *Image J* (desarrollado por la Agencia Estadounidense de Institutos Nacionales de Salud).

Anticuerpos primarios	Origen	Dilución	Referencia	Casa comercial
HaloTag	Conejo (Rb)	1:100	G9281	Promega
NanoLuc	Ratón (m)	1:100	MAB10026	R&D
Anticuerpos Secundarios				
α-Rb Alexa 488	Cabra	1:500	A11008	Invitrogen
α-Rb Alexa 546	Burro	1:500	A10040	Invitrogen
α-m Alexa 488	Cabra	1:500	A11001	Invitrogen

Tabla 21.- Anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia.

Para el estudio de la localización de las proteínas de fusión con HT-C, el marcaje se hizo *in vivo* con un ligando de HT no permeable, en células HEK293. Las células fueron sembradas y transfectadas tal como se especifica en la sección 1.7 de los resultados. Después de 18 horas postransfección, las células transfectadas se incubaron con el ligando de HT Alexa Fluor 488 (Promega) durante 15 minutos y a 37°C. La fijación de la monocapa se hizo durante 10 minutos con metanol frío, a 4°C. El marcaje nuclear con Hoechst y el montaje se realizó tal y como fue explicado anteriormente.

8. Análisis de metabolitos (folatos – aminoácidos)

Los ensayos bioquímicos para medir los cambios metabólicos asociados a la sobreexpresión de CNT3 y QDPR fueron realizados en el Hospital Sant Joan de Déu,

por el grupo del Dr. Rafael Artuch. Los folatos fueron cuantificados por HPLC (Ormazabal y col., 2011; Ormazabal y col., 2006) mientras que los aminoácidos fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS/MS) (Casado y col., 2018). Las células fueron recogidas en PBS 1X y congeladas hasta su análisis.

8.1. Análisis de folatos totales y de 5-MTHF

Las concentraciones de folato total fueron analizadas por inmunoensayos de quimioluminiscencia automatizados. Para el análisis de las cantidades de 5-MTHF, las muestras fueron diluidas 1:2 con ácido ascórbico 5 mg/mL preparado en tampón fosfato 5 mM (pH=2,3). Luego se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 μm (Millipore). La calibración se hizo con 5-MTHF (Sigma) previamente diluido a una concentración final de 22 nmol/L. Se inyectaron 20 μL de la muestra al HPLC. El análisis de 5-MTHF se hizo por HPLC de fase reversa con detección de fluorescencia (excitación: 295 nm; emisión: 355 nm).

8.2. Análisis de aminoácidos por UPLC-MS/MS

Para la preparación de las muestras, alícuotas de 25 μL de la muestra fueron mezclados con vórtex con igual volumen de la solución del estándar interno y 150 μL de metanol/0,1% ácido fórmico. Después, las muestras fueron centrifugadas a 6000g por 10 minutos. Con el fin de aumentar su volatilidad, se realizó la reacción de derivatización se tomaron 5 μL del sobrenadante y se mezclaron con 35 μL de tampón borato (pH 8.8) y 10 μL de la solución AQC 3 mg/mL en acetonitrilo (*AccQ.Tag Ultra Derivatization Kit* – Waters). Por último, las mezclas se calentaron a 55°C por 10 min. La separación cromatográfica de las muestras se hizo con columnas CORTECS C18 (Waters) de fase reversa a 55°C. Se utilizó agua y acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico como fase móvil A y B, respectivamente. La detección se hizo con el espectrómetro de masas Water Xevo TQD triple-cuadrupolo.

9. Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico de los datos mostrados en este trabajo se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 8. Cada resultado corresponde a la media de experimentos independientes y se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

La prueba t-Student se utilizó para comparar un tratamiento o condición con un control. Por otra parte, la prueba de multivarianza ANOVA se utilizó para hacer comparaciones entre tres o más condiciones. En todos los casos, se consideró que los grupos eran estadísticamente significativos cuando el valor de p fue igual a $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.005$ (***), $p < 0.001$ (****).

Todos los esquemas generados en esta tesis fueron realizados con BioRender.

Resultados y discusión

Bloque I: Regulación funcional de los transportadores concentrativos de pirimidinas hCNT1 y hCNT3.

En los mamíferos, la principal fuente de pirimidinas en células totalmente diferenciadas o en reposo proviene de las vías de recuperación, mientras que las células altamente proliferativas también requieren de la síntesis *de novo* para cubrir la demanda. Las pirimidinas, al contrario que las purinas, son mayoritariamente absorbidas y recicladas de la dieta como nucleósidos y no como nucleobases (Harley y col., 1986). De hecho, el reciclaje de las purinas se realiza uniendo las nucleobases a PRPP en las reacciones catalizadas por APRT y HGPRT, mientras que, en el caso de las pirimidinas, estas son recicladas a partir de la fosforilación de los nucleósidos con el consiguiente uso de ATP (Duley y col., 2011). El reciclaje de pirimidinas utiliza los nucleósidos extracelulares presentes en la sangre, así como los intracelulares que provienen de la degradación del RNA y el DNA. Así, en el proceso de reciclaje de las pirimidinas es donde cobran importancia los transportadores de nucleósidos, permitiendo su captación al interior celular. A pesar de la importancia que tienen los transportadores concentrativos de nucleósidos en la fisiología celular, hasta el momento los mecanismos y elementos que los regulan en función de los requerimientos celulares, tanto a nivel transcripcional como postraduccional, no han sido estudiados en profundidad. Para iniciar el estudio de estos elementos, es importante primero determinar las variables que podrían afectar la actividad de los hCNTs, más allá de las interacciones con otras proteínas.

Para comprender mejor la dinámica de cualquier interacción proteína-proteína, se hace importante estudiar sus elementos reguladores. Y si en la interacción participan proteínas oligoméricas, no se puede descartar que parte de la regulación de estas interacciones venga dada por el estado de oligomerización de las mismas. La estructura trimérica de hCNT3 permite predecir una estructura cuaternaria similar para el resto de los hCNTs. hCNT1 y hCNT3 están ubicados principalmente en la membrana plasmática donde se encargan del transporte de nucleósidos de purinas y/o pirimidinas acoplado a un gradiente de Na^+ o de protones (en el caso de hCNT3). Si bien hCNT1 no ha sido descrito en membranas intracelulares, hCNT3 si puede ser encontrado en la membrana del retículo endoplasmático. Existirían entonces tres puntos en los que la regulación de los hCNTs podría ser evaluada: primero el ensamblaje de la estructura cuaternaria de la proteína, es decir la formación del trímero, segundo la localización de este trímero en la membrana donde realizarán su función, y por último la regulación transcripcional de sus genes.

Por tanto, en esta tesis se decidió estudiar la regulación de los dos transportadores concentrativos que participan en la regulación de los niveles de pirimidinas intracelulares, estudiando primero la dinámica de ensamblaje de oligómeros de hCNT1 y hCNT3. Se utilizaron varias estrategias experimentales para generar diferentes condiciones metabólicas y así evaluar la estabilidad de formación de estas estructuras oligoméricas. De esta forma, los cambios estructurales podrían ser vinculados a cambios metabólicos en el entorno celular. Además, la posibilidad de una regulación producida por los mismos cambios metabólicos o incluso una co-regulación entre los transportadores sentó la idea del estudio de la regulación también a nivel transcripcional.

1. Interacción entre oligómeros de hCNT1 y hCNT3.

La estructura de los transportadores concentrativos de nucleósidos pudo ser esclarecida por estudios de homología, estudios que se vieron reforzados y validados por la elucidación de la estructura cristalográfica de hCNT3, la única disponible para hCNTs hasta el momento. En este trabajo, se pudo determinar que hCNT3 forma un homotrímero (Zhou y col., 2020), y se confirmó lo que había sido descrito anteriormente por estudios de cross-linking y estudios estructurales del CNT de *Vibrio cholerae* (vcCNT) (Stecula y col., 2017; Johnson y col., 2012). Los monómeros de hCNTs están formados por 11 dominios transmembrana, donde destaca el extremo N-terminal citosólico y específico para cada isoforma (Pastor-Anglada y col., 2008). La oligomerización es una característica de muchos transportadores de membrana, una peculiaridad que en alguno de ellos puede estar vinculada al tráfico a membrana, regulación y recambio de la proteína. Tal es el caso de la familia de simportadores neurotransmisor:sodio (NSS), pertenecientes a la familia génica *SLC6*, donde se encuentran los transportadores de monoaminas serotonina (SERT), dopamina (DAT), norepinefrina (NET) o glicina (GlyT), entre otros. Se mostró por co-inmunoprecipitación que hSERT, hDAT y hNET pueden dimerizar (Kilic y Rudnick 2000; Torres y col., 2003, Kocabas y col., 2003), y además se demostró que el homólogo rDAT puede formar tetrámeros (Plenge y col., 1990). En el caso de los transportadores GlyT2 y el transportador de GABA (GAT-1), se ha demostrado que la oligomerización de ambos es importante para el tráfico efectivo de estos dos transportadores a la membrana (Bartholomaeus y col., 2008, Torres y col., 2003).

En el grupo se han utilizado estrategias de bioquímica clásica para el estudio y validación de las interacciones proteína-proteína. Sin embargo, dada la naturaleza de

las interacciones que interesaban estudiar y el interés de entender cuáles son los elementos o factores que participan en su modulación, se hizo atractivo utilizar una técnica que permitiera hacer un seguimiento de las interacciones en tiempo real. El NanoBRET es un sistema que permite realizar estudios de interacción entre proteínas en células vivas. Debido a esta característica, los cambios en cualquier interacción generados por la inclusión de moduladores al sistema pueden ser estudiados y permite seguir la dinámica de la interacción de interés. Para este fin, se planteó generar proteínas de fusión de los transportadores concentrativos incorporando a su secuencia cada uno de los tags del sistema NanoBRET: NanoLuc (pNLF1 - NL) o HaloTag (pHT - HT), y medir la interacción al co-transfectar juntas estas proteínas. Como se comentó anteriormente, la estructura cuaternaria de los hCNTs corresponde a un trímero. Si se considera que con el NanoBRET solo haría falta la interacción entre dos monómeros fusionados con las proteínas tag para tener una señal de BRET, se consideraría que una señal es equivalente a la interacción de por lo menos dos monómeros. Así, cualquier elemento modulador de la dinámica de formación de los trímeros de hCNTs podría ser estudiado por su efecto sobre la detección de la estructura dimérica. Con esto se planteó el estudio de la formación de oligómeros de hCNT3, considerando posibles factores que, al generar estrés metabólico por cambio en los niveles de nucleósidos extracelulares, modularan el ensamblaje de la estructura cuaternaria.

En primer lugar, las secuencias codificantes de los transportadores hCNT1 y hCNT3 fueron clonados en cada uno de los diferentes vectores del sistema NanoBRET. La expresión de cada una de las proteínas de fusión generadas fue comprobada por western blot, revelando con un anticuerpo específico contra hCNT1 y hCNT3. Como control, se hicieron western blots en paralelo, pero revelando con anticuerpos dirigidos contra cada uno de los tags y asegurando que los pesos moleculares para cada proteína de fusión coincidían en ambos revelados. Como controles de expresión se utilizaron a hCNT1 y hCNT3 previamente clonados en el vector de expresión pcDNA3.1. El peso aproximado para hCNT1 es de 60 kDa, mientras que el monómero de hCNT3 suele tener un peso un poco superior a 75 kDa. Sin embargo, en trabajos previos del grupo se determinó que hCNT1 está glicosilada (Perez-Torras y col., 2019), con lo que la proteína se puede detectar a 60 kDa y también se puede observar bandas de peso superior más cercanas a los 75 kDa. Considerando las glicosilaciones, el patrón de bandas obtenido con las proteínas fusión hCNT1 pNLF1 fueron cercanos a 100 kDa y los hCNT1 pHT entre 100 y 150 kDa (**Figura 12A**). En el caso de hCNT3, su sobreexpresión con el vector pcDNA3.1 permite detectarlo a unos 75 kDa (**Figura 12B**). En el laboratorio se demostró que, al igual que hCNT1, hCNT3 es glicosilado (resultados

no publicados del grupo) y, por lo tanto, además de la banda de 75 kD pueden observarse bandas de menor peso molecular, correspondientes a las formas no glicosiladas. Al sobreexpresar las proteínas de fusión NanoBRET, los tamaños obtenidos de hCNT3 pNLF1 fueron de aproximadamente 100 kDa, mientras que para los hCNT3 pHT se observaron pesos cercanos a los 110 kDa (**Figura 12B**), todos correspondientes a los tamaños esperados. Para los dos transportadores, pero más para hCNT1, entre las proteínas de fusión con los mismos vectores, hubo diferencias de expresión y tamaño según el extremo en el que estuviera ubicado el tag. Esto tiene sentido si se toma en cuenta que los sitios de glicosilación de los hCNTs se encuentran en el extremo C-terminal del transportador y, por tanto, un tag unido a esta región dificultaría esta modificación postraduccional.

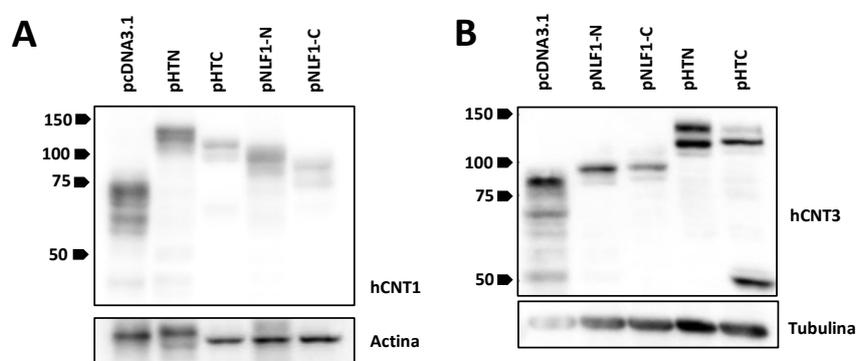


Figura 12. Análisis de la expresión de las proteínas fusión de hCNT3 y hCNT1 del sistema NanoBRET. Se analizó la expresión de las proteínas fusión de hCNT1 (A) y hCNT3 (B) del sistema NanoBRET por western blot. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes

También se estudió la ubicación subcelular de cada una de ellas. hCNT1 y hCNT3 son transportadores que están ubicados principalmente en la membrana plasmática, y la presencia de un tag podría modificar su distribución. Una de las ventajas del sistema es que la presencia de los tags NL- o HT- permitió marcar las proteínas fusión con anticuerpos específicos para ellos, para así determinar su ubicación subcelular por inmunofluorescencia (**Figura 13**). El marcaje de los NL fue hecho con un anticuerpo secundario Alexa488, con lo que hCNT3 pNLF1 se pudo ver de color verde, mientras que el marcaje de los HT fue hecho con un anticuerpo secundario Alexa549, mostrando a hCNT3 pHT de color rojo. En líneas generales, el marcaje de las proteínas fusión hCNT3 pNLF1 mostro un patrón definido en la membrana plasmática, acompañado de un patrón punteado interno, sobre todo con el hCNT3 pNLF1-N (tag en el extremo N-terminal de la proteína). En el caso de los hCNT3 pHT, fue poco el marcaje que pudo verse en la membrana plasmática, ya que la mayoría se encontró en lo que parecían

ser membranas intracelulares. Además de las ubicaciones que ya se han mencionado se ha descrito a hCNT3 retenido en membranas intracelulares en células de leucemia linfocítica crónica (LLC), desde donde su tráfico a membrana plasmática puede ser promovido por la acción del ácido trans-retinoico (ATRA) (Fernandez-Calotti y Pastor-Anglada 2010; Mackey y col., 2005). La inserción de tags grandes, como es el caso de HT, que ronda los 30 kDa de peso, a la secuencia de hCNT3 podría estar modificando su localización intracelular, promoviendo la acumulación de la proteína en compartimientos internos.

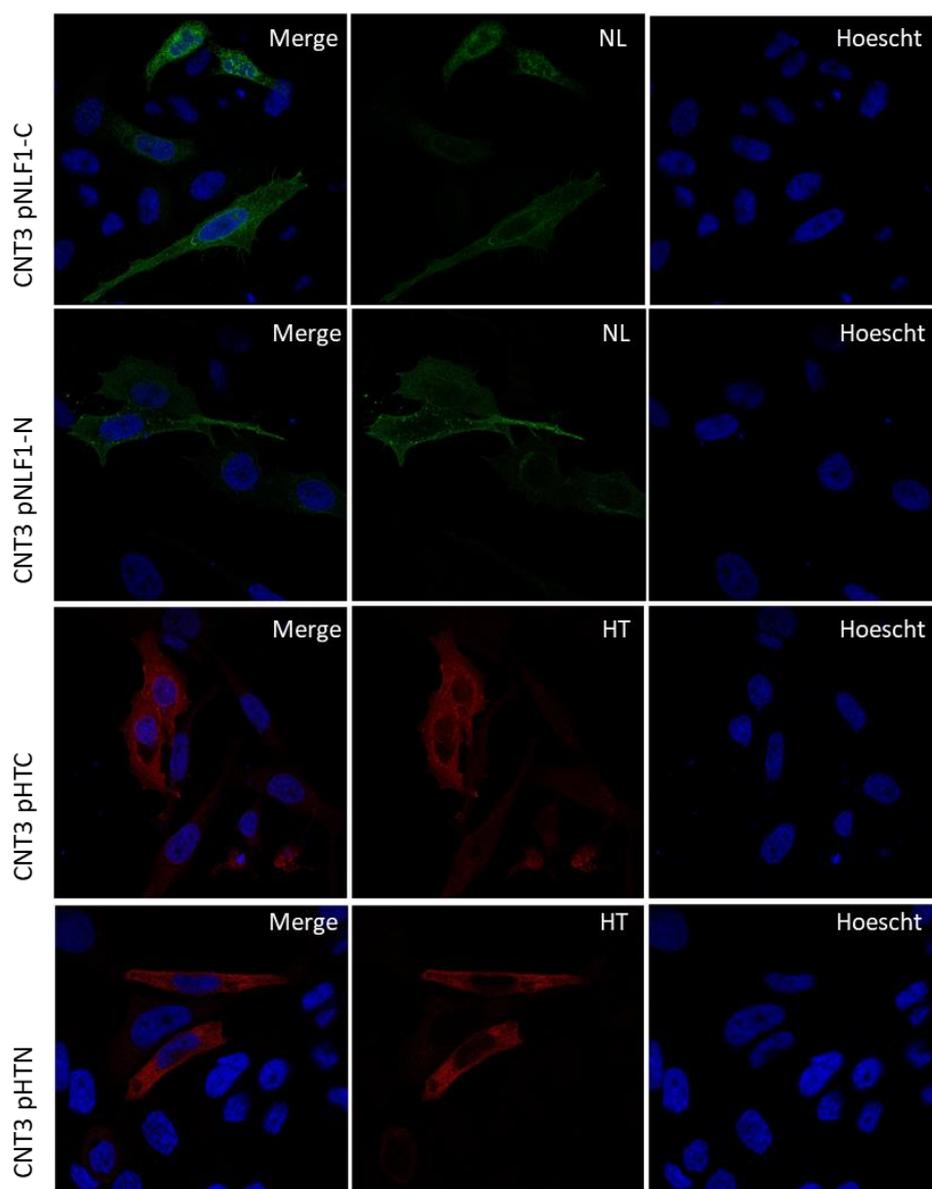


Figura 13. Ubicación subcelular de las proteínas fusión de hCNT3, sobreexpresadas en células HELA. Se utilizaron anticuerpos α -HT o α -NL y luego se marcó en color rojo (HT) o verde (NL) con α -Rb Alexa 549 o α -m Alexa 488, respectivamente. Se muestran imágenes representativas de 2-3 experimentos independientes. Imágenes tomadas a 40x.

Una vez caracterizadas las proteínas de fusión, se propuso validar la interacción entre monómeros de hCNT1 y hCNT3 en vivo. Dada las características de los transportadores y la finalidad de los ensayos, no fue necesario hacer prueba cruzando diferentes pares para optimizar el NanoBRET. Como se explicó en la introducción, los extremos amino y carboxilo terminal de los transportadores concentrativos se ubican en lados contrarios de la membrana plasmática. Considerando esta característica, para los estudios de interacción se trabajó con dos tipos de pares que aseguraran la transferencia de energía del BRET: uno combinando las proteínas fusión NL y HT en los N-terminal y el otro combinando las proteínas fusión NL y HT en los C-terminal. Para establecer un punto de comparación se incluyó el par control positivo del sistema NanoBRET. Este par optimizado está formado por las proteínas de fusión p53-HT y MDM2-NL, cuya interacción está bien descrita y caracterizada.

Se ensayaron en paralelo los pares con los tags en N- y en C- terminal para determinar cuál de las dos combinaciones permitía la detección de una mejor señal de luminiscencia. En casi todos los casos los mBU obtenidos por los pares hCNTs fueron superiores a los mBU del par control positivo p53:MDM2, a excepción de hCNT3:hCNT3 N-terminal (**Figura 14A-B**). Analizando las interacciones de ambos transportadores en función de la ubicación del tag, se vio claramente que, tanto los pares de hCNT3 (**Figura 14A**) como los de hCNT1 (**Figura 14B**) marcados en el extremo C-terminal tuvieron mayores mBU que aquellos pares marcados en el extremo N-terminal. Esto podría ser explicado por el hecho de que, a pesar de disponer de la estructura cristalográfica de hCNT3, se desconoce cuál es la disposición real del N-terminal. Además, de toda la proteína esta es la región donde más probabilidad existe de que haya interacción con otras proteínas, con lo que los tags podrían no estar en suficiente cercanía como para generar una buena señal de BRET. Caso contrario en el extremo C-terminal, que al ser mucho más rígido los tags tendrían una ubicación cercana y estable. En base a estos primeros resultados se decidió trabajar con las proteínas marcadas en el extremo C-terminal para no tener una subestimación de la señal. Aparte de la formación de homo-oligómeros, se evaluó también si la formación de hetero-oligómeros hCNT1:hCNT3 era posible. A pesar de ser descritos como homo-trímeros no se puede descartar la posibilidad de que monómeros de diferentes isoformas de hCNTs puedan oligomerizar. Para los transportadores equilibrativos hENT1 y hENT2 fue descrita una regulación por oligomerización de heterómeros (Grañé-Boladeras y col., 2019). Estos dos transportadores equilibrativos son capaces de formar hetero-oligómeros en la membrana plasmática de forma rápida después de la activación por fosforilación de hENT2 y, además esta oligomerización modifica su capacidad de transporte.

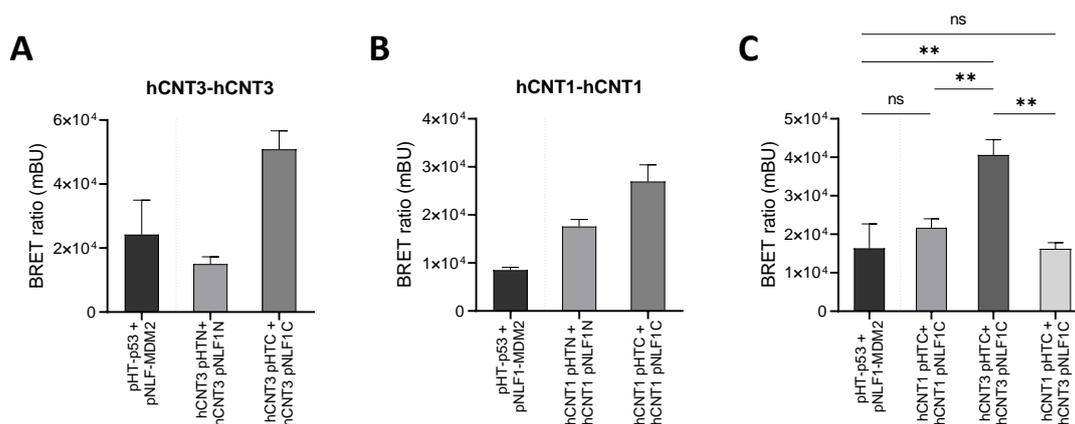


Figura 14. Formación de homo-oligómeros de hCNT3 y hCNT1. Las células HEK293 fueron transfectadas con 0,2 µg NL y 2 µg HT (ratio NL – HT 1:10) de los pares (A) de hCNT3, (B) de hCNT1 o (C) de hCNT1:hCNT3, replaqueadas y mantenidas en medio OptiMEM durante 16-18 h. La interacción está expresada en BRET ratio (mBU). Se muestra la media ± SEM de 2-6 experimentos independientes. Significancia estadística por T-Student no pareado.

Se compararon los valores de los pares hCNT1 y hCNT3 con mayor mBU (aquellos con tag en el extremo C-terminal) con el mBU obtenido al sobreexpresar en simultáneo hCNT1 pHTC y hCNT3 pNLF1C. Al comparar los valores de mBU de hCNT3:hCNT1 con los del control se pudo observar que los valores fueron similares a los obtenidos por este y por el par hCNT1:hCNT1 (**Figura 14C**), con lo que se podría interpretar que los monómeros de hCNT1 y hCNT3 pueden interactuar entre ellos en condiciones de co-transfección. Cuando se compararon las señales de los pares de hCNT1 y hCNT3 con los tags en el C-terminal, hCNT3:hCNT3 fue significativamente superior al resto de los pares estudiados (**Figura 14C**). Esto podría estar ocurriendo por dos motivos: que en el sistema celular y las condiciones establecidas estuviera siendo favorecida la interacción entre los monómeros de hCNT3 por encima de los otros dos tipos de oligómeros o simplemente que las diferencias vengan dadas por los diferentes niveles de expresión que parecen tener las proteínas. En ese caso, la diferencia de mBU que se observa estaría vinculada directamente a la cantidad de proteína. La importancia fisiológica de una observación de este tipo tendría que ser más estudiada ya que esta hetero-oligomerización podría ser un artefacto producto de la sobreexpresión. En órganos como el riñón, donde hay expresión de hCNT1 y hCNT3 en los túbulos proximales y en los glomérulos (Rodríguez-Mulero y col., 2005) una observación como esta podría ser de gran interés, sobre todo considerando que estructuras hetero-oligoméricas podrían tener nuevas características de transporte o de distribución en membrana. Los transportadores de alta afinidad de glutamato en neuronas y células gliales de mamíferos, los EAATs (*Excitatory amino acid transporters*), pueden ensamblarse en

trímeros y se ha descrito que las isoformas EAAT3 y EAAT4 pueden hetero-oligomerizar sin que se vea afectada su afinidad por el sustrato, pero si su ubicación en células polarizadas (MDCK) (Nothmann y col., 2011). Sin embargo, estas interacciones en modelo fisiológicos aún están por demostrarse.

En función de los mBU obtenidos en los ensayos de interacción anteriormente explicados, se decidió continuar con los estudios únicamente con las proteínas de fusión con el tag ubicado en el extremo C-terminal. Para verificar la correcta ubicación en la membrana plasmática de hCNT1-pHTC, se aprovechó la disponibilidad de un ligando no permeable para HT marcado con un Alexa 488, que permitió marcar los transportadores en color verde. El marcaje permitió confirmar la presencia de hCNT1 pHTC en la membrana plasmática (**Figura 15**), así como también la presencia de hCNT3 corroborando las observaciones anteriores después del marcaje con anticuerpos específicos para los tags NL y HT (**Figura 13**).

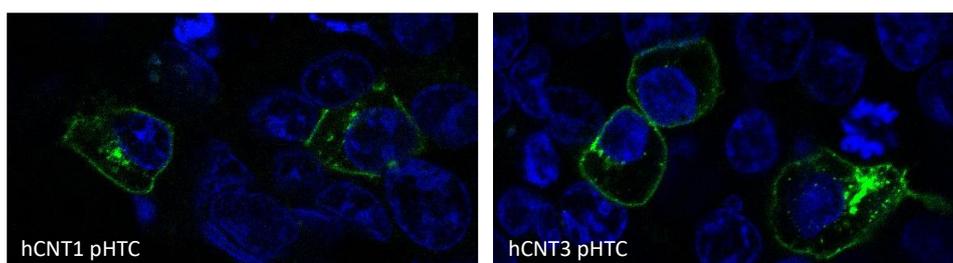


Figura 15.- Localización en membrana plasmática de las proteínas hCNT1 y hCNT3 pHTC en células HEK293. Para el marcaje del HT se utilizó un ligando de HaloTag marcado con Alexa 488 (n=1). Imágenes tomadas a 63x.

Habiendo establecido que el NanoBRET permite la visualización de la interacción entre monómeros de hCNTs en células vivas, surgió la pregunta de si la estabilidad de estas interacciones entre monómeros podría ser modificada por la disponibilidad de los mismos elementos que translocan estos transportadores. La célula puede obtener nucleósidos a través de dos procesos: las reacciones de recuperación donde participan activamente los transportadores hENTs y hCNTs, translocando nucleósidos o nucleobases del medio extracelular al citoplasma, y las vías de síntesis *de novo* de purinas y de pirimidinas. Como estrategia para el estudio de la importancia de los niveles extracelulares se pueden utilizar dos tipos de medios: un medio rico en nucleósidos y otro sin nucleósidos. En este último, no habría purinas ni pirimidinas disponibles en el medio de cultivo para ser rescatadas a través de los transportadores y este desbalance promovería un aumento en el flujo de las vías de síntesis *de novo*. Debido al alto coste energético, en condiciones basales la síntesis *de novo* de nucleósidos estaría menos

activa y se priorizarían las vías de salvamento. Para conseguir estas condiciones, los medios de cultivo fueron suplementados con FBSi o FBSi dializado (dFBSi). La diálisis se hizo contra una membrana con exclusión de menos de 3,5 kDa, y de esta forma se eliminó cualquier metabolito que estuviera por debajo de ese tamaño, lo que incluye nucleósidos y nucleobases, pero también otros elementos como aminoácidos. El mBU obtenido en medio suplementado con FBSi fue considerado en todos los casos como el nivel basal de interacción y a partir del cual se analizarían los cambios.

Teniendo en consideración lo antes mencionado, se planteó el estudio de la importancia de la disponibilidad de nucleósidos extracelulares en la formación y estabilidad de la estructura cuaternaria de hCNT1 y hCNT3, se analizó la interacción de los pares hCNT1:hCNT1, hCNT3:hCNT3 y hCNT1:hCNT3 en medio suplementado con FBSi o dFBSi. Al retirar los nucleósidos del medio extracelular el mBU de ninguna de las interacciones estudiadas se vio alterado (**Figura 16A**), por lo que se intuye que las estructuras oligoméricas se mantienen estables en condiciones de cultivo con carencia de nucleósidos en el medio. Pensando en que quizás estas interacciones fueran dependientes de la presencia de un nucleósido en particular, se planteó suplementar el medio con citidina, una pirimidina cuya especificidad de transporte es compartida por ambos transportadores. Además, las K_m para este nucleósido son parecidas en ambos transportadores y son las más bajas entre las pirimidinas que transportan cada uno (Cyt: hCNT1 = 3,1 μ M y hCNT3 = 3,5 μ M) (Pastor-Anglada y Perez-Torras 2018). Para una primera prueba se eligió una concentración de 5 μ M, una concentración cercana a la K_m de citidina de ambos. Esta nueva aproximación experimental tampoco tuvo efecto sobre la estabilidad de la interacción de hCNT1 ni de hCNT3 (**Figura 16B**), por lo que se decidió incrementar las concentraciones hasta hacerlas saturantes, tratando de forzar lo más posible cualquier cambio. Además, en paralelo se incluyó el nucleósido uridina, otra pirimidina que puede ser transportada por ambos transportadores, teniendo una K_m cerca a la de la citidina para hCNT3, pero mucho más alta para hCNT1 (Urd: hCNT1= 38 μ M y hCNT3 = 5,3 μ M). Al elegir concentraciones de 1 mM en principio ambos transportadores podrían translocar los dos tipos de nucleósidos. En general, la presencia de citidina o uridina en el medio extracelular a concentraciones saturantes generó variaciones muy sutiles y no significativas sobre todo en la interacción entre monómeros de hCNT3 (**Figura 16C**). En cuanto a la interacción entre monómeros de distintas isoformas (hCNT1:hCNT3), es difícil sacar cualquier conclusión, ya que se trata de una única réplica.

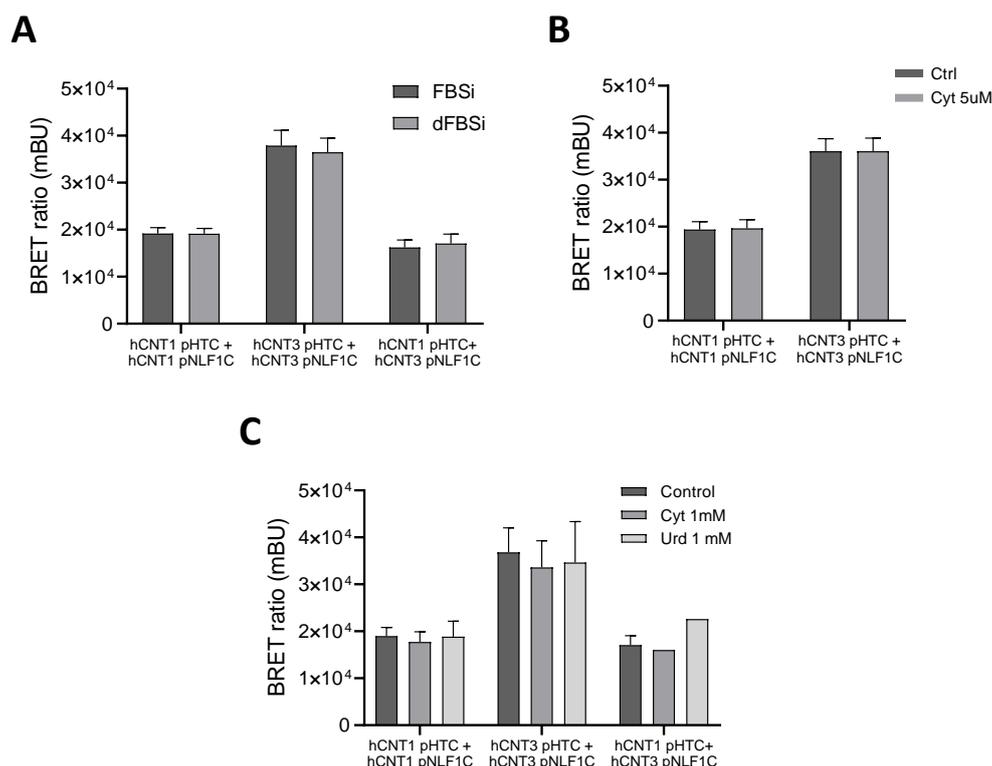


Figura 16.- Impacto de la disponibilidad de nucleósidos extracelulares en la oligomerización de hCNT1 y hCNT3. Las células HEK293 fueron transfectadas con 0,2 µg NL y 2 µg HT (ratio NL – HT 1:10) y mantenidas en medio OptiMEM. Los diferentes tratamientos con (B) citidina (Cyt) 5 µM o (C) citidina (Cyt) o uridina (Urd) 1 mM se realizaron 20 h post transfección, y durante 16-18 h. La interacción está expresada en BRET ratio (mBU). Se muestra la media ± SEM de 2– 4 experimentos independientes a excepción de Cyt y Urd 1mM hCNT1:hCNT3 (C) (n=1). Significancia estadística por T-Student no pareado.

Con estos resultados, correspondientes a un primer análisis preliminar, se puede decir que la disponibilidad extracelular de nucleósidos no parece condicionar la formación de homo- ni hetero-oligómeros de ninguno de los transportadores estudiados. Esto podría indicar una interacción muy estable una vez en la membrana plasmática y que la formación de la estructura trimérica de estos transportadores se establece desde el retículo endoplasmático. Al ser proteínas de membrana, la traducción de los hCNTs se da en ribosomas asociados al retículo endoplasmático donde su incorporación a la bicapa lipídica se hace en paralelo al crecimiento de la cadena polipeptídica. Además de su síntesis e inserción a membrana, en el retículo endoplasmático se daría el ensamblaje final de los transportadores y en principio, este mismo estado de oligomerización podría funcionar como una “señal” de exportación desde el retículo endoplasmático, sin necesidad de la interacción proteína-proteína con los componentes de COPII (Springer y col., 2014).

Aunque los resultados obtenidos y lo que se sabe de otros transportadores apuntan a que la formación de los trímeros no parece estar regulada, otro punto importante a tener

en consideración para continuar con el estudio de interacción entre monómeros de hCNT1 y hCNT3 involucra el medio de cultivo utilizado para estos ensayos. El sistema NanoBRET esta optimizado en medio de cultivo OptiMEM, el cual está enriquecido, entre otros elementos, con timidina, una pirimidina que puede ser transportada por hCNT1 y hCNT3. Al ser una formulación protegida, la concentración de timidina y del resto de elementos que contiene es desconocida, pero sin duda su presencia haría que, a pesar de suplementar con suero dializado, no se esté trabajando con un medio realmente libre de nucleósidos. Como opción está trabajar con un medio de cultivo más sencillo en composición y del que se conoce toda su formulación, como lo es el DMEM, que puede ser adquirido sin rojo fenol para evitar una interferencia en la lectura. Trabajar con DMEM supondría una forma de controlar todos los elementos que pudieran estar afectando los resultados.

Estas primeras aproximaciones en el estudio de formación de oligómeros servirán de base para plantear futuras estrategias experimentales que permitan controlar en su totalidad las cantidades de nucleósidos en el medio. También servirán para complementar posteriores estudios de localización en membrana plasmática.

2. Regulación transcripcional entre elementos del metabolismo de nucleósidos y los transportadores hCNT1 y hCNT3.

Otra hipótesis con relación a la posible regulación de la función de los transportadores de pirimidinas hCNT1 y hCNT3 es si la disponibilidad de las mismas moléculas que ellos transportan podría estar regulándolos transcripcionalmente. Además, para tener un panorama general del efecto de la disponibilidad de nucleósidos sobre la compensación que pueda existir entre los transportadores implicados en las vías de salvamento, se incluyó el análisis de la expresión de hCNT2, el transportador de alta afinidad de las purinas, y de los transportadores equilibrativos hENT1 y hENT2, que transportan tanto pirimidinas como purinas.

En este caso se realizaron dos aproximaciones. Para estudiar el impacto de la ausencia de nucleósidos extracelulares se llevó a cabo una metodología similar a la explicada previamente, manteniendo las células en medio DMEM libre de nucleósidos. Además de esto, se incluyó la inhibición del transportador hENT1 para evitar el intercambio de nucleósidos a través de la membrana plasmática (**Figura 17A**). Por otro lado, para el estudio del impacto de los niveles internos relativos de purinas y pirimidinas se decidió bloquear sus vías de síntesis *de novo*, ya fuera por el uso de inhibidores específicos o

por silenciamiento de alguna de las proteínas que participan en estas vías (**Figuras 17B**). La vía de síntesis de las pirimidinas fue bloqueada en un único punto, a la altura de la enzima DHODH, la cual fue silenciada y también inhibida con BQR. Por otro lado, la vía de síntesis *de novo* de las purinas fue bloqueada en dos puntos diferentes, primero por silenciamiento de la enzima PAICS y luego por la inhibición de la dimerización de la enzima ATIC.

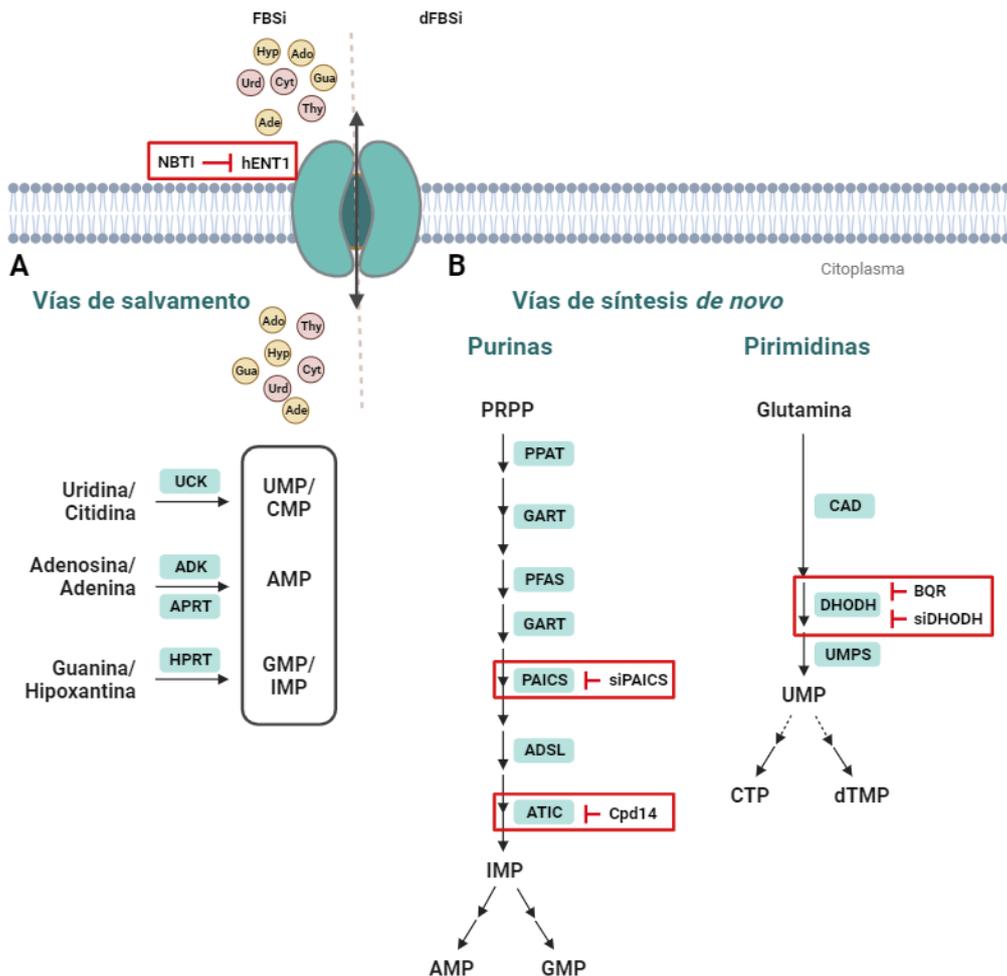


Figura 17. Alteración del metabolismo de nucleósidos por inhibición farmacológica o por silenciamiento génico. (A) El salvamento de nucleósidos fue bloqueado por inhibición de hENT1 con el inhibidor NBTI o por depleción de nucleósidos y nucleobases en el medio extracelular utilizando FBSi dializado. (B) Las vías de síntesis *de novo* de pirimidinas y de purinas fueron bloqueadas utilizando los inhibidores BQR o Cpd14, o por silenciamiento de DHODH o PAICS, respectivamente. Los puntos de bloqueo de las vías están indicados en color rojo.

Se inició analizando el efecto de la depleción de nucleósidos en el medio extracelular sobre la regulación de los transportadores concentrativos y equilibrativos. De forma similar a los ensayos NanoBRET, para lograr un medio carente de nucleósidos se utilizó FBSi dializado. Las células HEK293 fueron sembradas y mantenidas con medio de

cultivo DMEM suplementado con dFBSi durante 24 horas y luego se analizó la expresión de los mensajeros de hCNTs y hENTs. La línea celular HEK293 tiene buena expresión en membrana de hENT1 y, aunque también expresa el ARN mensajero de los transportadores concentrativos, la proteína no puede ser detectada por las técnicas convencionales. Otra característica de las células HEK293 es que son fácilmente transfectables y, cuando en ellas se sobreexpresan los hCNTs, estos se ubican correctamente en la membrana plasmática. Además, en el laboratorio se cuenta con líneas HEK293 con transfección estable de todos los hCNTs que también podrían ser utilizadas según el tipo de experimento. A partir de allí, en las condiciones donde se observen cambios relevantes, se podrá estudiar la necesidad de utilizar otro modelo celular.

De todos los transportadores analizados, el más sensible a la ausencia de nucleósidos en el medio fue hCNT1 (**Figura 18**) ya que se observó una regulación positiva de su mensajero que, aunque no fue significativa, fue constante en todas las réplicas. La expresión del resto de los transportadores concentrativos y equilibrativos no presentó cambios con respecto al control, aunque la variabilidad observada en hCNT2 y hCNT3 pareció ser superior a la observada en los hENTs, observándose una disminución de la expresión en algunos ensayos.

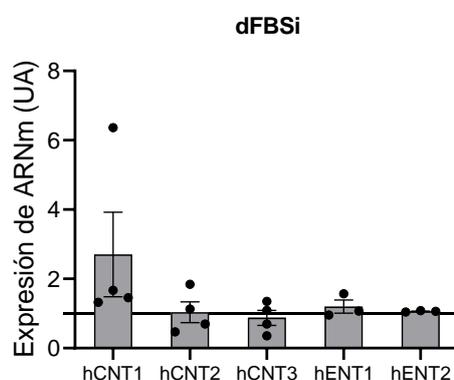


Figura 18. Efecto de la disponibilidad extracelular de nucleósidos sobre la regulación transcripcional de hCNTs y hENTs. Las células HEK293 fueron mantenidas en medio libre de nucleósidos durante 24 h. La expresión de hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 y hENT2 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. Significancia estadística por ANOVA de una vía al control (representado con una línea). Experimento realizado por la Dra. Aida Mata-Ventosa.

Una segunda manera de evaluar la importancia de los niveles de nucleósidos externos sobre la regulación de los transportadores fue inhibiendo al transportador hENT1 con nitrobenziltioinosina (NBTI) 10 μ M, un transportador que puede translocar bidireccionalmente nucleósidos a través de la membrana. La actividad basal de hENT2

en células HEK293 es muy baja con respecto a la actividad de hENT1 (Grañé-Boladeras y col., 2016), por lo que la recaptación a través de este transportador sería despreciable en este modelo celular. Además, a pesar de que NBTI es un inhibidor de alta afinidad de hENT1 (IC₅₀ en el rango nM) la concentración utilizada de 10 μ M supera la K_i para inhibir hENT2 (K_i: 2,8 μ M), asegurando así que el transporte a través de la membrana mediado por hENTs esté bloqueado.

Las células HEK293 fueron tratadas con NBTI 10 μ M durante 6 horas y luego se analizó la expresión de los mensajeros de hCNTs y hENTs. Aunque son resultados preliminares, se observó una clara tendencia de hCNT1 a ser regulado positivamente (**Figura 19**), mientras que el resto de los mensajeros evaluados, incluidos hENT1 y hENT2, no fueron regulados. Aunque la expresión de hCNT1 inducida por NBTI fue muy superior, este resultado fue similar al observado con dFBSi, y se podría decir que hCNT1 es el transportador más sensible a la disponibilidad de nucleósidos en el medio, siendo su regulación mayor cuando las vías de salvamento están bloqueadas, más que cuando no hay nucleósidos extracelulares.

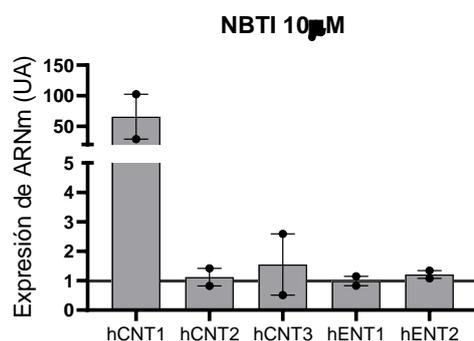


Figura 19. Efecto de la inhibición de la recaptación de nucleósidos por hENT1 sobre la regulación transcripcional de hCNTs y hENTs. Las células HEK293 fueron tratadas con NBTI 100 μ M durante las 6 h previas a su análisis. La expresión de hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 y hENT2 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

La inducción de hCNT1 al tratar las células con NBTI muestra la importancia, no solo de la disponibilidad de nucleósidos en el medio, sino de la capacidad que tiene el sistema de regular el desbalance de estas moléculas. La característica de transporte bidireccional de los hENTs, moviendo nucleósidos a favor de un gradiente de concentración, permite el mantenimiento de esta homeostasis. A pesar de que los hENTs están vinculados al salvamento de purinas y pirimidinas, se podría pensar que su bloqueo implica que no haya intercambio en ambos sentidos entre el citoplasma y el medio extracelular, y es justamente la interrupción de este intercambio lo que parecería

estar favoreciendo aún más la expresión de hCNT1, sin alterar los otros transportadores. Sin embargo, las Km descritas para los diferentes sustratos de los hENTs son bastante altas por lo que en modelos más fisiológicos *in vivo* se tendría que estudiar si tiene sentido este tipo de regulación. Después de evaluar la importancia de los niveles extracelulares de nucleósidos y del intercambio de nucleósidos entre el medio extra e intracelular a través de hENT1 sobre la expresión de los hCNTs y hENTs, se pasó al estudio del bloqueo del metabolismo de purinas y pirimidinas, y su impacto sobre la regulación de los transportadores de nucleósidos. Para esto se utilizaron dos estrategias: la inhibición enzimática y el silenciamiento. Para inhibir la síntesis *de novo* de las pirimidinas, se utilizó Brequinar (BQR) 10µM, un inhibidor reversible de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) y, para inhibir la síntesis *de novo* de las purinas se utilizó Cpd14 100µM, un inhibidor de la dimerización de ATIC. La DHODH está ubicada en la membrana mitocondrial interna y cataliza la cuarta reacción de la vía de síntesis *de novo* de las pirimidinas. Por su parte, ATIC es una enzima multifuncional que cataliza las dos últimas reacciones de la vía de síntesis de las purinas y existe en el citoplasma en un equilibrio monómero-dímero.

Las concentraciones de los inhibidores fueron elegidas para ser saturantes ya que todas ellas pueden inhibir en el rango del nM. BQR tiene un IC50 de 20 nM, mientras que Cpd14 tiene una Ki de 691 nM. Los tiempos cortos de tratamiento, junto a las altas dosis fueron elegidos con base en la bibliografía y de resultados previos del grupo. Con estas concentraciones se tuvo la intención de causar una gran inhibición de la vía, a partir de donde se podría asumir un desbalance en los niveles relativos de nucleósidos intracelulares. Además de las inhibiciones, el silenciamiento de genes vinculados a las vías de síntesis se aprovechó para evaluar si solo el bloqueo de la actividad tenía efecto sobre la regulación de los transportadores o si esta regulación se veía más acentuada por disminución de la expresión de la proteína.

En primer lugar, se estudió el impacto de alterar la síntesis *de novo* de pirimidinas sobre la expresión de hCNTs y hENTs. Las células HEK293 fueron tratadas con BQR 10µM o transfectadas con siDHODH 50 nM. Al evaluar el efecto del BQR, no se observaron cambios significativos en la expresión de los transportadores, aunque de todos fueron los hCNTs, y particularmente hCNT1, los que tuvieron mayor grado de variabilidad en su expresión (**Figura 20A**). Cuando se bloqueó la vía de síntesis por una disminución de la DHODH, hCNT1 fue regulada positivamente de forma significativa y, por el contrario, hCNT3 tuvo una tendencia a ser regulado negativamente con respecto al control (**Figura 20B**). Al ser hCNT1 el transportador de alta afinidad exclusivo de pirimidinas, es posible que este transportador sea regulado positivamente tratando de

compensar el desbalance producido al bloquear la síntesis *de novo* de las pirimidinas. La compensación con hCNT1 sería suficiente por lo que el mensajero del transportador de alta afinidad de pirimidinas y purinas, hCNT3, no estaría alterado.

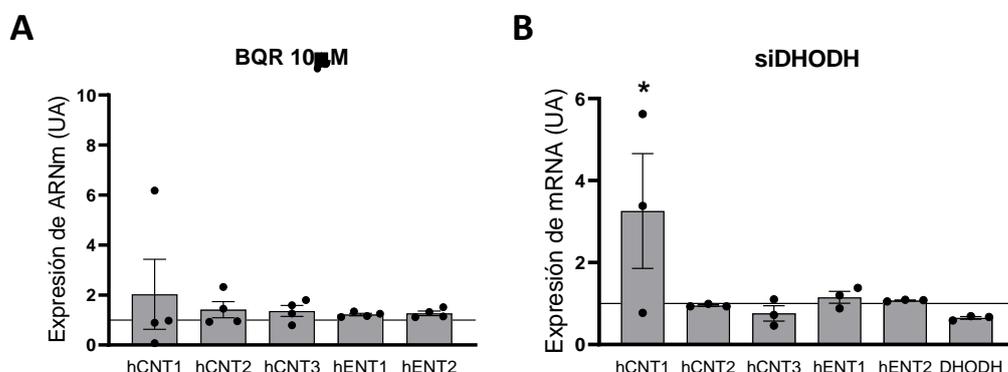


Figura 20. Efecto del bloqueo del metabolismo de las pirimidinas sobre la regulación transcripcional de hCNTs y hENTs. (A) Las células HEK293 fueron tratadas con BQR 10 μM durante las 6 h previas a su análisis, o (B) fueron transfectadas con siDHODH 50nM durante 48 h. La expresión de hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 y hENT2 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media ± SEM de 3-4 experimentos independientes. Significancia estadística por ANOVA de una vía al control sin tratamiento (representado con una línea).

Al inhibir ATIC con Cpd14 y bloquear el metabolismo de las purinas, se observó también una variabilidad en la regulación de los transportadores concentrativos, siendo más notoria de nuevo en hCNT1 (**Figura 21A**). Bajo estas condiciones, el resto de los transportadores no fue modulado. Este resultado fue interesante porque en estas condiciones donde se alteran los niveles de purinas no se esperaría una compensación por parte de un transportador de pirimidinas, sino más bien de uno de purinas, sea hCNT2 o hCNT3, de los cuales ninguno de los dos se vio alterado. El silenciamiento de PAICS tuvo un efecto similar sobre los transportadores al observado al silenciar la DHODH. Se observó una tendencia de regulación positiva de hCNT1 acompañada de una regulación negativa de hCNT3 (**Figura 21B**). hCNT2 y hENT2 también podría decirse que tuvieron una tendencia de regulación negativa, pero mucho menos clara que la de hCNT3.

Ya que la inhibición de la DHODH con BQR y de ATIC con Cpd14 no generó resultados conclusivos, se decidió utilizar los tratamientos en conjunto con el fin de evaluar el efecto combinado de inhibir las dos vías de síntesis y ver si de alguna forma se potenciaban los efectos de los tratamientos individuales. En general, el doble tratamiento no tuvo impacto sobre la regulación de los transportadores, aunque la variabilidad de hCNT2

pareciera indicar lo contrario (**Figura 22**). Además, los tratamientos individuales siguieron las mismas tendencias mostradas en experimentos anteriores.

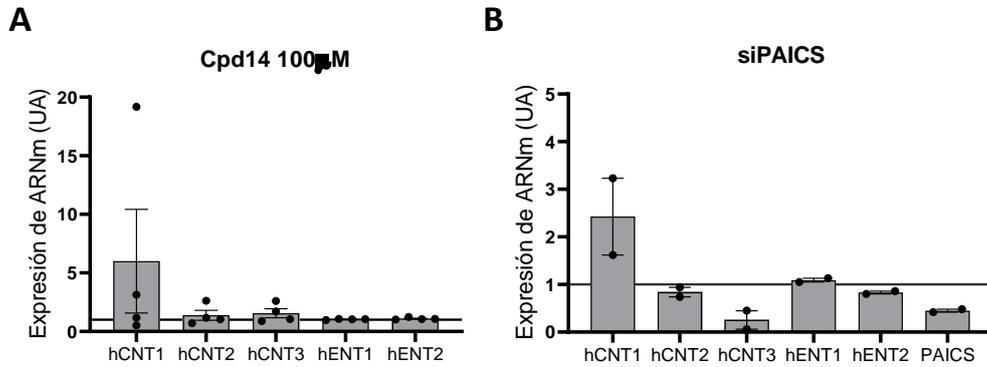


Figura 21. Efecto del bloqueo del metabolismo de las purinas sobre la regulación transcripcional de hCNTs y hENTs. (A) Las células HEK293 fueron tratadas con Cpd14 100µM durante las 6 h previas a su análisis, o (B) fueron transfectadas con siPAICS 100nM durante 48 h. La expresión de hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 y hENT2 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 2-4 experimentos independientes. Significancia estadística determinada por ANOVA de una vía al control sin tratamiento (representado con una línea).

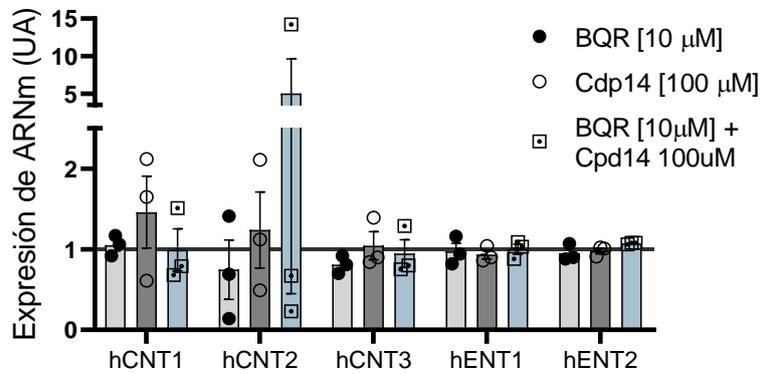


Figura 22. Efecto de la inhibición de las vías de síntesis de purinas y pirimidinas sobre la regulación de los transportadores concentrativos y equilibrativos de nucleósidos. Las células HEK293 fueron tratadas con BQR 10µM y/o Cpd14 100µM durante las 6 h previas a su análisis. La expresión de hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 y hENT2 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Significancia estadística por ANOVA de dos vías entre grupos (control-tratamientos). Control sin tratamiento representado con una línea.

La respuesta de los transportadores concentrativos es muy similar al bloquear vías de síntesis de purinas o de pirimidinas de forma independiente, con lo que se podría decir que, parece ser hCNT1 el transportador más sensible a cambios en los niveles de nucleósidos ya que fue modulado bajo todos los tratamientos analizados. Aparte de su

actividad canónica de transporte de pirimidinas, para hCNT1 han sido descritas características de transceptor: la restitución de su expresión altera la progresión del ciclo celular, la migración y el estado de fosforilación de algunas quinasas en células de cáncer de páncreas, así como también disminuye el crecimiento tumoral en modelos murinos de adenocarcinoma pancreático (Perez-Torras y col., 2013).

hCNT1 y hCNT3 son ambos transportadores de pirimidinas, con lo que podría existir una co-regulación entre ellos. Para estudiar si la sobreexpresión de hCNT1 o hCNT3 puede modular la presencia del otro subtipo, se planteó estudiar la expresión de cada uno de ellos en condiciones de sobreexpresión del otro subtipo y en presencia de un medio rico en nucleósidos. Al sobreexpresar hCNT3 se observó gran variabilidad en la expresión de hCNT1 (**Figura 23A**). En el caso contrario, al sobreexpresar hCNT1 se observó el mismo grado de variabilidad en la expresión de hCNT3 (**Figura 23B**). A partir de este resultado se puede decir que la sobreexpresión de un transportador concreto aumenta la variabilidad en el sistema, variabilidad que podría estar vinculada a cambios en los niveles de nucleósidos producto de la sobreexpresión de transportadores de alta afinidad en condiciones donde hay disponibilidad de nucleósidos extracelulares que pueden ser transportados. La regulación, en este caso, no parecería estar vinculada a una compensación de un transportador por otro.

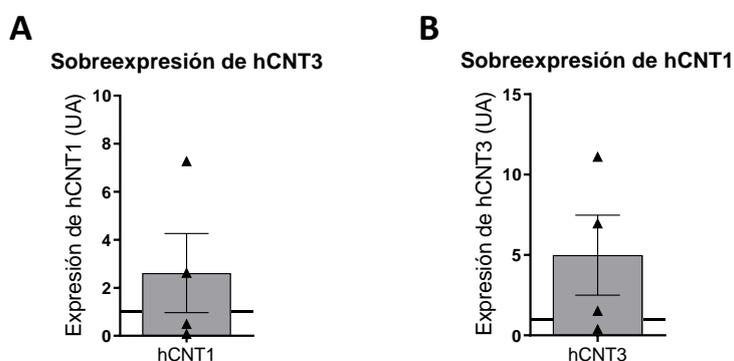


Figura 23. – Regulación transcripcional entre hCNT1 y hCNT3. Las células HEK293 fueron transfectadas con (A) hCNT3 o (B) hCNT1 durante 48 h. La expresión de ARNm de hCNT1 y hCNT3 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra a media \pm SEM de 4 experimentos independientes. Significancia estadística por T-Student no pareado al control pcDNA3.1 (representado con una línea).

A pesar de la variabilidad de la respuesta, se quiso estudiar si algún factor metabólico inducía una regulación más específica de hCNT1 o de hCNT3, y si estos factores de posible estrés metabólico podían generar cambios en la expresión que pudieran estar vinculados a una compensación metabólica. Para esto se planteó la modulación de los

niveles internos de nucleósidos utilizando las mismas estrategias explicadas anteriormente: utilizando inhibidores o silenciando enzimas de las vías biosintéticas de purinas o de pirimidinas durante un estado de sobreexpresión de otro transportador.

En primer lugar, se evaluó la regulación de hCNT1 en una condición de sobreexpresión de hCNT3. Después de sobreexpresar el transportador hCNT3 en células HEK293, las vías de síntesis *de novo* de purinas o de pirimidinas fueron bloqueadas por el tratamiento con el inhibidor de DHODH (BQR 10 μ M) o con el inhibidor de ATIC (Cpd14 100 μ M) durante 6 horas, o por el silenciamiento de las enzimas DHODH o PAICS. En general, la combinación de los tratamientos con la expresión de hCNT3 no permitió reducir la variabilidad e identificar modulaciones de la expresión de hCNT1 significativas (**Figura 24**). De todos los tratamientos realizados solo se observó una regulación negativa (con respecto al control) de hCNT1 bajo el efecto del silenciamiento de DHODH o de PAICS, sin ser en ninguno de los dos casos significativo (**Figura 24B-D**). A pesar de que el mensajero de hCNT1 tuvo una leve tendencia a aumentar como respuesta a los tratamientos con inhibidores (**Figura 24A-C**), de nuevo la variabilidad imposibilitó sacar alguna conclusión clara.

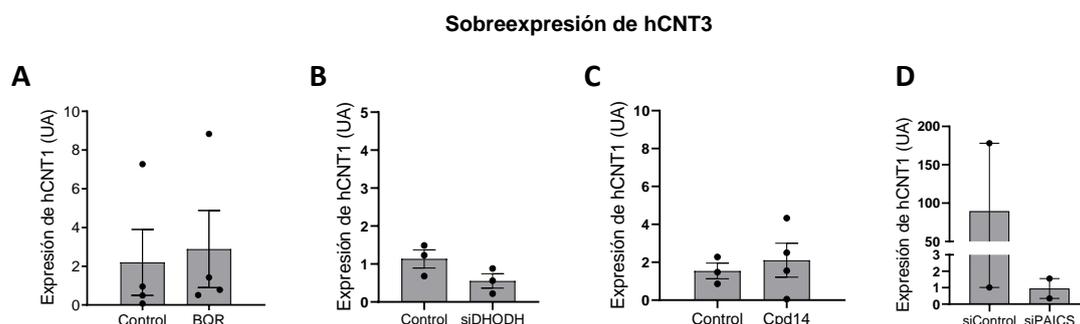


Figura 24. Implicación de los niveles internos de nucleósidos en la regulación de hCNT1 por sobreexpresión hCNT3. Las células HEK293 fueron transfectadas con hCNT3 durante 48 h y el tratamiento con (A) BQR 10 μ M o (C) Cpd14 100 μ M se realizó durante las 6 h previas a su análisis. Las células HEK293 fueron transfectadas con (B) siDHODH 50nM o (D) siPAICS 100nM durante 48 h. La expresión de ARNm de hCNT1 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. Significancia estadística determinada por T-Student para datos no pareados.

Para estudiar los factores moduladores de la expresión de hCNT3 al sobreexpresar hCNT1 se utilizó la misma estrategia experimental pero esta vez sobreexpresando hCNT1 en células HEK293 y luego analizando la expresión del mensajero de hCNT3 después de haber aplicado los diferentes tratamientos. En este caso, el efecto según la vía de síntesis afectada fue más específico, indistintamente de si se trataba de un bloqueo por una inhibición o por un silenciamiento. En condiciones donde hCNT1 está

sobreexpresado, el disminuir la síntesis de pirimidinas revirtió la regulación de hCNT3 si se compara al control sin tratamiento (**Figura 25A-B**). Esto tendría sentido si se asume que, al bloquear la síntesis *de novo* de pirimidinas y teniendo un medio extracelular rico en nucleósidos, se verían favorecidas las vías de salvamento para compensar el desbalance de nucleósidos intracelulares. Teniendo las vías de recuperación favorecidas (por presencia de nucleósidos en el medio extracelular), una sobreexpresión del transportador de alta afinidad de pirimidinas hCNT1 podría ser suficiente para translocar las pirimidinas necesarias hacia el interior de la célula, con lo que hCNT3 no tendría la necesidad de ser regulado para compensar. Por otra parte, la inhibición de la síntesis de purinas en condiciones de sobreexpresión de hCNT1 favoreció la regulación positiva de hCNT3, aunque de forma no significativa (**Figura 25C-D**). Al no ser un transportador de purinas, hCNT1 no tiene manera de compensar el desbalance de estos nucleósidos producido por una disminución de su síntesis, y puede ser por esto que haya un aumento en la expresión de hCNT3.

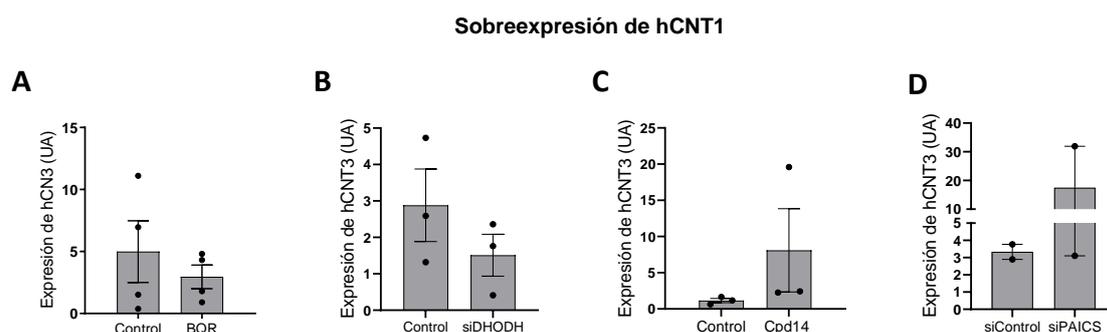


Figura 25. Implicación de los niveles internos de nucleósidos en la regulación de hCNT3 por sobreexpresión hCNT1. Las células HEK293 fueron transfectadas con hCNT1 durante 48 h y el tratamiento con (A) BQR 10 μ M o (C) Cpd14 100 μ M se realizó durante las 6 h previas a su análisis. Las células HEK293 fueron transfectadas con (B) siDHODH 50nM o (D) siPAICS 100nM durante 48 h. La expresión de ARNm de hCNT3 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. Significancia estadística determinada por T-Student para datos no pareados.

Luego, para ver si los cambios observados eran específicos de una disminución de la síntesis *de novo* de nucleósidos intracelulares, o si por el contrario respondían a la capacidad del sistema para regularse a través de hENT1, se bloqueó la vía de recuperación de nucleósidos tratando las células con el inhibidor específico de hENT1, NBTI 10 μ M, y se evaluó la expresión de los transportadores de pirimidinas hCNT1 y hCNT3. En este caso, al sobreexpresar hCNT3, la expresión de hCNT1 se vio muy disminuida al comparar con el control (**Figura 26A**), incluso llegando a estar por debajo del control sin sobreexpresión. Diferente fue el caso de hCNT3, cuyo mensajero fue

aumentado en presencia de hCNT1 y al inhibir el intercambio de nucleósidos con el medio extracelular a través de hENT1 (**Figura 26B**).

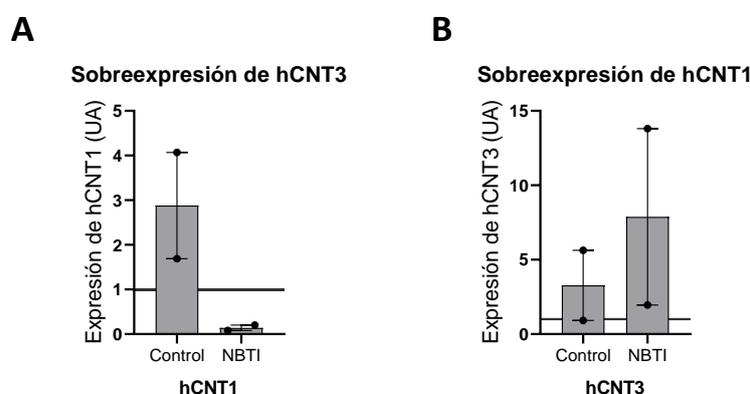


Figura 26. Efecto de la inhibición de la vía de salvamento de nucleósidos sobre la co-regulación de hCNT1 y hCNT3. Las células HEK293 fueron transfectedas con (A) hCNT3 o (B) hCNT1 durante 48 h y el tratamiento con NBTI 10 μM se realizó durante las 6 h previas a su análisis. La expresión de ARNm de hCNT1 y hCNT3 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media ± SEM de 2 experimentos independientes (transfección con pcDNA3.1 representado con una línea).

En conjunto, estos resultados sugieren que la regulación de los transportadores hCNT1 y hCNT3 responde al presumible desbalance de nucleósidos intra- y extracelulares por inhibición de las vías de síntesis *de novo* de nucleósidos o por inhibición de la captación de nucleósidos extracelulares. También parece haber un efecto compensatorio si alguno de ellos está expresado, siendo esto más claro para hCNT3. En presencia de hCNT1, la regulación de hCNT3 parece responder a desbalances de grupos de nucleósidos específicos. Es decir, si no hay síntesis de pirimidinas, pero está expresado hCNT1, se disminuye la expresión de hCNT3, pero, si es la síntesis de purinas la afectada, la expresión de hCNT3 aumenta porque hCNT1 es incapaz de compensar el sistema. Este efecto no se ve con tanta claridad al analizar la expresión de hCNT1 estando expresado hCNT3, ya que su regulación no parece responder a una compensación, sino más bien a la presencia de las enzimas de las vías de síntesis *de novo*. Sin embargo, lo que sí fue llamativo es que bajo la misma condición de sobreexpresión de hCNT3, el bloqueo de la translocación de nucleósidos a través de hENT1 revertió por completo la expresión de hCNT1.

En este bloque de resultados se analizó la regulación de los transportadores de pirimidinas de alta afinidad hCNT1 y hCNT3, tanto a nivel estructural como a nivel transcripcional. Los estudios de interacción entre monómeros de estos transportadores parecieron indicar que los oligómeros de hCNT1 y hCNT3 son muy estables en la

membrana y no parecen estar afectados por la presencia de nucleósidos en el medio de cultivo. Además, se sugirió la idea de que los monómeros de hCNT1 y hCNT3 puede oligomerizar entre ellos. Los resultados obtenidos parecen indicar una co-regulación transcripcional entre hCNT1 y hCNT3 que, en presencia de estrés metabólico producto del desbalance en los niveles de nucleósidos, lleva a una compensación entre los transportadores. Además, la regulación de hCNT1 parece ser más sensible a los niveles de nucleósidos en el ambiente, no solo de pirimidinas, sino también de purinas.

Bloque II: Papel de QDPR en la regulación de hCNT3.

La enzima dihidropteridina reductasa (QDPR/DHPR) participa del reciclaje del cofactor no proteico tetrahidrobiopterina (BH₄). QDPR es una enzima homo-dimérica que cataliza la reducción de la dihidrobiopterina quinoide (qBH₂) para la restitución de la biopterina activa BH₄ (Kaufman 1964), y a partir de la oxidación de NADH (Firgaira y col., 1981). La BH₄ es un cofactor importante para la hidroxilación de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano, necesarios para la síntesis de catecolaminas. BH₄ también es cofactor de la sintasa de ácido nítrico. La QDPR está ampliamente distribuida en los diferentes tejidos de mamíferos, aunque principalmente en tejidos con altos niveles de de BH₄ como lo son el tejido adrenal y el nervioso, el hígado y el riñón. La disponibilidad de BH₄ depende principalmente de su síntesis, su uso enzimático y su regeneración. Sin embargo, al suministrar BH₄ radiomarcado a ratones, el estudio su la distribución mostró una gran acumulación en hígado y riñón (Hoshiga y col., 1993) sugiriendo que en estos órganos, a pesar de tener una alta tasa de síntesis de BH₄, sus reservas de biopterinas también podrían alimentarse de la captación de BH₄ exógeno. La mayor cantidad de síntesis en estos tejidos se vincula a la presencia en ellos de las enzimas que utilizan la BH₄ como cofactor. La fenilalanina hidroxilasa se encuentra en el hígado y el riñón donde puede degradar la fenilalanina ingerida en la dieta y convertirla en tirosina (McGee 1972) mientras que la tirosina hidroxilasa se ubica en el cerebro y medula adrenal para la síntesis de catecolaminas (Nagatsu y col., 1964).

Como se comentó anteriormente, la deficiencia de QDPR se caracteriza por una depleción de monoaminas generada por un mal funcionamiento de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos producto de la deficiencia o ausencia de su cofactor BH₄. De no ser diagnosticada y tratada rápidamente después del nacimiento, quienes la padecen desarrollan serios problemas neurológicos (Thöny y Blau 2006; Ichinose y col., 2008). Además de su papel central en el reciclaje de la BH₄, QDPR también ha sido vinculada al metabolismo del folato. La deficiencia de QDPR altera los niveles de folatos en líquido cerebroespinal humano (Ponzzone y col., 2004) y también se han visto alteraciones de esta vía metabólica en modelos murinos QDPR^(-/-) (Xu y col., 2014). En la actualidad, el esquema de tratamiento de estos pacientes incluye la administración de una forma reducida del ácido fólico, el ácido folínico, para contrarrestar este desbalance (Opladen y col., 2020).

Diferentes estudios postulaban que QDPR podría prevenir la oxidación del THF en el cerebro (Pollock y Kaufman 1978; Leeming y Hall 2010). Estas observaciones fueron

confirmadas al estudiar el vínculo entre el metabolismo de folatos mitocondrial y el citoplasmático. El metabolismo de los folatos se encuentra compartimentado en el citoplasma y en la mitocondria, donde las reacciones centrales de cada vía son iguales entre ellas. A pesar de estar separadas, existe una comunicación entre las vías dada por el intercambio unidireccional de formato, desde la mitocondria al citoplasma. El formato es el producto del metabolismo de los folatos en mitocondria y se produce a partir del THF, quien tiene que ser activamente transportada desde el citoplasma. Ya en el citoplasma, el formato puede ser metabolizado para servir de fuente de un carbono para las rutas metabólicas de síntesis de nucleótidos y de donadores de grupos metilo (Tibbetts y Appling 2010). Cuando la vía mitocondrial se encuentra alterada, y hay una disminución de la producción de formato, en el citoplasma se da una acumulación de THF que deriva en su degradación por daño oxidativo. Esta degradación genera qDHF, una molécula inestable que es rápidamente convertida en 7,8-dihidropterina, formaldehído y p-aminobenzoilglutamato (Burgos-Barragan y col., 2017; Reed y Archer 1980). Aparte de su función recuperando a BH₄ a partir de qBH₂, QDPR es capaz de reducir el intermediario qDHF de nuevo a THF después de un daño oxidativo (Zheng y col., 2018) (**Figura 27**). Existe otra vía de reparación enzimática vinculada al metabolismo de los folatos en células de mamíferos y esta involucra a las enzimas DHFR yATIC, ya que ambas pueden recuperar al producto de oxidación 10-formil-DHF. DHFR puede mediar su reducción a 10-formil-THF, o a THF, en una reacción secuencial que involucra aATIC, una enzima de la vía de biosíntesis de las purinas (Baggott y Johanning 1999).

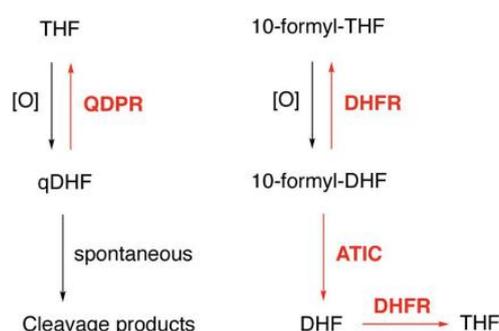


Figura 27.- Vías que permiten reparar el THF después de la degradación por oxidación. QDPR puede reparar el daño oxidativo [O] de THF, rescatándola a partir del intermediario qDHF. Además, a partir del 10-formil-THF, la DHFR puede reducirla a 10-formil-THF o a THF. Modificado de Zheng y Cantley 2019.

A partir de una colaboración con el Dr. Igor Stagljar, de la Universidad de Toronto (Canadá), en el grupo se identificó la QDPR como una proteína de interacción con el

transportador concentrativo hCNT3 mediante la técnica de *Membrane Yeast Two Hybrid* (MYTH). Esta aproximación permite identificar en un sistema eucariota proteínas de interacción asociadas a proteínas de membrana, utilizando como cebo la proteína de interés completa (Snider y col., 2010). Se aprovecha que la ubiquitina puede ser dividida en dos dominios (N- y C-terminal), y uno de estos dominios es fusionado con la proteína de interés. Por su parte, las posibles proteínas de interacción son fusionadas con el segundo dominio de la ubiquitina. De esta forma, al interactuar la proteína de interés con las posibles proteínas de interacción completarían una pseudoubiquitina. Al dominio unido a la región cebo de la proteína de interés se le incorpora una mutación puntual con la finalidad de debilitar la unión entre los dominios de la ubiquitina, lo que asegura que, si llega a darse la interacción, esta sea específica. Además, el dominio de ubiquitina unido a la proteína cebo tiene también unido un factor de transcripción. Cuando se da la interacción y se forma la pseudoubiquitina, esta es reconocida por las enzimas de desubiquitinización citosólicas que al cortar liberan el factor de transcripción. Este factor de transcripción puede activar un sistema reportero en el núcleo. En el caso de hCNT3, para el estudio de interacción las posibles proteínas de interacción provinieron de librerías de riñón y de sistema nervioso central. Además, el dominio de ubiquitina fue incorporado en el extremo N-terminal del transportador, ya que es la región que encara al citoplasma. QDPR fue identificada a partir del estudio de la librería del sistema nervioso central.

Según sus interacciones, una proteína puede tener más de un papel biológico. Por su participación en el mantenimiento de la integridad del THF, la identificación de QDPR como proteína de interacción con hCNT3 abrió la posibilidad de que el transportador estuviese vinculado funcionalmente a enzimas de otras rutas metabólicas. Concretamente con esta interacción, hCNT3 podría vincularse a la vía metabólica de los folatos o alguna que se alimente de ellas, como el metabolismo de los nucleótidos. Por el estrecho vínculo entre el metabolismo de los folatos y la síntesis *de novo* de las purinas y pirimidinas, la interacción de hCNT3 con proteínas dentro de esa red enzimática podría permitir identificar para él funciones diferentes a las clásicamente descritas como transportador y más bien vinculadas a la regulación de los niveles intracelulares de nucleósidos ejerciendo un papel de detector e incluso modulador. Considerando esto, en este bloque de resultados se estudia el papel fisiológico de la interacción entre las proteínas hCNT3 y QDPR, abordando tanto su interacción física como su regulación transcripcional.

Una primera aproximación sobre este tema se hizo en el marco de la tesis de la Dra. Catalina Perelló. En ella, la interacción bioquímica entre hCNT3 y QDPR fue validada

mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en diferentes modelos celulares (**Figura 28A**), y además se generaron datos que parecían indicar la existencia de una regulación transcripcional de hCNT3 por QDPR. Estos experimentos preliminares sobreexpresando QDPR fueron hechos en medio con y sin nucleósidos, en paralelo y, a pesar de la variabilidad observada al utilizar dFBSi, no hubo diferencias en los resultados obtenidos en los medios con diferente suplementación. Además, debido a la variabilidad mencionada, se tomó la decisión de continuar los ensayos en medio suplementado con FBSi sin dializar. Tomando todos estos datos en consideración, se plantearon los ensayos para profundizar en la relación entre hCNT3 y QDPR, más allá de la interacción física.

El proyecto se inició estudiando la regulación transcripcional entre QDPR y hCNT3. QDPR fue transfectado en células HEK293 y se analizó el efecto de su sobreexpresión sobre la transcripción de todos los transportadores concentrativos y equilibrativos de nucleósidos. Se analizaron los ARN mensajeros de todos los transportadores con la finalidad de determinar si el efecto de la sobreexpresión de QDPR era sobre la regulación de un grupo de transportadores o si por el contrario el efecto era sobre uno en concreto. El análisis de la expresión de ARNm evidenció una regulación positiva de hCNT3 al sobreexpresar QDPR en células en cultivo (**Figura 28B**), confirmando los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio que vinculaban a estas dos proteínas a nivel transcripcional. De la misma manera, pero sin ser significativo, el transportador hCNT1 tuvo una tendencia a ser regulado negativamente por QDPR. Esto llamó la atención siendo hCNT1 un transportador específico de pirimidinas mientras que hCNT3 puede translocar ambos tipos de nucleósidos. Por su parte el transportador de purinas hCNT2 no se vio afectado, al igual que los dos transportadores equilibrativos hENT1 y hENT2.

Que la sobreexpresión de QDPR generara una regulación inversa de los transportadores de pirimidinas, hCNT1 y hCNT3, permitió hipotetizar que las pirimidinas participan de alguna manera en la modulación de la interacción hCNT3:QDPR. Por esto, con el fin de saber si la regulación de QDPR sobre hCNT1 y hCNT3 también podía ocurrir en el sentido contrario, es decir, si un hipotético aumento de pirimidinas por aumento de los transportadores pudiera regular la expresión de QDPR, analizamos entonces el efecto de la sobreexpresión de ambos transportadores sobre la expresión de la enzima (**Figura 28C-D**). En este caso, la magnitud del cambio de expresión de QDPR inducida por hCNT3 fue pequeña. Es por esto que, aun siendo significativa, podría ser considerada como irrelevante (**Figura 28C**). Parecido fue el caso de la expresión de QDPR inducida por hCNT1, donde no se vieron cambios en su expresión

(Figura 28D). Es por esto que, considerando ambos resultados, se puede decir que los cambios en la expresión de la enzima no parecen estar vinculados a cambios fisiológicos vinculados a una mayor cantidad de transportadores concentrativos de pirimidinas.

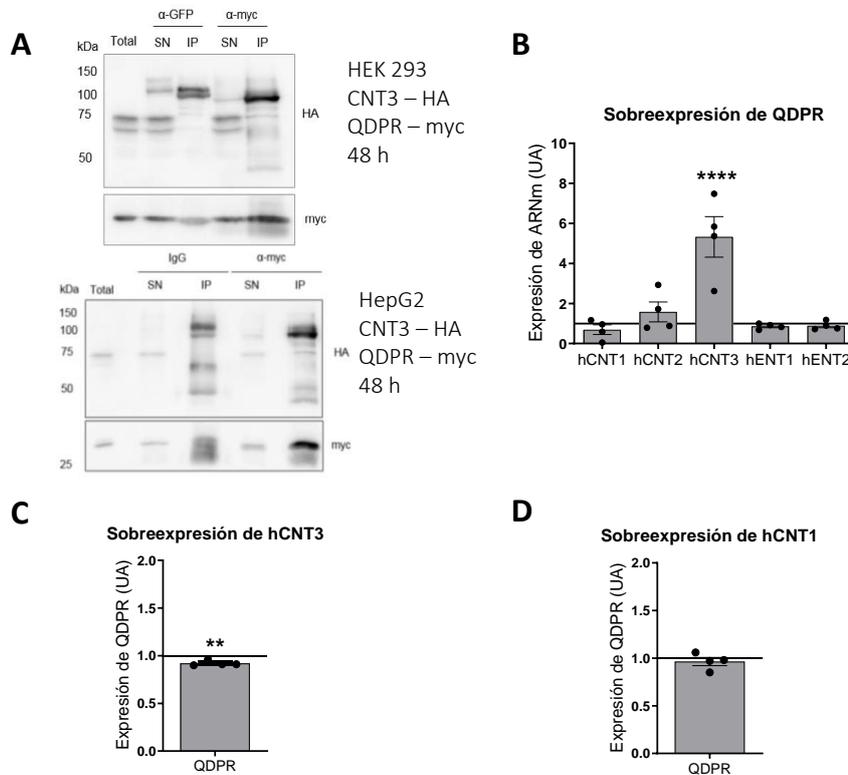


Figura 28. Regulación de los transportadores de nucleósidos por QDPR. (A) Validación de la interacción de QDPR y hCNT3 por co-inmunoprecipitación (Análisis realizado durante la tesis de la Dra. Catalina Perelló). (B-D) Las células HEK293 fueron transfectadas con (B) QDPR, (C) hCNT3 o (D) hCNT1. La expresión de ARNm de hCNTs, hENTs y QDPR se analizó por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. Los resultados son referenciados al control pcDNA3.1 (representado con una línea) y están expresados en unidades arbitrarias (UA). Significancia estadística por ANOVA de una vía (**** $p < 0,001$) o T-Student no pareado a control pcDNA3.1 (** $p < 0,01$).

1. Estudio de la regulación entre hCNT3 y QDPR

Como se comentó anteriormente, los resultados de la Dra. Perelló no mostraron diferencias en la expresión de los hCNTs si la sobreexpresión de QDPR se realizaba en medio de cultivo suplementado con FBSi o dFBSi, dejando a un lado la idea de que la regulación dependía de los niveles externos y por tanto del salvamento de nucleósidos. Aunque QDPR no fue regulada al sobreexpresar hCNT3 ni hCNT1, la regulación de estos por QDPR sugirió que quizás los niveles internos de nucleósidos, y principalmente de pirimidinas, tuvieran una participación en su regulación.

Para profundizar más en este tema, se planteó bloquear las vías de síntesis *de novo* tanto de pirimidinas como de purinas, así como también la vía de recaptación de nucleósidos a través de hENTs, todo con la finalidad de generar estrés metabólico y ver el efecto de estas inhibiciones farmacológicas sobre la expresión de QDPR, pero también sobre los transportadores concentrativos que ella regula. Para ello, se trabajó con diferentes inhibidores específicos de las vías de síntesis de nucleósidos o directamente silenciando ciertos genes involucrados en ellas, bajo un esquema experimental similar al utilizado en el bloque de resultados anterior (**Figura 17**). Las células HEK293 fueron tratadas con el inhibidor de hENT1 NBTI 10 μ M, el inhibidor de la DHODH Brequinar 10 μ M, o con el inhibidor de ATIC Cpd14 100 μ M o transfectadas con los siRNAs siDHODH o siPAICS. En el caso de la inhibición farmacológica de las vías de biosíntesis, los tratamientos se realizaron por separado o en conjunto (BQR + Cpd14), durante las 6 horas previas al análisis.

Ya que estos tratamientos afectan vías metabólicas de vital importancia para la célula y sabiendo que QDPR modula elementos de estas vías, se comenzó evaluando el efecto de los inhibidores sobre la regulación de QDPR, más que todo para saber si las alteraciones en los niveles de nucleósidos podían alterarla. En conjunto, los resultados obtenidos al bloquear la vía de síntesis *de novo* de pirimidinas, ya sea por inhibición o por el silenciamiento de la DHODH, llevó a una regulación positiva de QDPR, que en ambos casos fue significativa (**Figura 29A-B**). El efecto del silenciamiento de DHODH sobre QDPR fue acorde a lo observado con BQR, a pesar de que el silenciamiento de la enzima fue de un 35%, aproximadamente. Este aumento de la expresión de QDPR no pudo ser observado cuando se bloqueó la síntesis *de novo* de las purinas con ninguna de las aproximaciones experimentales (**Figura 29A-C**). La inhibición en simultáneo de cada vía tuvo el efecto contrario sobre QDPR, ya que pareció disminuirla (**Figura 29A**). En estos resultados, a pesar de que QDPR parecería verse modulado en función de los niveles relativos de pirimidinas, como la diana experimental es DHODH no se podría desestimar la posibilidad de que el efecto sobre QDPR esté vinculado a alteraciones mitocondriales, principalmente de la cadena respiratoria.

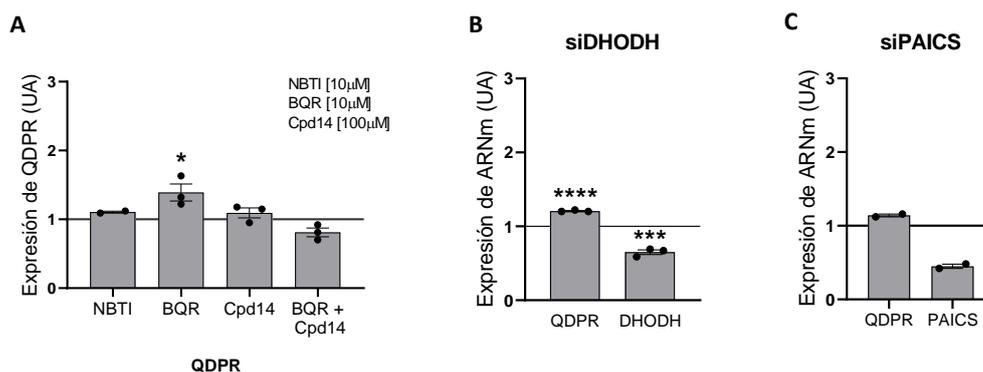


Figura 29. Regulación de QDPR por la disponibilidad intracelular de nucleósidos. Las células HEK293 fueron tratadas con (A) NBTI 10 μ M, BQR 10 μ M y/o Cpd14 100 μ M durante 6 h previas al análisis o con (B) siDHODH 50nM o (C) siPAICS 100n. La expresión de ARNm de QDPR y DHODH se analizó por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 2-3 experimentos independientes. Los resultados son referenciados al control pcDNA3.1 (representado con una línea) y están expresados en unidades arbitrarias (UA). Significancia estadística por (A) ANOVA de una vía o (B) T-Student para datos no pareados, a control pcDNA3.1 (* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$).

Con base en estos resultados, donde parecería que la transcripción de QDPR es sensible a alteraciones en la vía de síntesis de las pirimidinas, se decidió buscar un método que permitiera estudiar la interacción hCNT3:QDPR y ver entonces si esta se podía modular según la bioasequibilidad de nucleósidos. Como se comentó anteriormente, después de identificar a QDPR como proteína de interacción de hCNT3 la validación de la interacción se hizo por co-inmunoprecipitación, una técnica que tiene sus limitaciones al carecer de la posibilidad de medir en tiempo real los cambios en una interacción en una célula viva. Para ir más allá en el estudio de la interacción bioquímica entre QDPR y hCNT3, esta fue estudiada por ensayos NanoBRET modificando las condiciones fisiológicas intra o extra-celulares. Además, se aprovechó que es una estrategia sensible con la que se pueden visualizar cambios pequeños, pensando en que quizás el tipo de interacción que se quiere estudiar no es necesariamente una interacción estable en el tiempo, como las interacciones que se dan entre los monómeros de hCNTs, por ejemplo. De esta forma, partiendo de que ya se habían generado las proteínas fusión de hCNT3 para el sistema NanoBRET, se clonó el gen de QDPR en los cuatro vectores del sistema y se generaron las cuatro proteínas de fusión de QDPR con el tag donador NL o el tag aceptor HT en los extremos amino o carboxilo de la proteína. El primer paso, una vez obtenidos los constructos, fue validar la expresión de las proteínas de fusión en HEK293 por western blot, utilizando el anticuerpo específico para QDPR. Para tener una doble verificación y como control, en paralelo se hicieron duplicados revelando con los anticuerpos específicos para cada tag y se verificó que los tamaños esperados coincidieran en cada caso. El monómero de QDPR tiene un

peso de 25 kDa, mientras que, considerando los tamaños de Nanoluc (-NL) y HaloTag (-HT), QDPR-NLs y QDPR-HTs se esperaría que tuviesen un peso de 44 kDa y 58 kDa, respectivamente. Como se muestra en la figura (**Figura 30A**), para los cuatro constructos se obtuvieron los pesos esperados, pudiéndose observar las bandas correspondientes a los dos QDPR-NL alrededor de los 40 kDa, mientras que los QDPR-HT se observan sobre los 60 kDa. De esta forma, después de comprobar la correcta expresión de todas las proteínas fusión, se pasó entonces a la validación de los pares hCNT3:QDPR. A diferencia de la validación realizada para los constructos de hCNT1 y hCNT3 utilizados en el bloque de resultados anterior, donde por el tipo de ensayo planteado solo se podía trabajar con una combinación posible para cada isoforma de hCNT estudiada (ambos tags en N-terminal o ambos en C-terminal), en el caso de hCNT3:QDPR fue necesario realizar una validación y optimización más completa. Como de cada proteína de interés (hCNT3 o QDPR) se generaron cuatro proteínas de fusión, existían 8 posibles combinaciones donador:aceptor (**Figura 30B**). Todas las combinaciones fueron formadas por una de las proteínas fusión unida al donador (NL) con la otra proteína del par unida al aceptor (HT), es decir, que si se tenía a QDPR-NL (en N o C-ter) como donador, su par sería con hCNT3-HT (en N o C-ter) como aceptor. Con el fin de identificar cuál de estas combinaciones tenía la mejor transferencia de energía, se realizó una lectura preliminar comparando las 8 combinaciones posibles entre QDPR y hCNT3. Al ser una proteína de membrana y contar con el extremo N-terminal citoplasmático, tenía más sentido probar los pares que incluyeran a hCNT3 con los tags en el extremo amino, ya que es la región en donde hipotetizamos que se producen más probablemente las interacciones con otras proteínas. Sin embargo, tomando en cuenta que QDPR es una proteína de interacción identificada por la técnica MYTH donde se considera la proteína completa, no se quiso descartar cualquier interacción con el extremo C-ter de hCNT3. Por su ubicación, la interacción de QDPR con este extremo del transportados es improbable y, de darse, debería producirse en un hCNT3 intracelular, localizado en la membrana de algún compartimento interno. De esta forma, se co-transfectaron en células HEK293 las proteínas de fusión QDPR y hCNT3, en las combinaciones anteriormente descritas, y se analizó el BRET ratio (mBU) para cada condición. Acorde al razonamiento sobre el extremo N-terminal de hCNT3 y que este podía ser el involucrado en las interacciones establecidas por hCNT3 con otras proteínas, se observó que los pares con valores mBU más elevados correspondían a aquellos en los cuales hCNT3 tenía el tag en el extremo N-terminal (**Figura 30C**), específicamente los hCNT3-NL. Para la optimización de la técnica, la elección del mejor par se realiza en primer lugar, en función del mBU y en segundo lugar de los valores

crudos del donador (emisión NL- 460nm). Así, con estas consideraciones se eligió el par formado por hCNT3 pNLF1-N y QDPR pHTN.

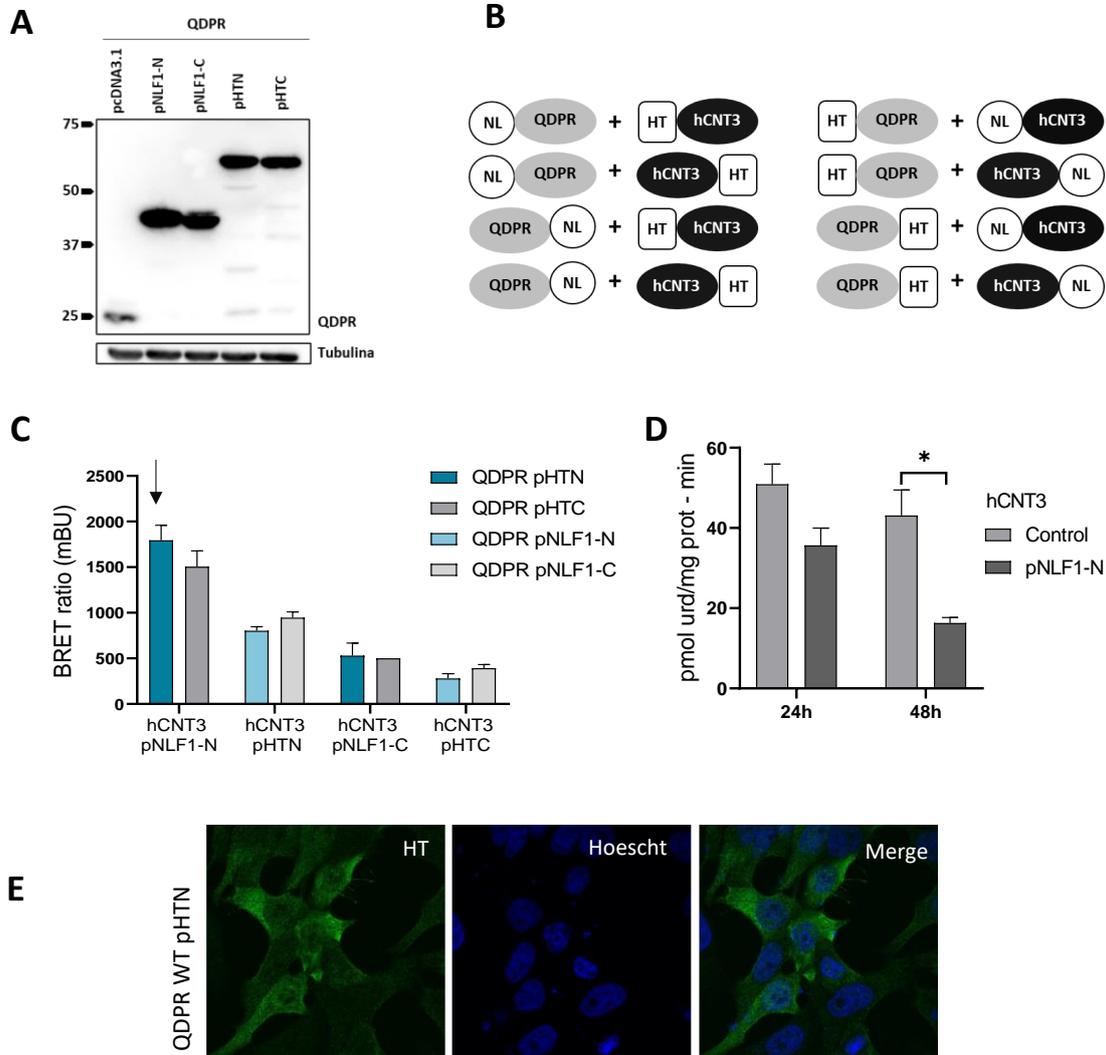


Figura 30. Validación de las proteínas fusión de QDPR en el sistema NanoBRET para el estudio de Interacción entre QDPR y hCNT3. (A) Expresión de las proteínas fusión de QDPR con los diferentes tags NL o HT en células HEK293, analizadas por western blot. Se muestra una imagen representativa de 4 experimentos independientes. (B) Esquema de las diferentes combinaciones posible entre las proteínas de fusión de QDPR y hCNT3. (C) Prueba de pares entre las proteínas fusión de QDPR y hCNT3. Las células HEK293 fueron co-transfectadas con 0,2 µg NL y 2 µg HT (ratio NL – HT 1:10) con los diferentes pares QDPR:hCNT3 establecidos, y se analizó la interacción por NanoBRET. El par con mejor mBU y mejores valores crudos está señalado con una flecha. Se muestra la media ± SEM de dos experimentos independientes. (D) hCNT3-pcDNA3.1 y hCNT3-pNLF1-N fueron sobreexpresados en células HEK293 y se midió el transporte de uridina durante 1 minuto. El transporte específico de hCNT3 corresponde a la diferencia entre los valores obtenidos en medio con sodio y en medio con colina. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes. Significancia estadística determinada por T-Student no pareado (* p < 0,05). (E) Ubicación subcelular de la proteína QDPR pHTN, sobreexpresada en células HeLa. El marcaje se hizo con α-HT (Rb) y luego se marcó en verde con un α-Rb Alexa 488. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

Continuando con la validación de las proteínas seleccionadas, se evaluó la capacidad de transporte del hCNT3 seleccionado, para poder vincular los resultados al uso de un hCNT3 funcional. hCNT3 pNLF1-N fue transfectado en células HEK293 y se midió el transporte de uridina a las 24 y a las 48 horas, ya que son los tiempos en los que están hechos la mayoría de los experimentos. Al comparar el transporte de uridina de hCNT3 pNLF1-N con respecto a hCNT3 pcDNA3.1 (control) se observó poca diferencia en el transporte, llegando a ser cerca de 40 pmol por minuto de uridina con respecto a 50 pmol por minuto de uridina, respectivamente (**Figura 30D**). A las 48 horas el transporte de uridina estuvo muy disminuido con respecto al control (un poco menos de 20 pmol de uridina por minuto), pero seguía existiendo, con lo que se consideró suficiente como para considerarlo funcional. Otra verificación que se hizo fue la determinación de la ubicación subcelular de QDPR pHTN y se confirmó que la distribución correspondía a lo esperado para QDPR, es decir un marcaje citoplasmático (**Figura 30E**). En el caso de hCNT3 pNLF1-N, su ubicación subcelular ya había sido evaluada previamente, observándose correctamente localizado en la membrana celular (**Figura 13**).

Determinar la ubicación intracelular de cada una de estas proteínas se hizo relevante ya que se debía asegurar que, aun teniendo los tags, las proteínas seleccionadas mantuvieran una distribución acorde a lo que ha sido descrito para ellas. En cuanto a la función, se utilizó la misma premisa: tratar de utilizar proteínas fusión que conservaran algo de su actividad innata. Sin embargo, en el caso de QDPR determinar la actividad de la enzima estaba fuera de las posibilidades, por lo que recurrimos a un análisis de su estructura. Para llevar a cabo su función enzimática, QDPR trabaja como un homodímero. Analizando su estructura cuaternaria se puede observar cómo los extremos C-terminal de cada monómero se disponen hacia adentro de la estructura (**Figura 31A**), casi enfrentándose uno al otro, mientras que los extremos N-terminal quedan hacia afuera del dímero (**Figura 31B**). Para una proteína como QDPR, cuyo monómero es de 25 kDa, tiene más sentido pensar que para poder formar el dímero funcional, la mejor ubicación para un tag (que es casi del tamaño de la proteína misma), sería hacia afuera de la estructura, es decir en el N-terminal. Si el tag se ubica hacia adentro sería lógico pensar que este podría ser un factor que impidiera la dimerización.

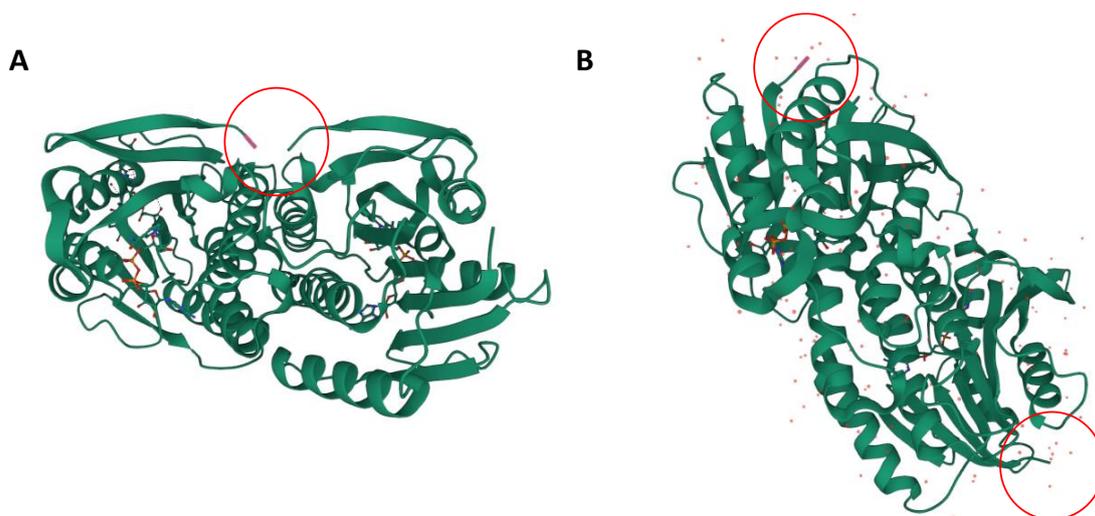


Figura 31. Estructura del dímero de QDPR. Se muestra la estructura cristalográfica del complejo QDPR-NADH expresado en *Escherichia coli* a partir del cDNA de su homólogo de rata, obtenida del Protein Data Base (PDB: #P09417). Se muestran en círculos (A) los extremos carboxi-terminal y (B) amino-terminal de los monómeros de QDPR.

Una vez elegido el par, las condiciones de transfección en función a la ratio donador-aceptor fueron optimizadas y se decidió trabajar con una ratio 1:10, basándonos nuevamente en los valores mBU y en los valores crudos del donador. Esta optimización se realiza para asegurar un buen rango dinámico en la lectura.

Al realizar este tipo de ensayos, es importante determinar si la señal que se detecta corresponde a una señal específica o no. Al no contar con moduladores de la interacción entre hCNT3-NL y QDPR-HT, se hace necesario otro tipo de aproximación para asegurar que la interacción que se está estudiando es una interacción específica. Es por esto que, para nuestro par de proteínas llevamos a cabo el ensayo de saturación del donador (DSA), que de manera resumida se basa en que, al mantener la cantidad de donador estable e ir aumentando de manera gradual la cantidad de aceptor, la ratio mBU irá aumentando gradualmente hasta llegar a un plató que representa la saturación de todo el donador que se tenía fijado desde un principio. De esta forma, la gráfica resultante sería una hipérbola, contraria a la gráfica lineal que se obtendría en una interacción no específica. Para esta prueba se utilizó como par control negativo de interacción a QDPR-HT:MDM2-NL. MDM2 es una de las dos proteínas que conforman al par control del ensayo de NanoBRET y que, en principio, no está vinculada a QDPR. En el ensayo DSA se observó claramente como al tener la cantidad de hCNT3-NL fija e ir aumentando la cantidad de QDPR-HT la gráfica resultante fue una hipérbola, a diferencia del control negativo donde se vio una línea aplanada (**Figura 32**). Este resultado confirmó que la

interacción entre los pares seleccionados corresponde a una interacción específica entre QDPR y hCNT3.

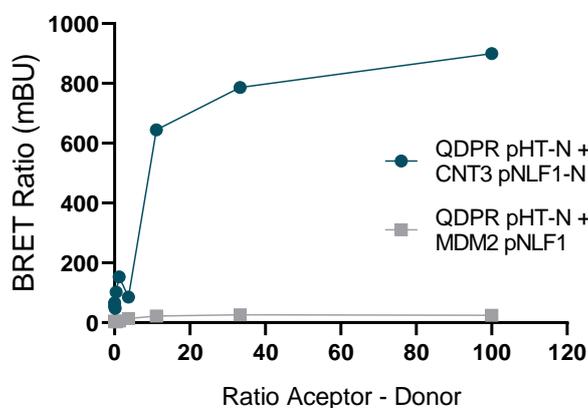


Figura 32.- Prueba de saturación del donador del par hCNT3 pNLF1-N:QDPR HT-N. Las células HEK293 fueron co-transfectadas con hCNT3 pNLF1-N a cantidad constante y diluciones seriadas de QDPR pHTN (a partir de una ratio NL – HT 1:100) con los diferentes pares hCNT3:QDPR establecidos, y se analizó la interacción por NanoBRET. Gráfica representativa de 2 experimentos independientes.

2. Papel de las biopterinas en la regulación de hCNT3 por QDPR

La BH₄ es la forma activa de la biopterina y su administración como tratamiento a pacientes con deficiencia de BH₄ es ampliamente utilizada. En órganos como el hígado, donde es necesario un buen contenido de BH₄ que asegure su disponibilidad para las reacciones de hidroxilación de la fenilalanina, el transporte del cofactor no puede realizarse en su forma reducida. Estudios en tejido renal se ha visto que es BH₂ la forma transportable de BH₄. Después de su administración, BH₄ es oxidada y transportada al interior de la célula donde luego la BH₂ puede ser reducida a BH₄ de nuevo por la vía de salvamento (Sawabe y col., 2008; Hasegawa y col., 2005; Sawabe 2004). La acumulación de BH₄ es sensible al metrotexato (MTX) por tanto depende de la reducción de BH₂ por la enzima DHFR (Sawabe, 2014). Para la captación rápida de BH₂ o BH₄, y luego su posterior excreción a través de la orina, ha sido descrito un proceso mediado por transportadores. Estudios en tejido de riñón y cerebro demostraron que ambas biopterinas pueden ser transportadas a través de la membrana por transportadores de aniones orgánicos (OATs) (Ohashi y col., 2017, Sweet 2021). Además, el transporte también puede ser mediado por los transportadores de nucleósidos hENT1 y hENT2, siendo el segundo más eficaz (Ohashi y col., 2011). Con base en estos precedentes y dada la interacción establecida con QDPR, se propuso estudiar si hCNT3 era capaz de

transportar biopterinas y específicamente el sustrato BH₂. Para ello, se midió la captación de citidina (la pirimidina a la que tiene más afinidad el transportador) en células HEK293 con expresión estable del transportador hCNT3, durante un minuto y en presencia de diferentes concentraciones saturantes de BH₂. En principio, una disminución del transporte Na-dependiente de citidina acorde a un aumento en la concentración BH₂ podría ser indicativo de que ambos sustratos compiten por el sitio de unión al transportador. Sin embargo, incluso a 1 mM de BH₂, el transporte del nucleósido citidina por hCNT3 no se vio modificado (**Figura 33A**). A continuación, se propuso estudiar si esta molécula vinculada indirectamente a la actividad de QDPR podían actuar por sí sola sobre la regulación de hCNT3. Si la regulación del transportador por QDPR estuviese vinculado a cambios en las cantidades intracelulares del producto BH₄, la administración de BH₂ o incluso de la misma BH₄ podría inducir cambios en hCNT3 similares a los observados por sobreexpresión de QDPR. En células Caco-2, a diferencia de en hepatocitos, la acumulación de BH₄ es insensible al tratamiento con MTX, sugiriendo que BH₄ podría ser transportada sin tener que ser oxidada previamente (Sawabe y col., 2005). Sin embargo, se ha observado que la acumulación de biopterinas en células en cultivo es superior y más rápida si se administra BH₂ y no BH₄ (Hasegawa y col., 2005) por lo que quizás podrían existir respuestas celulares diferentes entre la administración de una u otra, sobre todo en interacción. Por ello, las células HEK293, fueron tratadas con BH₂ a 50 µM durante 24 o 48 horas. Al analizar la expresión de QDPR y hCNT3 se vio que en ninguno de los tiempos estudiados hubo cambios relevantes en la expresión de los mensajeros, a excepción de la expresión de hCNT3 después de 48 horas de tratamiento, que se vio reducida (**Figura 33B**). Lo siguiente fue estudiar si la presencia de BH₂ tenía un impacto directo sobre la interacción QDPR:hCNT3 y se establecieron dos panoramas: estudiar el efecto de BH₂ en presencia o ausencia de nucleósidos utilizando FBSi completo o dializado. En ambas condiciones, se observó una leve disminución de la interacción a 1 hora post - tratamiento, cambio que llega a ser estadísticamente significativo en ausencia de nucleósidos en el medio extracelular (**Figura 33C**). Pensando en que quizás el cambio en la interacción podría ser más notorio en tiempos de tratamiento más largos, se decidió incluir un punto más y se analizó la interacción a 2 horas post - tratamiento. Sin embargo, en este último tiempo no pareció que hubiese diferencia con respecto al control.

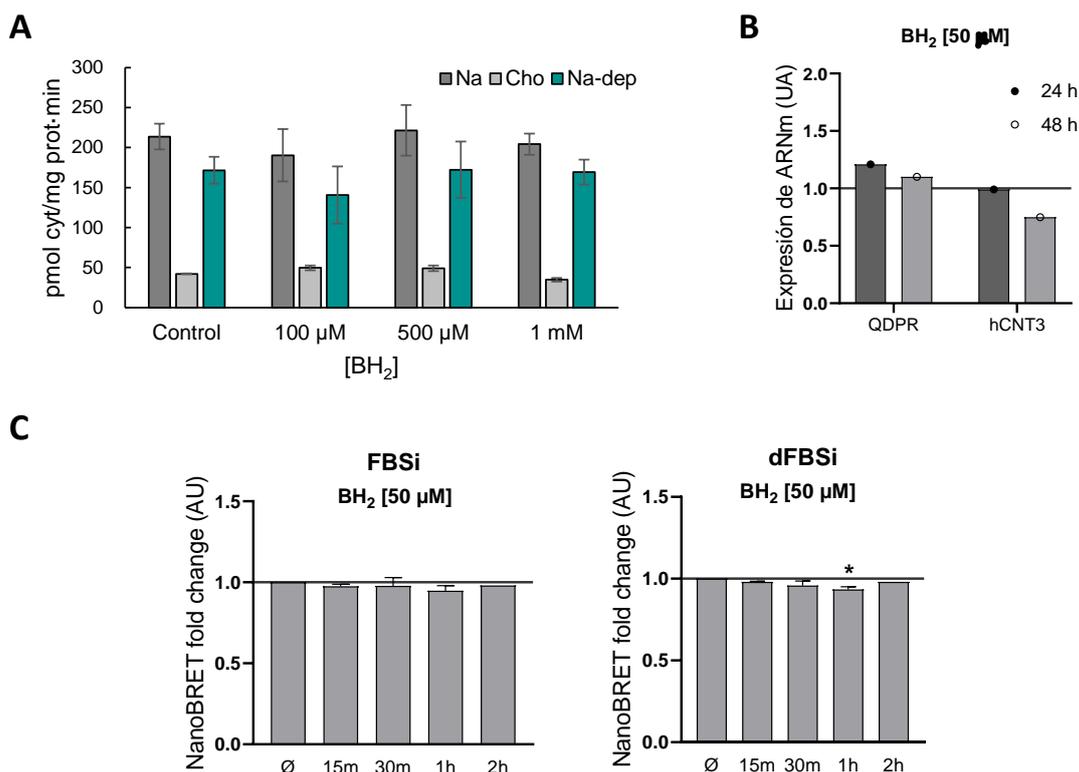


Figura 33. Papel de BH₂ en la interacción entre hCNT3 y QDPR. (A) Se cuantificó el transporte de citidina durante 1 minuto en HEK293-CNT3, en presencia de diferentes concentraciones de BH₂ (n=1). (B) Células HEK293 fueron tratadas con BH₂ 50 μM durante 24 o 48 h y la expresión de ARNm de QDPR y hCNT3 se analizó por RT-qPCR (n=1). (C) Análisis NanoBRET de interacción entre hCNT3 y QDPR luego del tratamiento con BH₂ 50μM durante 15 min, 30 min, 1 h y 2 h, en medio con FBSi o en medio con FBSi dializado. Se muestra la media ± SEM de 4 experimentos independientes, excepto 2 h (n=1). Significancia estadística por ANOVA de una vía a control pcDNA3.1 (representado con una línea) (*p < 0,05).

La expresión de QDPR y hCNT3 también se evaluó bajo el tratamiento con BH₄, pero dada la variabilidad de los experimentos no pareció existir una modulación evidente a ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 34A**). En cuanto al estudio de la interacción, con el tratamiento con BH₄ se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos con BH₂: hubo una pequeña disminución de la interacción una hora después del tratamiento, que no llegó a ser significativa con FBSi ni con dFBSi (**Figura 34B**). Hasta cierto punto era de esperar la similitud de las respuestas después de los tratamientos con BH₂ y BH₄ ya que, al final, BH₄ habrá tenido que ser oxidada para poder ser transportada correctamente.

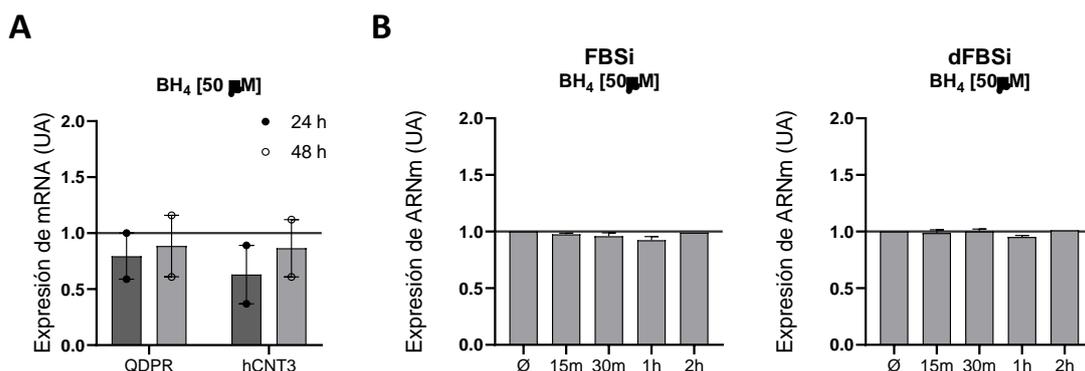


Figura 34. Papel de BH₄ en la interacción entre hCNT3 y QDPR. (A) Células HEK293 fueron tratadas con BH₄ 50 μM durante 24 o 48 h y la expresión de ARNm de QDPR y hCNT3 se analizó por RT-qPCR. (B) Análisis NanoBRET de interacción entre hCNT3 y QDPR luego del tratamiento con BH₄ 50 μM durante 15 min, 30 min, 1 h y 2 h, en medio con FBSi o en medio con FBSi dializado. Se muestra la media ± SEM de 2-4 experimentos independientes, excepto 2 h (n=1). Significancia estadística por ANOVA de una vía a control pcDNA3.1 (representado con una línea) (*p < 0,05).

Los resultados obtenidos con las biopterinas podrían sugerir alguna modulación, sobre todo en interacción, pero los resultados no llegan a ser del todo concluyentes analizando la regulación del transportador hCNT3. Las bajas cantidades de hENT2 en el modelo celular HEK293 y la baja eficiencia de transporte de estas moléculas por hENT1 puede ser una limitante a la hora de estudiar efectos fisiológicos vinculados a la administración de biopterinas, sobre todo si el transporte de estas depende de ENTs en este modelo celular.

En la bibliografía, los estudios de captación de biopterinas en células en cultivo se plantean en tiempos cortos (Ohashi y col., 2009; Sawabe y col., 2008; Yamamoto y col., 1996), ya que solo se compara la capacidad de cada una de ellas de acumular BH₄ dentro de la célula. Si bien estos trabajos coinciden con los tiempos elegidos en esta tesis para los ensayos de interacción, estos antecedentes no permiten tener una base para poder tener un estimado de los niveles intracelulares de biopterinas a los tiempos estudiados para la regulación de QDPR y hCNT3. Es por ello que, entre esto, y el número de réplicas, las conclusiones no son claras.

3. Papel de los nucleósidos en la regulación de hCNT3 por QDPR

Como se comentó anteriormente, hCNT1 y hCNT3 están vinculados por los nucleósidos de pirimidinas, ya que ambos transportadores son capaces de translocarlos a través de la membrana celular, siendo hCNT1 un transportador específico de ellas. Pensando que

los cambios en el transcrito de hCNT3 por sobreexpresión de QDPR podían deberse a cambios en los niveles de pirimidinas intracelulares, se propuso estudiar su regulación en un contexto donde el reservorio de este nucleósido estuviera alterado. Nuevamente, la forma de hacerlo fue bloqueando la vía de síntesis *de novo*, con lo que se podría presuponer un cambio en las cantidades relativas de pirimidinas intracelulares. Se sobreexpresó QDPR en células HEK293 y se realizó un tratamiento con BQR 10 μ M durante las 6 horas previas al análisis. Bajo el esquema experimental planteado, el tratamiento con BQR no pareció modificar la regulación de hCNT3 por QDPR (**Figura 35A**). En el caso de hCNT1, BQR pareciera tener un efecto aumentándolo, pero al haber tanta variabilidad en estos resultados se hace difícil llegar a conclusiones claras. Para hCNT2 también existió mucha variabilidad, sobre todo en el control, pero en líneas generales no pareciera haber ninguna variación entre las condiciones control y la tratada con BQR. Por último, los transportadores equilibrativos no sufrieron ningún cambio. Al analizar el efecto del BQR, esta vez sobre la regulación de hCNT1 o hCNT3 sobre QDPR, se observó que el tratamiento tampoco tuvo efecto sobre el mensajero (**Figura 35B**). Este resultado parece indicar que la sola expresión de alguno de los transportadores de pirimidinas puede prevenir el aumento de la transcripción de QDPR que había sido observado previamente al bloquear la vía de síntesis de pirimidinas (**Figura 29A-B**).

Para confirmar los resultados anteriores y así ver con mayor claridad el impacto de la inhibición de la vía de síntesis *de novo* de pirimidinas, decidimos utilizar una estrategia experimental distinta, el silenciamiento dirigido contra alguna de las enzimas de la vía para disminuir su expresión. En este caso, el blanco fue nuevamente la DHODH, pero silenciándola con siDHODH 50nM, en simultáneo a la sobreexpresión de QDPR, hCNT1 o hCNT3 y luego, según fuera el caso, los transcritos de hCNTs, hENTs y QDPR fueron analizados por RT-qPCR. En este caso, la sobreexpresión de QDPR en paralelo al silenciamiento de DHODH tuvo el mismo efecto que el tratamiento con BQR sobre la regulación de hCNT3 (**Figura 35C**), pudiéndose ver una leve tendencia a la baja que sigue siendo no significativa. Caso contrario ocurrió con hCNT1, el cual puede observarse regulado negativamente al compararlo con el control, siendo este un resultado marcadamente diferente con respecto al tratamiento con el inhibidor. Al ser DHODH una proteína insertada en la membrana mitocondrial interna, directamente acoplada al sistema OXPHOS, cabe pensar que el impacto biológico de su silenciamiento sobre algunas proteínas pueda divergir significativamente con lo observado tras su inhibición farmacológica. Por último, al igual que con el tratamiento

con BQR, el silenciamiento de DHODH no tuvo efecto sobre la no regulación de QDPR en condiciones de sobreexpresión de hCNT3 o hCNT1.

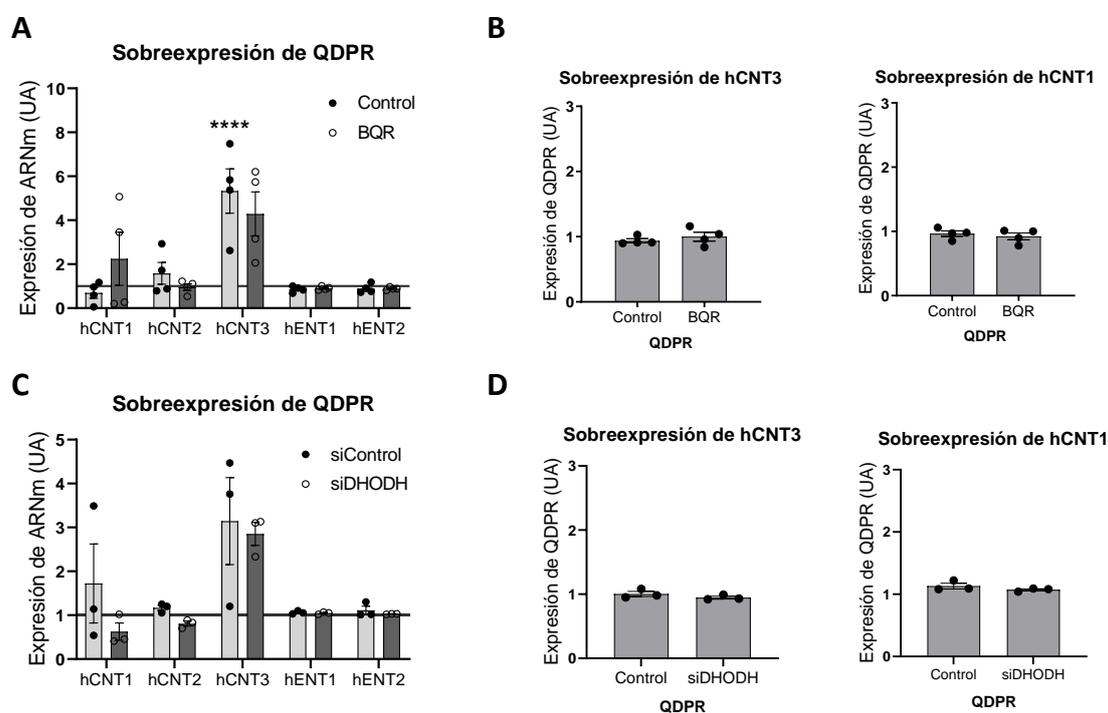


Figura 35. Papel de las pirimidinas en la regulación de hCNT3 por QDPR. (A) Las células HEK293 fueron transfectadas con (A) QDPR, (B) hCNT3 o hCNT1 y se realizó el tratamiento con BQR 10 μ M 6 h antes del análisis. (B) Las células HEK293 fueron transfectadas con (C) QDPR, (D) hCNT3 o hCNT1 y siDHODH 50nM y la expresión de ARNm de los hCNTs y hENTs fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. Significancia estadística por ANOVA de una vía al control pcDNA3.1 (representado con una línea) (**** $p < 0,001$), y T-Student para datos no pareados entre grupos (Control-Tratamiento).

Aunque los primeros análisis sugerían una participación de las pirimidinas en los cambios transcripcionales observados en QDPR, hCNT3 y hCNT1, la inhibición de su síntesis no logró aclarar su papel. Analizando el comportamiento de hCNT1 en el primer bloque de resultados se vio que, a pesar de ser un transportador específico de pirimidinas, el bloqueo de la biosíntesis de las purinas alteró su expresión (**Figura 21**). Esto podría llevar a pensar que la regulación de los transportadores podría ser un poco más compleja y no estaría vinculada a un solo grupo de nucleósidos, más que todo, siendo hCNT3 transportador también de purinas.

Tomando esto en cuenta, se planteó igualmente inhibir la síntesis *de novo* de purinas para estudiar su efecto sobre la regulación, con una aproximación semejante a la utilizada con las pirimidinas. Después de transfectar QDPR, las células HEK293 fueron tratadas durante 6 horas antes del análisis con el inhibidor de ATIC Cpd14 100 μ M. Al

analizar la expresión de mensajeros se pudo observar que, al bloquear el metabolismo de purinas hCNT3 tuvo una leve tendencia a aumentar con respecto al control sin tratamiento, sin ser este un efecto significativo (**Figura 36A**). También hCNT2, sin ser significativo, mostró una tendencia a aumentar en algunos ensayos, lo que podría explicarse como un mecanismo de compensación al ser este transportador específico de purinas. En el caso de hCNT1, la tendencia a aumentar después del bloqueo de la síntesis de purinas si fue significativa y parecería una compensación similar a la observada con hCNT2. Analizando los transportadores equilibrativos, se observa de nuevo que la regulación de hENT1 y hENT2 no fue modificada por el tratamiento. En cuanto a la sobreexpresión de los transportadores, ni el efecto de la sobreexpresión de hCNT3, ni de hCNT1 sumado al efecto de Cpd14 modificó los niveles de mensajero de QDPR (**Figura 36B**). Se utilizó además la estrategia del silenciamiento, esta vez de la enzima de la síntesis de purinas PAICS, para contrastar de forma preliminar el último resultado descrito. Se transfectaron las células HEK293 con hCNT1 o hCNT3 y siPAICS 100nM durante 48 horas y luego los transcritos de QDPR fueron analizados por RT-qPCR. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados con Cpd14, donde la sobreexpresión de hCNT1 o hCNT3 en paralelo al silenciamiento de PAICS tampoco alteró la expresión de QDPR (**Figura 36C**).

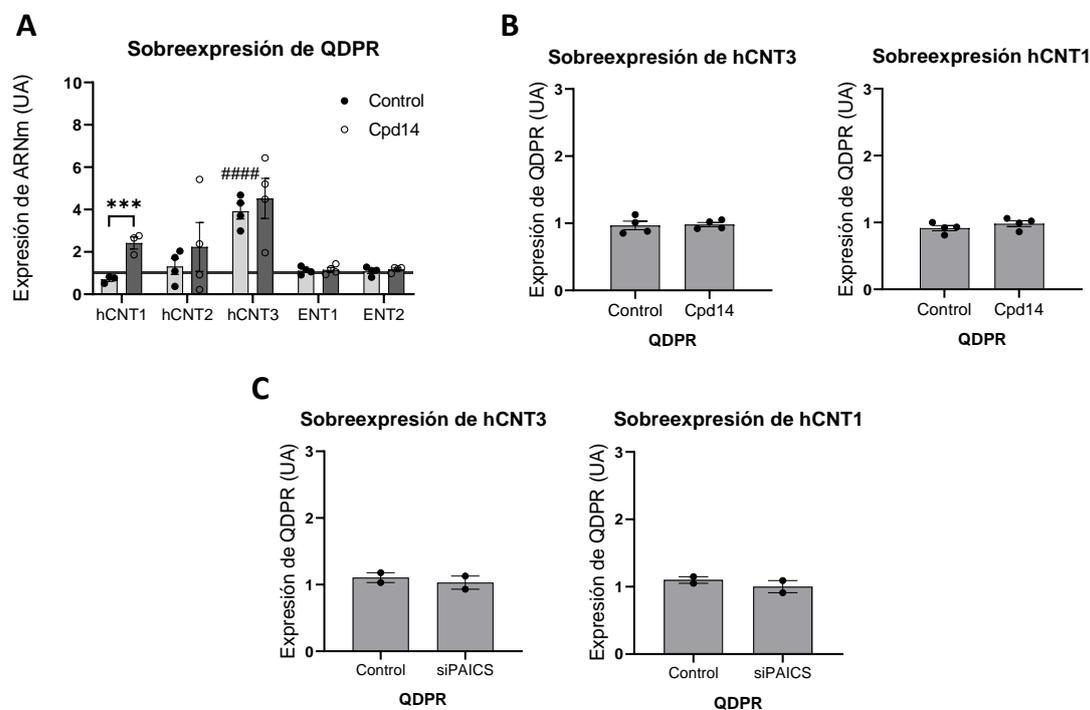


Figura 36. Papel de las purinas en la regulación de hCNT3 por QDPR. Las células HEK293 fueron transfectadas con (A) QDPR, (B) hCNT3 o hCNT1 durante 48 h y se realizó el tratamiento con Cpd14 100µM 6 h antes del análisis. (C) Las células HEK293 fueron transfectadas con hCNT3 o hCNT1 y siPAICS 100nM durante 48 h. La expresión de ARNm de los hCNTs y hENTs fue analizada por RT-qPCR. Se muestra a

media \pm SEM de 2-4 experimentos independientes. Significancia estadística determinada por ANOVA de una vía al control pcDNA3.1 (Representado con una línea) (#### p < 0,001), y T-Student no pareado entre grupos (Control-Tratamiento) (** p < 0,005).

Los resultados descritos hasta el momento permitieron hipotetizar que quizás la regulación de hCNT3 estuviera más vinculada a un desbalance en los niveles relativos de nucleósidos totales y no tanto a desbalances individuales. Con base en ello se decidió analizar el efecto de la combinación de la inhibición de la síntesis *de novo* de purinas y de pirimidinas. Así, del mismo modo que se había realizado anteriormente, los tratamientos con los inhibidores Cpd14 y BQR, de forma individual o conjuntamente, se realizaron en células HEK293 transfectadas con QDPR. El aumento de hCNT3 no tuvo cambios ante la sobreexpresión de QDPR en combinación con los inhibidores (**Figura 37**), volviendo a observar los mismos resultados con los inhibidores de forma independiente y sumando el resultado del efecto combinado entre ambos, sin cambios. Se hizo llamativo que, si bien el tratamiento combinado con BQR y Cpd14 no varió el resultado con respecto al control, hCNT1 no tuvo cambios con el tratamiento de Cpd14 solo, como se había visto en resultados anteriores. Para el resto de los transportadores, solo hCNT2 pareció tener un poco más de variación entre tratamientos, pero ninguno de los cambios que se ven resultaron tampoco estadísticamente significativos.

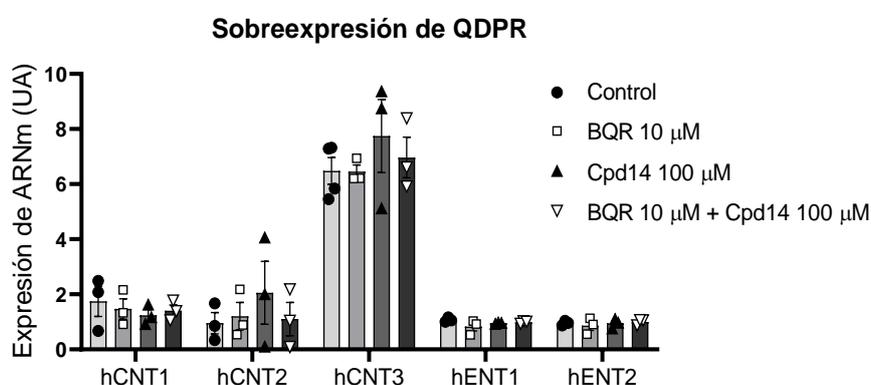


Figura 37. La modulación de la expresión de hCNT3 por QDPR no es modificado por el bloqueo del metabolismo de purinas y pirimidinas. Las células HEK293 fueron transfectadas con QDPR y el tratamiento con BQR 10 μ M y/o Cpd14 100 μ M se realizó 6 h antes del análisis. La expresión de ARNm de los hCNTs y hENTs fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Significancia estadística determinada por ANOVA de dos vías entre grupos (Control-Tratamientos).

De las diferentes formas de modulación de los niveles de nucleósidos intracelulares que se habían planteado desde un inicio para los estudios de regulación, ninguna permitió ver cambios en el efecto basal de hCNT3 sobre la expresión de QDPR. Por esto, se

decidió impedir el intercambio de nucleósidos entre los medios extra- e intracelulares a través del transportador hENT1, como otra estrategia para estudiar si QDPR podía ser modulado por una alteración en el metabolismo de nucleósidos en presencia de hCNT3. Después de la sobreexpresión en HEK293 de hCNT1 o de hCNT3, se realizó un tratamiento con NBTI 10 μ M durante las 6 horas previas al análisis. En estos resultados preliminares, tanto en sobreexpresión de hCNT3 como en sobreexpresión de hCNT1 acompañado del tratamiento con NBTI, QDPR tuvo una leve tendencia a ser regulado negativamente (**Figura 38**). A pesar de la presencia de los transportadores, el bloqueo de hENT1 parecería provocar una disminución de QDPR por, probablemente, una alteración en los niveles relativos de nucleósidos intracelulares.

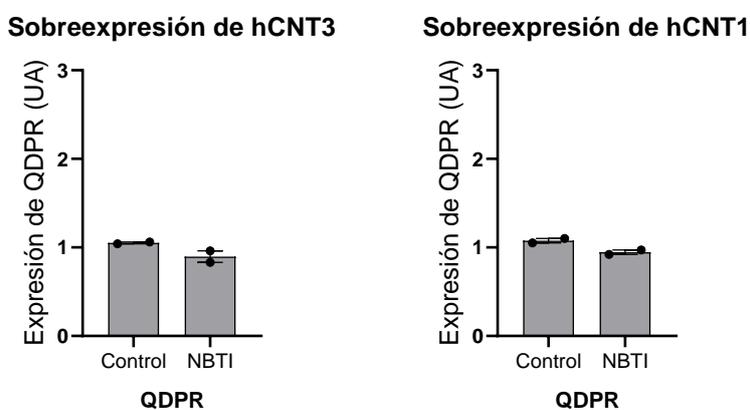


Figura 38. Papel de la inhibición del transporte de nucleósidos a través de hENT1 sobre la regulación de QDPR por hCNT3. Las células HEK293 fueron transfectadas con (A) hCNT3 o (B) hCNT1 durante 48 h y se realizó el tratamiento con NBTI 10 μ M 6 h. antes del análisis. La expresión de ARNm de QDPR fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. Los resultados están expresados en unidades arbitrarias y referenciados al control pcDNA3.1 (representado con una línea).

4. Papel de los nucleósidos en la interacción entre hCNT3 y QDPR

Continuando con el estudio del papel de los nucleósidos sobre la interacción entre QDPR y hCNT3, se evaluó el impacto de las alteraciones en las vías de síntesis de purinas y pirimidinas sobre su interacción física. Aprovechando el sistema NanoBRET, se planteó de nuevo una estrategia donde se pudiera modificar el contenido de nucleósidos dentro y fuera de la célula utilizando medios de cultivo suplementados con FBSi o dFBSi, y de esa forma tener control sobre los parámetros experimentales. Además, el tratamiento se acompañó con los inhibidores BQR y Cpd14, a la misma concentración utilizada anteriormente (10 μ M y 100 μ M, respectivamente). A diferencia

de los ensayos de regulación transcripcional, donde los tratamientos con inhibidores solo tuvieron una duración de 6 horas, para los ensayos de interacción los tiempos de incubación con los fármacos fue superior (18 - 20 horas). Fue por esto que se evaluó el uso de una concentración inferior de Cpd14, específicamente 10 μM , para minimizar la probabilidad de una disminución en la proliferación celular y que esto afectara los resultados. Para el resto de los inhibidores, las concentraciones a tiempos largos de incubación ya habían sido probadas, descartando un efecto citotóxico. En la bibliografía, para el uso de Cpd14 están reportadas concentraciones que van desde 125 a 1000 μM . Para determinar si una concentración baja de 10 μM era suficiente para inhibir el metabolismo de las purinas, se decidió evaluar la fosforilación de la AMPK. La AMPK es activada alostéricamente por AICAR (ZMP -5-aminoimidazol-4-carboxamida), un metabolito que se produce en la síntesis *de novo* de purinas y que es sustrato de la enzima ATIC exclusivamente de su forma dimérica. Al inhibir la dimerización con Cpd14 se bloquea el noveno paso de la síntesis de purinas y se produce una acumulación de AICAR lo que lleva a una activación de la AMPK. Si se considera que en medio rico en nucleósidos las vías de salvamento son priorizadas por encima de las vías de síntesis *de novo*, se puede esperar que en medio suplementado con FBSi exista una activación basal de AMPK por acumulación de AICAR. En cambio, en medio suplementado con FBSi dializado, la célula dependería únicamente de las vías de síntesis para la obtención de nucleósidos. Los resultados que obtuvimos se ajustaron a esta premisa previamente reportada (Asby y col., 2015). En medio rico en purinas y pirimidinas, no se observaron diferencias entre la condición control y los tratamientos con Cpd14 a 10 y 100 μM (**Figura 39A**), mientras en FBSi dializado se pudo ver la activación de AMPK con tratamiento con Cpd14 a 100 μM .

A pesar de que con 10 μM de Cpd14 no se vieron cambios en la activación de AMPK por western blot, se decidió igualmente incluir esta concentración en los estudios de interacción pensando en que, a pesar de que este tratamiento no genera una acumulación suficiente de AICAR como para ver la fosforilación de AMPK, quizás pudiese generar una inhibición de ATIC suficiente como para desbalancear la homeostasis de purinas y que esto se tradujera en cambios en la interacción. También para estandarizar los tratamientos farmacológicos se decidió separar los resultados en dos grupos: por un lado, el efecto de los tratamientos en suplementación con suero completo y por otro lado el efecto de los tratamientos con suero dializado. Esto se hizo con la finalidad de poder comparar bien el tipo de respuesta más que la escala a la que se daban, ya que los basales podrían ser diferentes en cada uno. Es por esto que cada

grupo (FBSi o dFBSi) fue referenciado a su control sin tratamiento (\emptyset). También, al ser una primera aproximación se trabajó únicamente con medio OptiMEM.

En concordancia con los resultados de fosforilación de la AMPK, la interacción entre hCNT3 y QDPR no fue alterada bajo el tratamiento con 10 μ M Cpd14, indistintamente de la ausencia o no de nucleósidos en el medio (**Figura 39B-C**). El tratamiento con 100 μ M de Cpd14 tampoco tuvo efecto sobre la interacción en medio suplementado con FBSi a pesar de que, a esta concentración, ya hay acumulación de AICAR. En cambio, en medio con FBSi dializado a la misma concentración la interacción pareció verse levemente desfavorecida. Lo que sí es interesante destacar es que al inhibir la DHODH la interacción se vio favorecida, volviendo a sugerir una implicación de las pirimidinas intracelulares sobre la interacción hCNT3:QDPR.

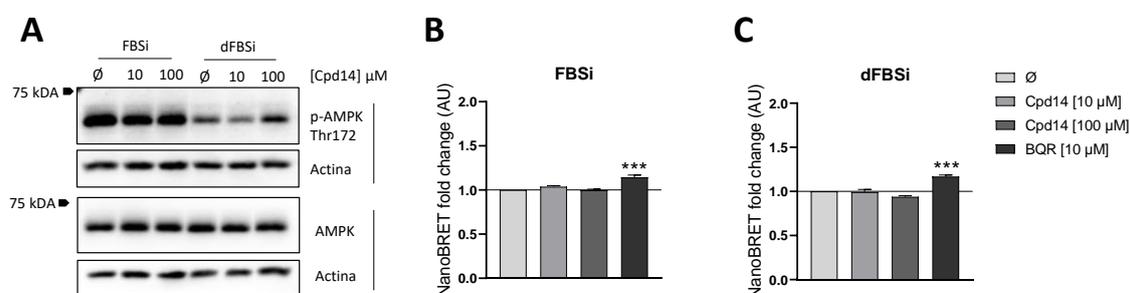


Figura 39. Implicación de las purinas en la interacción entre QDPR y hCNT3. (A) Las células HEK293 fueron tratadas con Cpd14 [10 μ M] o [100 μ M]. La fosforilación de la AMPK fue analizada por western blot, marcando con anticuerpos primarios α -p-AMPK α (Thr-172) y α -AMPK α . (B) Las células HEK293 fueron transfectadas con 0,2 μ g NL y 2 μ g HT (Ratio NL – HT 1:10) y mantenidas con (B) FBSi o (C) dFBSi. Los diferentes tratamientos con Cpd14 10 μ M, 100 μ M o BQR 10 μ M se realizaron 20 horas post transfección, y durante 16-18 h. La interacción hCNT3:QDPR está expresada en unidades arbitrarias y los datos fueron normalizados al control sin tratamiento (\emptyset - Interacción basal). Se muestra a media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Significancia estadística por ANOVA de una vía al control pcDNA3.1 (representado con una línea) (***) ($p < 0,005$).

Para poder interpretar estos resultados, un elemento a considerar es el conocer la formulación detallada del medio de cultivo utilizado, como fue en el caso del DMEM usado hasta ahora en todos los ensayos de co-regulación a nivel transcripcional. El sistema NanoBRET está estandarizado con el uso del medio OptiMEM, que es de formulación reservada y solo se conoce que está suplementado entre otros elementos, con timidina e hipoxantina, esta última una nucleobase que puede ser transportada por ambos hENTs. Sin embargo, las cantidades de suplementación son desconocidas. La comparativa entre los resultados obtenidos con medio OptiMEM y medio DMEM permitiría dar una idea de si estos elementos diferenciales agregados para promover la

viabilidad celular a través de las vías de recuperación participan en la modulación de la interacción. Fue por esto que se decidió trabajar en paralelo con ambos medios de cultivos, OptiMEM y DMEM, suplementados cada uno con FBSi o dFBSi.

Una primera aproximación se hizo incubando las células en el medio de cultivo con el que se estandarizó la interacción, es decir, en OptiMEM después de haberlas transfectado con el par hCNT3 NL-N:QDPR HT-N previamente seleccionado. En este medio, suplementado con FBSi o dFBSi, se puede observar como la interacción se ve muy poco alterada indistintamente del uso del FBSi dializado (**Figura 40A**). En cambio, con DMEM la ausencia de nucleósidos extracelulares pareció favorecer la interacción hCNT3:QDPR (**Figura 40B**). Este resultado muestra que la ausencia completa de nucleósidos en el medio favorece la interacción y apunta a que posiblemente los elementos que hacen al OptiMEM enriquecido tamponan el efecto del suero dializado. Es decir, que se podría pensar en la timidina o la hipoxantina presente en el OptiMEM como moduladoras, sin descartar otro tipo de elementos del que se desconozca su presencia (Ej. aminoácidos esenciales, ácido fólico, entre otros) y que también podrían estar actuando como moduladores.

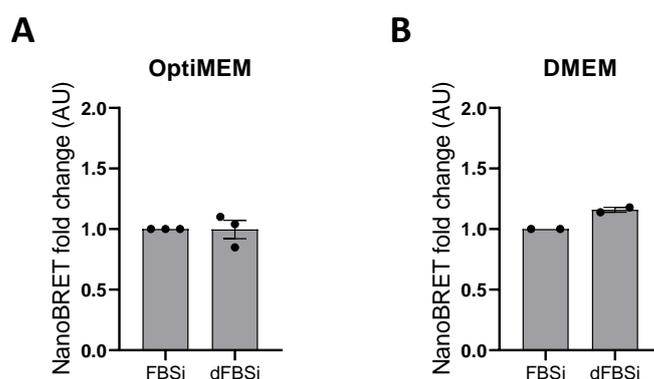


Figura 40. Efecto de la disponibilidad de nucleósidos extracelulares sobre la interacción entre QDPR y hCNT3. Las células HEK293 fueron transfectadas con 0,2 µg NL y 2 µg HT (ratio NL – HT 1:10) y mantenidas con (A) FBSi o (B) dFBSi durante 18-20 h. La interacción hCNT3:QDPR está expresada en unidades arbitrarias y los datos fueron normalizados al control FBSi (interacción basal). Se representan los resultados de la media ± SEM de 2 (DMEM) – 3 (OptiMEM) experimentos independientes. Significancia estadística por T-Student para datos no pareados.

Hasta el momento, todos los diseños experimentales planteados buscan dos cosas: la primera es evitar la recuperación de nucleósidos eliminándolos del medio extracelular, y la segunda alterar las vías de síntesis y de esta forma favorecer las vías de recuperación para reestablecer la homeostasis. Así, para los ensayos de interacción se propuso trabajar de nuevo con BQR 10 µM, y con Cpd14 incrementando su concentración de 100 a 200 µM para buscar un efecto más marcado sobre la interacción

del que fue visto en medio OptiMEM suplementado con dFBSi (**Figura 39C**). Viendo los resultados previos (**Figura 40**), se decidió incluir un tercer tratamiento farmacológico y bloquear las vías de recuperación. Para lograrlo, se utilizó el inhibidor de hENT1, NBTI. La intención era ver el impacto de la recuperación de nucleósidos sobre la interacción y además forzar el sistema lo más posible combinando la inhibición de la vía de recuperación en paralelo a la inhibición de las vías de síntesis *de novo*.

Como ya se comentó, en estos ensayos los tiempos de tratamientos con fármacos fueron mucho más largos que los realizados para el estudio de expresión de los mensajeros. Como las células para los ensayos NanoBRET son sembradas en placas opacas y no se pueden visualizar al microscopio, en paralelo se hicieron controles con células sembradas en placas translucidas, tratadas con los diferentes inhibidores a las condiciones experimentales establecidas. Durante el tratamiento, las células tuvieron un seguimiento durante 48 horas para visualizarlas y comprobar su integridad. Como último factor se incluyó también el mismo esquema, pero en medio DMEM. Al igual que con los resultados anteriores, los resultados fueron referenciados a su control por grupo (FBSi - dFBSi).

Lo primero que se observó en los ensayos de interacción inhibiendo las vías de síntesis y recuperación de nucleósidos fue que la presencia o ausencia de nucleósidos en el medio OptiMEM no alteró el efecto de los diferentes tratamientos sobre la interacción (**Figura 41A-B**). Esto tiene sentido si se piensa que previamente se había visto que por sí sola la formulación del OptiMEM podía tamponar el efecto de la carencia de nucleósidos en el suero dializado (**Figura 40**). Tanto con FBSi como con dFBSi se observó de nuevo un aumento de la interacción con BQR similar al aumento que también se observó bajo tratamiento con NBTI. Sin embargo, no existió una potenciación de este aumento en los tratamientos combinados. En el caso del ensayo con medio DMEM (**Figura 41C-D**), a pesar de ser preliminar, se ve claramente que el efecto de los tratamientos sobre la interacción es menos evidente. En este caso, existen mayor heterogeneidad entre la respuesta de la interacción en medio suplementado con FBSi con respecto al dFBSi, sobre todo en los tratamientos individuales de NBTI y Cpd14. Las diferencias en los resultados podrían relacionarse a que en DMEM suplementado con dFBSi se está trabajando con un medio verdaderamente libre de nucleósidos y no disminuido de ellos, como en el OptiMEM.

Mirando el resultado global, se observa que las alteraciones en los niveles de nucleósidos provocados por bloqueos en sus vías metabólicas alteran de una u otra forma la interacción que se establece entre hCNT3 y QDPR. Las diferencias claras entre

los resultados en OptiMEM y DMEM hablan de que en estos medios los elementos diferenciales como nucleósidos o nucleobases disponibles, pueden tener un papel activo en la regulación, sin dejar atrás otros elementos como podrían ser folatos o quizás aminoácidos vinculados a las vías de síntesis. Ya que al ser el OptiMEM de formulación reservada, se dificulta profundizar en este tema.

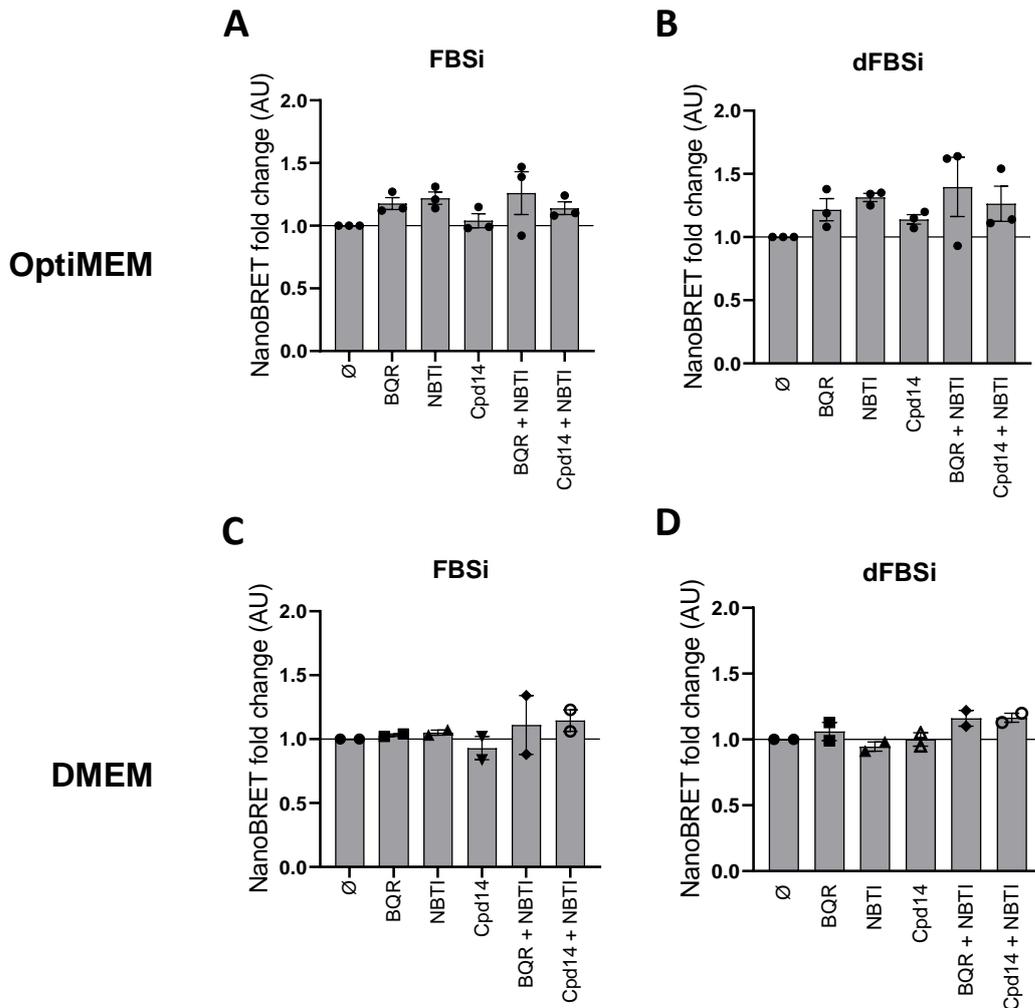


Figura 41. Implicación de los nucleósidos en la interacción entre QDPR y hCNT3. Las células HEK293 fueron transfectadas con 0,2 µg NL y 2 µg HT (ratio NL – HT 1:10) y mantenidas en medio OptiMEM (A-B) o DMEM (C-D). Los diferentes tratamientos con Cpd14 200 µM, BQR 10 µM y/o NBTI 10 µM se realizaron 20 horas post transfección, y durante 16-18 h. La interacción hCNT3:QDPR está expresada en unidades arbitrarias y los datos fueron normalizados al control sin tratamiento (∅ - Interacción basal). Se muestra la media ± SEM de 2 (DMEM) – 3 (OptiMEM) experimentos independientes. Significancia estadística por ANOVA de una vía al control sin tratamiento.

5. Papel de elementos del metabolismo de los folatos en la interacción entre hCNT3 y QDPR

Diferentes aminoácidos y derivados del THF son necesarios para cubrir la demanda de carbono y nitrógeno de las vías de biosíntesis de purinas y de pirimidinas (**Figura 42**). Para la síntesis del anillo de las purinas, formado a partir del PRPP, la vía necesita de los aminoácidos glutamina, glicina y aspartato para la formación del IMP. Además, para completar su demanda de carbono, para cada una de las reacciones catalizadas por las enzimas GART y PAICS es necesario un 10-formil-THF citosólico. Para su síntesis desde el THF, el 10-formil-THF requiere de una serina en una reacción que produce una glicina. La glutamina y el aspartato son aminoácidos compartidos por ambas vías biosintéticas. A diferencia de las purinas, el anillo de pirimidina se va formando a partir de la glutamina, del bicarbonato y del aspartato hasta formar el UMP. En esta vía también se requiere de 5,10-metilen-THF por la enzima TYMS para sintetizar dTMP a partir de dUMP. Dada la importancia de estos aminoácidos y derivados del THF para las vías de síntesis y por tanto de proliferación celular, sus vías metabólicas han sido consideradas por mucho tiempo como blancos terapéuticos clave en los tratamientos antitumorales.

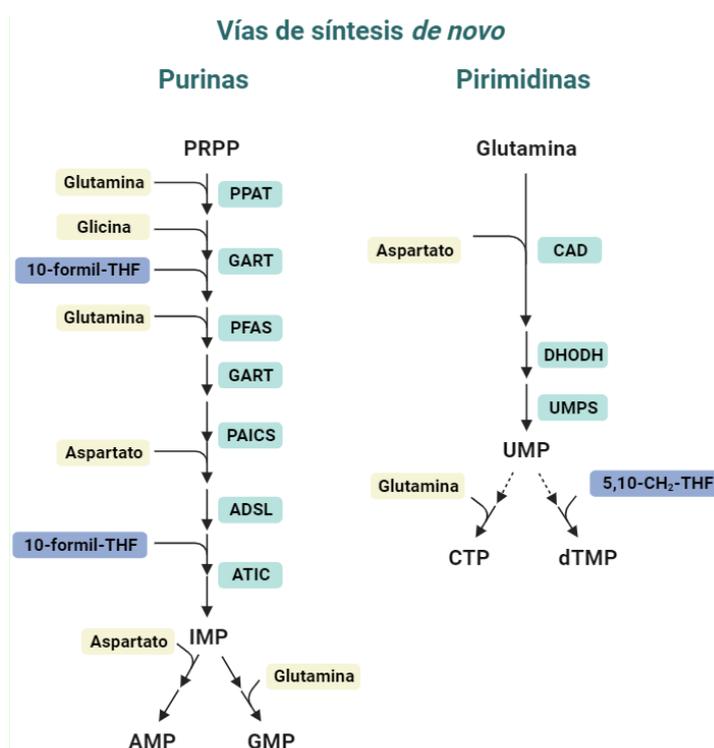


Figura 42. Esquemas de las vías de síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas. Enzimas de la vía de síntesis de las purinas: PPAT: fosforibosil pirofosfato amidotransferasa; GART: glicinamida ribonucleótido transformilasa; PFAS: fosforibosilformilglicinamida sintasa; PAICS: fosforibosil-aminoimidazole carboxilasa y fosforibosil-aminoimidazol-succinocarboxamida sintasa; ADSL: adenilsuccinato liasa; ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa; Enzimas de la vía síntesis de las pirimidinas: CAD: carbamoil fosfato sintasa 2, aspartato transcarbamilasa, dihidroorotasa; DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa; UMPS: uridina monofosfato sintasa.

El buen funcionamiento del metabolismo de los folatos condiciona la formación de cofactores donadores de unidades de 1C y por lo tanto, cualquier alteración de esta vía tendría efecto sobre la síntesis de los ácidos nucleicos. Además, estas dos vías también dependen de la disponibilidad de ciertos aminoácidos, por lo que cualquier cambio en el flujo de síntesis *de novo* de los nucleósidos podría también ser asociadas a variaciones en los niveles intracelulares de ellos. Es por esto que se decidió evaluar los niveles de aminoácidos vinculados a las vías de biosíntesis de purinas y de pirimidinas, así como también aminoácidos vinculados al metabolismo de un carbono en condiciones de sobreexpresión de QDPR y/o hCNT3 en células en cultivo. Además, se evaluaron los niveles de folatos en las mismas condiciones experimentales.

En primer lugar, se analizaron cambios en los niveles de los aminoácidos asociados a las vías de síntesis *de novo* de nucleósidos. Se transfectaron células HEK293 con QDPR y/o hCNT3 y los aminoácidos fueron cuantificados después de 48 horas. Se decidió corregir los valores crudos de cada uno a razón de los valores de fenilalanina para cada condición ya que las concentraciones de este aminoácido aromático son siempre muy estables independientemente del estatus metabólico y puede servir de control. Al analizar los niveles de aspartato, glutamina y glicina se observó que solo los dos últimos tuvieron una tendencia a bajar al sobreexpresar hCNT3 (**Figura 43**). Esta disminución podría relacionarse a una disminución de la tasa de síntesis por el favorecimiento de la vía de salvamento al aumentar la expresión del transportador. De los tres aminoácidos analizados, solo el aspartato, tuvo una disminución vinculada a la co-expresión de QDPR y hCNT3.

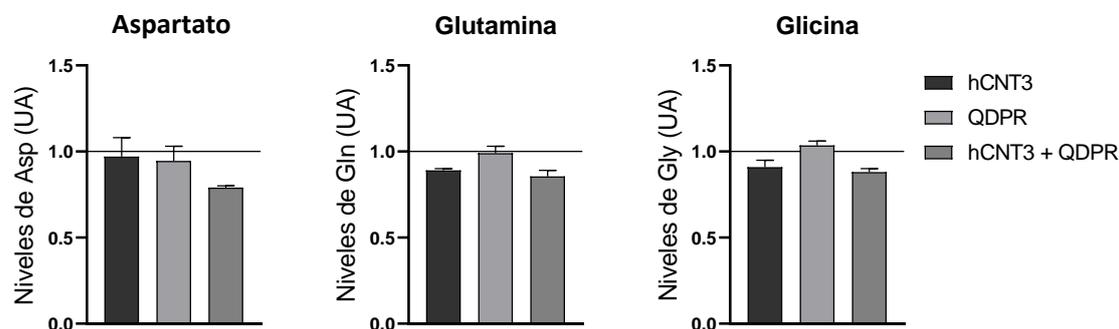


Figura 43. Análisis de aminoácidos implicados en el metabolismo de nucleótidos. Las células HEK293 fueron transfectadas con hCNT3 y/o QDPR durante 48 h. Se analizaron las cantidades de aspartato (Asp), glutamina (Gln) y glicina (Gly) por espectrometría de masas (UPLC-MS/MS). Cada replica corresponde a la media de triplicados. Se hizo una corrección de los datos por condición con respecto a los valores crudos de fenilalanina. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) con respecto al control pcDNA3.1 (representado con una línea). Se muestra la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

Seguidamente se analizaron los niveles de serina y metionina, dos aminoácidos cuyos niveles están relacionados al metabolismo de un carbono. La serina es convertida a glicina por la SHMT, generando en el proceso 5,10-metilen-THF. La serina es la mayor donadora de unidades de carbono para la formación de formato, además de ser precursora de la glicina, mientras que la metionina provee a la célula de grupos metilo para las reacciones de metilación. De las dos, solo se observó un leve aumento de la serina al sobreexpresar QDPR, pero no se vieron cambios asociados a la co-expresión de QDPR y hCNT3 con ninguno de los dos aminoácidos (**Figura 44**).

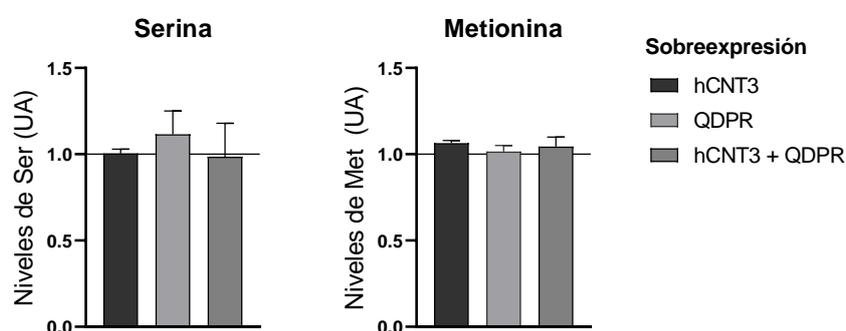


Figura 44. Análisis de aminoácidos relacionados al metabolismo de un carbono. Las células HEK293 fueron transfectadas con hCNT3 y/o QDPR durante 48 h. Se analizaron las cantidades de serina (Ser) y metionina (Met) por espectrometría de masas (UPLC-MS/MS). Cada replica corresponde a la media de triplicados. Se hizo una corrección de los datos por condición con respecto a los valores crudos de fenilalanina. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) con respecto al control pcDNA3.1 (representado con una línea). Se muestra la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

De todo el análisis de aminoácidos relacionados directamente a las vías que se estudian en esta tesis, el único que pareció tener un cambio vinculado a la sobreexpresión de QDPR y hCNT3 fue el aspartato. Este aminoácido, además de ser necesario para la síntesis de nucleótidos, está involucrado en la síntesis de arginina a partir de la citrulina en el ciclo de la urea (Keshet y col., 2018). Existe un tercer aminoácido involucrado en el ciclo, la ornitina, que también disminuyó (como el aspartato) al co-expresar QDPR y hCNT3.

Como se había dicho, además de los aminoácidos también fueron analizados los folatos, y se observó un aumento en el contenido de folatos intracelulares al sobreexpresar hCNT3 y QDPR de forma individual o juntos (**Figura 45A**). Al analizar los niveles de 5-MTHF se observó también un aumento en sus niveles (**Figura 45B**). 5-MTHF es la forma más reducida de las unidades de un carbono de folatos y su importancia metabólica radica en que es necesaria para la síntesis de SAM a través de la síntesis de metionina,

importante para las reacciones de metilación. De todo el análisis de metabolitos, este fue el resultado más consistente con datos previos generados en el grupo.

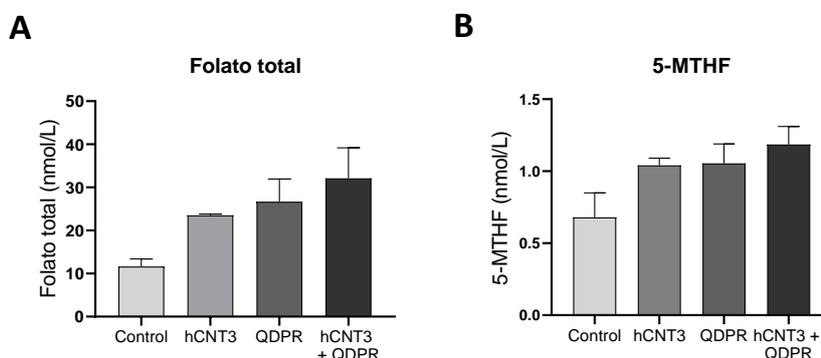


Figura 45. Expresión de QDPR y hCNT3 se relaciona con un aumento del 5-MTHF. Las células HEK293 fueron transfectadas con hCNT3 y/o QDPR durante 48 h. La cantidad de folato total (n=1) (A) y de 5-MTHF (B) fue analizada por HPLC. Cada replica corresponde a la media de triplicados. Se hizo una corrección de los datos con respecto a los valores crudos de fenilalanina por condición y los resultados se expresan en nmol/L. Se muestra la media \pm SEM de 2 experimentos independientes (B).

Como se observaron alteraciones en los niveles de folatos, en paralelo se quiso analizar los mensajeros de diferentes enzimas de su metabolismo, tanto citoplasmáticas como mitocondriales. MTHFD1 sintetiza 10-formil-THF en el citoplasma y, junto MTHFD2, son responsables de la síntesis de 5,10- metenil-THF y 5,10-metilen-THF en citoplasma y en mitocondria, respectivamente. Para ambas enzimas está descrita que su expresión está vinculada a una mala prognosis en diferentes tipos de cáncer, por aumentar la agresividad y la progresión tumoral (Lin y col., 2022; Xu y Vakoc 2017; Nilsson y col., 2014). La SHMT1 y SHMT2 catalizan la conversión reversible de serina y THF a glicina y 5,10-metilen-THF, necesario para la síntesis de dTMP. Por último, la DHFR, quien cataliza la reducción del ácido fólico y DHF a THF. Las células HEK293 fueron transfectadas con hCNT3 y QDPR, individualmente o juntas. De los genes analizados ninguno fue regulado al sobreexpresar o co-expresar hCNT3 y QDPR a excepción de la DHFR que, aunque no fue significativa, tuvo una regulación positiva como resultado de la co-transfección (**Figura 46**). La vía de los folatos es compleja y engloba gran número de reacciones enzimáticas indispensables para la integridad celular, por lo que su regulación a nivel transcripcional estará muy controlada para mantener estables los niveles de mensajeros. Aunque otra posibilidad es que no se observó regulación en MTHFD1, MTHFD2, SHMT1 ni SHMT2 porque se encuentran en puntos de la vía no relevantes en la interacción de hCNT3 y QDPR.

Las enzimas seleccionadas están más vinculadas a las reacciones de la vía que producen los folatos necesarios para la síntesis de purinas -principalmente- y pirimidinas (10-formil-THF y 5,10-metilen-THF, respectivamente). El 5,10-metilen-THF puede ser utilizado para la síntesis de dTMP y también de 5-MTHF. Una enzima que también podría ser evaluada es TYMS, sobre todo si se considera que de los dos tipos de nucleósidos, probablemente son las pirimidinas las más vinculadas a la interacción. Analizar la expresión de TYMS en co-transfección entre QDPR y hCNT3 permitiría saber si en presencia de las dos proteínas la vía se estaría desviando hacia la síntesis de pirimidinas preferentemente. Observando este punto de la vía de los folatos, estaría también la posibilidad de que el aumento observado en el 5-MTHF se relacionara a que el flujo metabólico estuviera enfocado hacia síntesis de metionina y que de alguna forma estuviese vinculada la expresión de QDPR y hCNT3 con procesos de metilación.

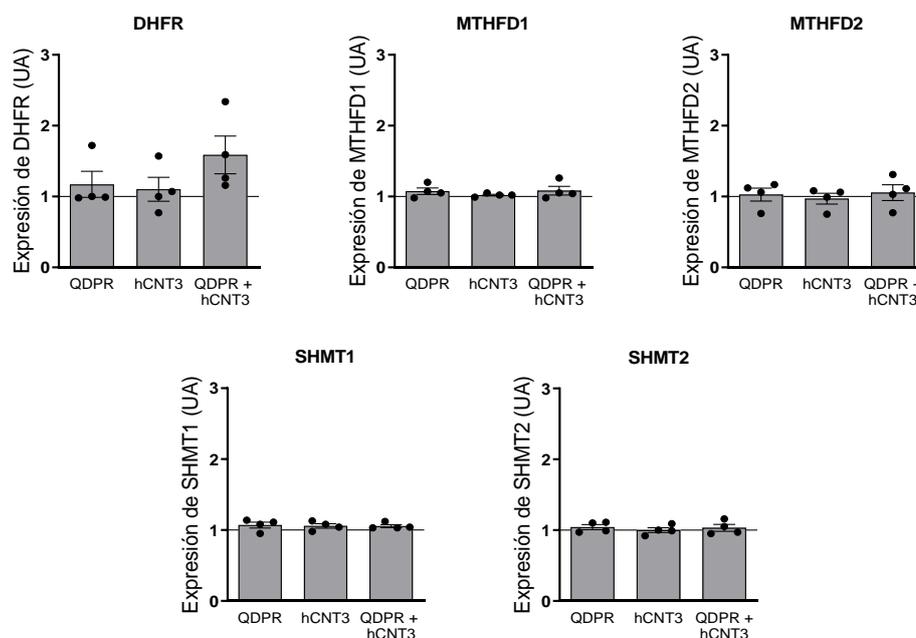


Figura 46.- Co-expresión de QDPR y hCNT3 aumentan el mensajero de DHFR. Las células HEK293 fueron transfectadas con QDPR y/o hCNT3. La expresión de ARNm de DHFR, MTHFD1, MTHFD2, SHMT1 y SHMT 2 se analizó por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) con respecto al control pcDNA3.1 (representado con una línea). Significancia estadística por ANOVA de una vía a control pcDNA3.1 (representado con una línea).

Los cambios relacionados a niveles de folatos intracelulares sumado a la regulación positiva de la DHFR al sobreexpresar hCNT3 junto a QDPR, hicieron que se considerara la disponibilidad de folatos, tanto extra- como intracelulares como un factor modulador de QDPR y hCNT3. Asumiendo la misma premisa que se discutió anteriormente, se

podría pensar que una variación en los niveles de folatos disponibles afectaría el metabolismo y esto podría tener impacto sobre las vías de salvamento a través de los transportadores de nucleósidos. Para abordar esto, se decidió utilizar dos estrategias experimentales. La primera fue mantener las células en un medio de cultivo libre de ácido fólico para ver si la disponibilidad extracelular podía regular los transportadores concentrativos y equilibrativos de nucleósidos y QDPR. La segunda fue directamente disminuir la cantidad de DHFR por silenciamiento génico. La posibilidad de una inhibición farmacológica con el antifolato MTX no fue considerada porque su efecto es muy amplio y toca varias vías metabólicas. Además de inhibir la DHFR, y así evitar la reducción de DHF a THF en el metabolismo de los folatos y de BH_2 a BH_4 en el metabolismo de las biopterinas, MTX puede inhibir la enzima del metabolismo de las purinas ATIC, así como también activar la vía JNK o inhibir de forma directa o indirecta la activación de la señalización vía NF κ B y JAK-STAT (Cronstein y Aune 2020).

Los medios de cultivo comerciales generalmente están suplementados con ácido fólico, es decir folato en su forma más oxidada. Según su formulación, el medio de cultivo DMEM está suplementado con 4 mg/L de ácido fólico y el medio OptiMEM con 5 mg/L, lo que equivale a concentraciones de 9 μ M y 11 μ M, respectivamente. Dada la disponibilidad comercial de medio RPMI-1640 sin ácido fólico, se decidió utilizarlo teniendo como control el mismo medio suplementado con ácido fólico a una concentración equivalente a la concentración del DMEM (9 μ M). Además, como el FBSi contiene folatos, se decidió suplementar el medio con FBSi dializado, carente de folatos. Así, las células fueron mantenidas en medio con ácido fólico o sin él durante 48 horas y luego se evaluó la expresión de QDPR y de los transportadores concentrativos y equilibrativos de nucleósidos. En ausencia de ácido fólico en el medio, QDPR no fue modulado (**Figura 47A**). A pesar de ser observaciones preliminares, de nuevo se observa una clara regulación de los transportadores concentrativos vinculados al transporte de pirimidinas. El mensajero de hCNT3 se vio aumentado, así como el de hCNT1. Este último resultado se asemeja mucho a la regulación observada para este transportador después de los diferentes tratamientos bloqueando las vías metabólicas de los nucleótidos (síntesis y recuperación) (Resultados – Apartado 2). hCNT2, hENT1 y hENT2 no tuvieron regulación alguna. Cuando se analizó el efecto de la ausencia de ácido fólico acompañado de la sobreexpresión de los transportadores hCNT3 y hCNT1, se observó que QDPR no pareció ser regulado en ninguna de las condiciones (**Figura 47B**). La expresión de hCNT1 fue muy disminuida por debajo del control al sobreexpresar hCNT3 en ausencia de ácido fólico. En el caso contrario, cuando se sobreexpresó hCNT1 la variabilidad fue muy alta y el resultado es difícil de interpretar.

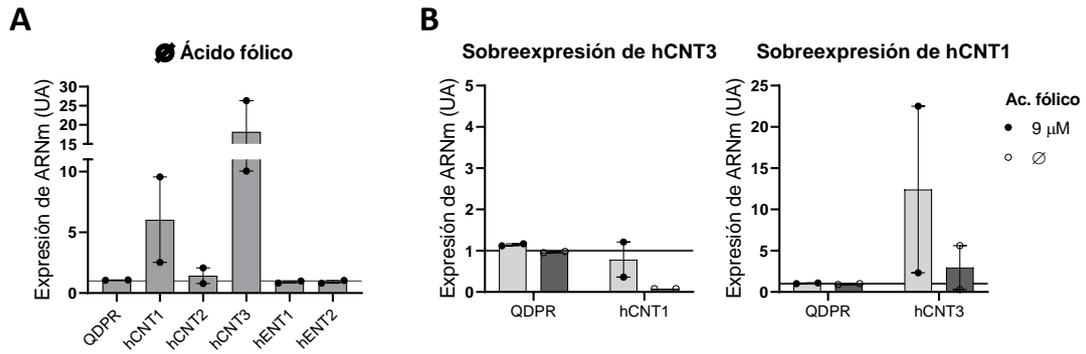


Figura 47.- Efecto de la depleción de ácido fólico extracelular sobre la regulación de QDPR y de los transportadores de nucleósidos. Las células HEK293 fueron transfectadas mantenidas en medio sin ácido fólico suplementado con dFBSi (A) después de haber sido transfectadas con (B) hCNT3 o hCNT1. La expresión de ARNm de QDPR, hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 y hENT2 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) con respecto al control con (A) ácido fólico o (B) pcDNA3.1 (controles representados con una línea).

Después, para analizar el posible papel regulador de la DHFR, la enzima fue silenciada y los mensajeros de QDPR, hCNTs y hENTs fueron analizados. Se observó que hCNT3 fue regulado positivamente de nuevo, así como también hCNT1, ambos de forma no significativa (**Figura 48A**). QDPR, hCNT2, así como los dos transportadores equilibrativos no fueron regulados con el silenciamiento de DHFR. Cuando se miró el efecto del silenciamiento acompañado de la sobreexpresión de los transportadores, QDPR fue modulado de forma significativa: al sobreexpresar hCNT3 se reguló positivamente, pero en el caso de sobreexpresar hCNT1 la regulación fue negativa, con respecto a los controles sin silenciar (**Figura 48B**). Por otra parte, el silenciamiento de DHFR no afectó la regulación propia de hCNT3 sobre el transcrito de hCNT1. Sin embargo, la disminución de DHFR pareció prevenir la regulación positiva de hCNT3 al sobreexpresar hCNT1.

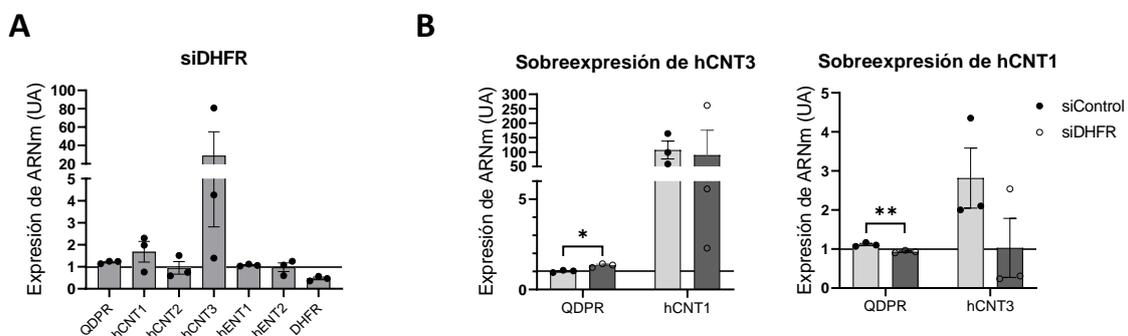


Figura 48.- Efecto del silenciamiento de la DHFR sobre la regulación de QDPR y de los transportadores de nucleósidos. Las células HEK293 fueron transfectadas con hCNT3, hCNT1 y/o siDHFR 100 nM durante 48 h y la expresión de ARNm de DHFR, QDPR, hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1

y hENT2 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) con respecto al control (A) siControl o (B) pcDNA3.1 (controles representados con una línea). Significancia estadística por ANOVA de una vía a control pcDNA3.1 (A) o T-Student para datos no pareados (B) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Si se comparan los resultados observados en las dos aproximaciones experimentales, hay que tener en consideración que en ambas existirá una disminución del THF. En ausencia de folatos disponibles en el medio, el THF disminuye por ausencia de sustrato para la DHFR mientras que en el silenciamiento de DHFR, el THF disminuye por la disminución en la cantidad de la enzima. Pero los experimentos de silenciamiento de DHFR se realizaron con medio de cultivo suplementado con FBSi. En el suero humano, el 5-MTHF es el folato activo que se encuentra en mayor cantidad (Pfeiffer y col., 2003; Leeming y col., 1990, Ratanasthien 1974). El 5-MTHF es utilizado únicamente para la síntesis de metionina generando en paralelo una molécula de THF, que luego puede continuar como aceptor de unidades de carbono en los siguientes pasos de la vía. Las diferencias en la regulación observadas al sobreexpresar los transportadores podrían vincularse a este hecho. Lo que parece claro es que la regulación positiva de hCNT3 está vinculada a cambios en las cantidades de THF.

Además de la regulación transcripcional, se evaluó el efecto del silenciamiento de la DHFR sobre la interacción entre hCNT3 y QDPR. Los ensayos NanoBRET fueron realizados en medio OptiMEM y DMEM suplementados con FBSi o con dFBSi para tener un amplio panorama ante cualquier modulación. Cada resultado de tratamiento con siDHFR fue referenciado a su control según el tipo de suero para facilitar el análisis y asegurar ver los cambios posibles entre las dos condiciones experimentales. Para cada medio de cultivo analizado, los resultados en cuanto a interacción fueron similares. En medio OptiMEM, enriquecido con timidina e hipoxantina, el silenciamiento de la DHFR en medio disminuido de nucleósidos pareció desfavorecer la interacción, de forma no significativa (**Figura 49A**). Al suplementar con suero completo, una disminución de DHFR en general no pareció afectar a la interacción. En cambio, en DMEM, indistintamente de la suplementación con suero, la interacción pareció verse afectada al silenciar la DHFR (**Figura 49B**). A pesar de ver leves cambios, el conjunto de resultados y la variabilidad vista en ellos impide relacionar una disminución de la DHFR con cambios en la interacción entre las proteínas hCNT3 y QDPR.

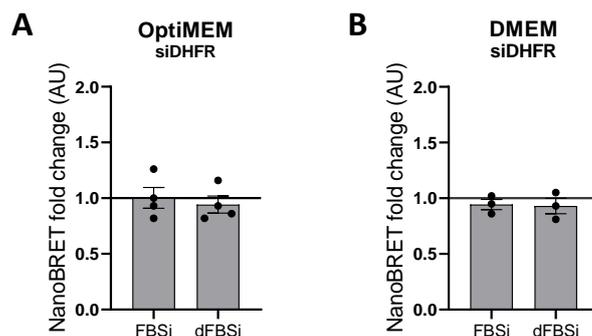


Figura 49. Implicación de la disponibilidad intracelular de folatos en la interacción entre QDPR y hCNT3. Las células HEK293 fueron co-transfectadas con 0,2 µg NL, 2 µg HT (Ratio NL – HT 1:10) y siDHFR o siControl 100nM y mantenidas en medio OptiMEM (A) o DMEM (B) durante 16-18 h. La interacción hCNT3:QDPR está expresada en unidades arbitrarias y los datos fueron normalizados al control sin tratamiento (Ø - Interacción basal según el tipo de FBSi). Se muestra la media ± SEM de 3-4 experimentos independientes. Significancia estadística determinada por T-Student no pareado al control.

Otra forma de abordar el papel de los folatos en la interacción sería poder trabajar con medio sin ácido fólico, como en los experimentos de regulación transcripcional. Hubiese sido interesante poder evaluar la integridad de la interacción en condiciones donde los folatos estuvieran ausentes, pero para ello es necesario contar con un medio de cultivo libre de ácido fólico y además adecuado para los ensayos NanoBRET. Para continuar con la modulación de los folatos y estudiar su papel en la interacción entre hCNT3 y QDPR se hace necesario mantener los parámetros muy controlados para evitar la variabilidad observada en las condiciones donde se observaron cambios evidentes, como en la regulación de hCNT3.

En este bloque de resultados se pudo estudiar la interacción establecida entre QDPR y hCNT3, tanto bioquímica como transcripcionalmente. El uso de un sistema que permite estudiar en células vivas las interacciones proteína-proteína permitió validar la interacción y facilitó el estudio de sus posibles elementos moduladores. Entre estos elementos estudiados - niveles de nucleósidos y niveles de folatos-, los cambios en la interacción más llamativos se observaron al modular los primeros, insinuando que los niveles de nucleósidos, principalmente intracelulares, son capaces de modular la interacción en diferentes condiciones fisiológicas. Además, a nivel transcripcional, QDPR es modulada positivamente al bloquearse la síntesis *de novo* de las pirimidinas y además, la sobreexpresión de QDPR modula positivamente al transportador concentrativo de alta afinidad hCNT3, implicado en la translocación de nucleósidos al interior de la célula. La regulación de la DHFR por el aumento de la expresión conjunta de QDPR y hCNT3 sugiere la posible implicación de vías que alimentan al propio metabolismo de los nucleósidos en el papel fisiológico de la interacción. La relación

entre el transportador hCNT3 y QDPR podría tener relevancia fisiológica en órganos como el riñón, donde la tasa de recaptación de nucleósidos es alta. Evaluando todos los resultados en conjunto, las tendencias observadas permiten pensar que el vínculo funcional entre el transportador hCNT3 y las vías metabólicas en las que participa QDPR, está relacionado con la disponibilidad de nucleósidos de purinas y pirimidinas disponibles en el entorno celular.

Bloque III: Implicaciones de la patología asociada a la deficiencia de QDPR en el metabolismo de nucleótidos.

De todas las deficiencias que pueden causar una disminución en los niveles de BH₄, una de las más severas es la deficiencia de QDPR. Quienes la padecen, además de sufrir hiperfenilalaninemia acompañada por una deficiencia de neurotransmisores, tienen alteraciones en los niveles de folatos en líquido cerebroespinal (Ponzzone y col., 2004). Para el tratamiento de las hiperfenilalaninemias “clásicas”, la dieta restringida en fenilalanina y la suplementación con BH₄ suelen ser eficientes. Sin embargo, no es el caso para la mayoría de los pacientes con deficiencia de QDPR y esto hizo pensar que alteraciones de otras rutas metabólicas podrían estar involucradas en la patología. Dado el vínculo entre el metabolismo de folatos y el metabolismo de nucleótidos, así como de la interacción demostrada entre hCNT3 y QDPR, se propuso la existencia de un vínculo entre el funcionamiento de las vías de salvamento de nucleósidos y la gravedad de la patología.

Las alteraciones en el reciclaje de purinas y pirimidinas se dan por deficiencias en las enzimas implicadas en su salvamento o degradación (Jurecka 2009). Muchas de estas patologías provocan cambios significativos en la excreción de purinas y pirimidinas en la orina y esta característica ha podido ser utilizada en el diagnóstico de patologías asociadas al mal funcionamiento del reciclaje de nucleósidos como el síndrome de Lesch Nyham (Lesch y Nyhan 1964; Seegmiller y col., 1967) o la gota (Watts 1964 Watts y col., 1964). En colaboración con el laboratorio del Dr. Rafael Artuch (Institut de Recerca Sant Joan de Déu - IRSJD) se obtuvieron los parámetros clínicos de dos pacientes pediátricos con deficiencia de QDPR, asociados a diferente grado de actividad enzimática. Como primer paso para estudiar este posible vínculo entre una deficiencia de QDPR con problemas en el salvamento de nucleósidos, se analizó la pirimidinuria en orina de cada uno de ellos. El primer paciente (Caso 1 - 44T>C en homocigosis (p.V15A)) presentaba una sustitución en la posición 15 de la secuencia aminoacídica, de una valina por una alanina. Este cambio de aminoácido viene dado por una mutación puntual de una base de timina por una de citosina en la posición 44 de la secuencia nucleotídica. Producto de esta mutación, el paciente presentaba una actividad de QDPR disminuida (0,3 U/g Hb - Valor de referencia: >1.5 U/g Hb) y una pirimidinuria normal. Un análisis de la secuencia y estructura de QDPR en el *Protein Data Bank* (PDB: [P09417](#)), permitió observar que el sitio de unión al cofactor NADH abarca de la posición 14 a la 38 de la cadena polipeptídica, siendo directamente participes de la unión con el

cofactor los residuos 16-17 y 19-22. Por lo tanto, la mutación descrita en este caso está ubicada en esta zona. A pesar de que los residuos implicados en la sustitución son ambos apolares, la diferencia en la cadena lateral y su ubicación en una lámina beta podría derivar en cambios estructurales locales, provocando una desestabilización del sitio de unión y eso a su vez a una alteración en la función catalítica de QDPR.

En el caso del segundo paciente (Caso 2 - c.295+2_295+3delTG / c.68G>A (p.G23D)), la deficiencia de la enzima QDPR viene producto de una doble mutación: la primera es una deleción de dos nucleótidos en las posiciones +2 y +3 a partir del nucleótido 295, acompañado de una sustitución en el nucleótido 68 de una guanina por una adenina, lo que se traduce en un cambio de residuos aminoacídicos en la estructura primaria, de una glicina en la posición 23 por un aspartato. Más allá de la sustitución, que supondría un cambio de un residuo polar sin carga por un residuo ácido cargado, en una zona fuera de la región vinculada al sitio de unión con el cofactor NADH, una deleción de dos nucleótidos significa un cambio de marco de lectura de la proteína. En concordancia a la mutación severa, este paciente tuvo una actividad de QDPR indetectable con una pirimidinuria alterada, teniendo valores de timina, pero también de dihidrouracilo y ácido ureidopropionico, metabolitos intermedios en la degradación del uracilo, aumentados unas dos veces por encima de los valores normales.

Las diferencias en las cantidades de pirimidinas o de productos de su degradación excretadas por orina, asociados además a diferentes grados de actividad de QDPR en estos pacientes, permitió hipotetizar que la carencia de actividad de la enzima podría estar relacionada a cambios en la regulación o en la actividad de hCNT3. En los ensayos mostrados previamente, al sobreexpresar la variante QDPR *wild type* (WT), se observó una regulación transcripcional en los dos transportadores concentrativos de pirimidinas. Tanto hCNT3 como hCNT1 son expresados en epitelio renal (Govindarajan y col., 2007; Errasti-Murugarren y col., 2007; Rodriguez-Mulero y col., 2005), y en el caso de hCNT1 se pudo vincular la deficiencia del transportador con niveles elevados de uridina y citidina en orina (Perez-Torras y col., 2019). Observaciones parecidas se hicieron en un modelo murino *Slc28a1*^{-/-}, donde se detectaron niveles elevados de los mismos nucleósidos, además de deoxypirimidinas, en orina (Persaud y col., 2023). Todos estos estudios demostraron que hCNT1 tiene un papel importante en la absorción renal de pirimidinas. Por otro lado, en un modelo murino con deficiencia de QDPR, las cantidades de CMP en el hígado fueron superiores en ratones *QDPR*^{-/-} con respecto a los controles sin la deficiencia. Además de expresarse en los túbulos proximales del riñón, CNT1 y CNT3 se expresan en células hepáticas (Godoy y col., 2014; Fernandez-Veledo y col., 2004). Por tanto, en el caso donde no es detectable la actividad de QDPR, podría existir

una captación de pirimidinas alterada, vinculada a cambios en la expresión o en la actividad de hCNT1 o hCNT3 y por eso existirían alteraciones en los niveles de pirimidina excretadas. Para estudiar esto, se pensó en un modelo biológico de deficiencia de QDPR que contara además con expresión endógena de hCNT3. Agrupar estas dos características en una misma línea celular serviría como una buena herramienta para la mejor comprensión del impacto fisiológico de la interacción.

Es por ello que una de las opciones a explorar fue el uso de linfocitos B inmortalizados, o células linfoblastoides B (B-LCLs). Las células sin QDPR o con la enzima disfuncional provendrían directamente de pacientes y, por tanto, la forma de obtención tendría también que ser lo menos invasiva posible. Los B-LCLs se obtienen a partir de sangre periférica y son inmortalizadas por infección con el virus de Epstein-Barr (Nilsson y col., 1971). Se sabe que las células CLL (*Chronic Lymphocytic Leukemia*) pueden expresar los mensajeros de los transportadores hENT1 y hENT2, así como de hCNT2 y hCNT3 (Molina-Arcas y col., 2003) y que, además, la población resistente a fludarabina expresa hCNT3 citosólico, aunque sin actividad en membrana plasmática (Fernandez-Calotti y Pastor-Anglada 2010; Mackey y col., 2005).

1. Regulación de hCNT3 por una variante patológica de QDPR

A partir de los dos pacientes descritos anteriormente, en SJD pudieron ser establecidas líneas celulares B- linfoblastoides (B-LCLs), además de B-LCLs controles provenientes de individuos sin la deficiencia de QDPR. Para caracterizar las nuevas células adquiridas, primero se realizó un análisis de expresión de QDPR, ya que al tener dos mutaciones diferentes y, en uno de los casos, bastante severa, existía la posibilidad de que las células provenientes de los pacientes expresaran una menor cantidad de proteína con respecto a los controles. Para ello, se analizaron 20 µg de proteína proveniente de un cultivo de 48 horas de cada una de las cuatro líneas B-LCLs. El análisis por western blot mostró que en el caso 1, correspondiente a las células con la sustitución V15A, hubo un nivel de expresión basal de proteína equivalente al de los dos controles A y B (**Figura 50A**) pero en el caso 2, posiblemente por tener una delección que cambia el marco de lectura de la proteína, esta no pudo ser detectada. Este resultado presentó dos panoramas, trabajar con el caso 1 implicaba tener un sistema con QDPR disfuncional (actividad reducida), mientras que trabajar con el caso 2 no solo

era tener un modelo sin actividad de QDPR, sino que también sin la expresión de la enzima.

Después del análisis de la expresión de proteína basal de QDPR, el siguiente paso fue analizar si estas células expresaban a nivel de ARN todos los transportadores de nucleósidos. Esto se hizo obteniendo ARN a partir del cultivo de las cuatro líneas de B-LCLs a diferentes tiempos de cultivo – 24, 48 y 72 horas – y analizando la expresión de mensajeros por RT-qPCR absoluta. Si bien las B-LCLs provenientes de todos los cultivos expresaron niveles altos de los mensajeros de hCNT2, hENT1 y hENT2 a todos los tiempos estudiados, los niveles de hCNT3 detectados fueron muy bajos a 24 horas y ausente en el resto de los tiempos analizados (**Figura 50B**). En el caso de hCNT1, los niveles de transcritos fueron igualmente bajos para todas las líneas celulares y condiciones cuantificadas.

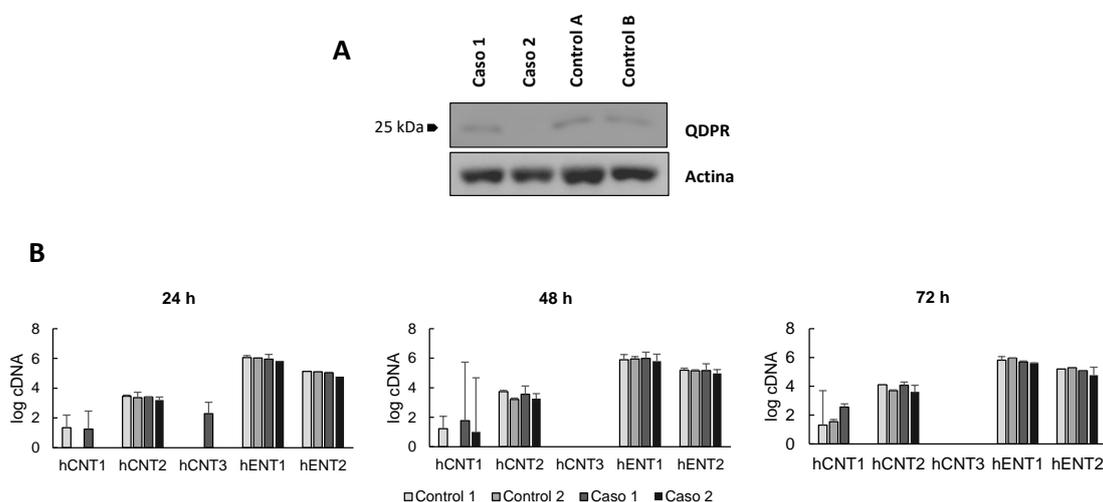


Figura 50. Caracterización de las células linfoblásticas B provenientes de pacientes con deficiencia de QDPR. A) Análisis por western blot de la expresión basal de la proteína QDPR de células linfoblásticas B provenientes de pacientes con deficiencia de QDPR (caso 1, caso2) o de pacientes control, sin la deficiencia (n=1). La proteína se obtuvo de cada una de las líneas celulares mantenidas en cultivo durante 48 h, y fueron cargados 20 µg de proteína para cada condición. B) Análisis de la expresión génica de los hCNTs y hENTs por RT-qPCR absoluta (n=1).

La ausencia de hCNT3 en las B-LCLs descartó la posibilidad de trabajar con estas células como un modelo más fisiológico para avanzar en el estudio de la interacción. Sin la expresión del mensajero, la idea de evaluar en las B-LCLs las modificaciones en regulación, expresión y función de hCNT3 en un *background* libre o disminuido de una QDPR funcional no fue posible. La siguiente opción que se manejó fue la de obtener ARN proveniente de células de descamación de orina donde se viera expresión

endógena de hCNT3. De lograrlo, se podría trabajar con muestras de pacientes obtenidas de forma no invasiva y que permitiría analizar el nivel de expresión del transportador en células desechadas a través del sistema urinario. Sin embargo, después de una primera aproximación extrayendo material genómico proveniente de controles sin deficiencia de QDPR no se pudieron obtener cantidades de ARN suficientes para llevar a cabo una cuantificación de transcritos del transportador. Sin embargo, este tipo de muestras sigue siendo relevante, ya que del sedimento de la orina se ha podido aislar y cultivar células con características epiteliales (Felix y col., 1980; Herz y col., 1979; Felix y col., 1979). Además, estos sedimentos son fuente de células madre (*Urine stem cells-USC*) (Pavathuparambil Abdul Manaph y col., 2018) originadas en riñón (Bharadwaj y col., 2013). La presencia de estas células pluripotentes abriría también la posibilidad de utilizar las iPSCs (*Inducible pluripotent stem cells*) y diferenciarlas en células epiteliales que si expresen hCNT3.

La opción inmediata fue seguir trabajando en el sistema de HEK293, donde se podrían sobreexpresar las variantes de QDPR que mencionamos anteriormente. Sin embargo, al no expresarse QDPR, se descartó la posibilidad de trabajar con el caso 2. Fue así como se planteó el clonamiento de QDPR con la mutación V15A en el vector de expresión pcDNA3.1 para poder llevar a cabo los estudios de regulación. Se comenzó intentando clonar QDPR directamente del cDNA proveniente del ARN extraído del cultivo celular de 48 horas utilizando *primers* específicos para el CDS, pero no hubo éxito. De modo que, seguidamente se decidió generar la mutación por mutagénesis sitio-dirigida a partir del molde de CDS de QDPR WT, previamente clonado en el vector pcDNA3.1. Ya generado el mutante QDPR V15A, se evaluó la expresión de la proteína en sobreexpresión y se comparó con los niveles de expresión de la variante WT. Para esto, las células HEK293 fueron transfectadas con QDPR WT o V15A. A pesar de que la cantidad de ADN utilizada para transfectar tanto el WT como el V15A fue la misma, se pudo observar cómo los niveles de proteína de la variante V15A fueron menores a la de los niveles de proteína del WT (**Figura 51A**). Incluso, sobreexpresando con mayor cantidad de vector, V15A no logra ser expresada al mismo nivel que la WT (**Figura 51B**). En cuanto a los niveles de hCNT3 en condiciones de sobreexpresión de QDPR V15A, a diferencia de la variante WT, se observó que la variante patogénica reguló negativamente al transportador, al compararlo con el control (**Figura 51C**). Sin embargo, hCNT1 no fue modulada, indicando que el impacto de la mutación es específico de la expresión de hCNT3.

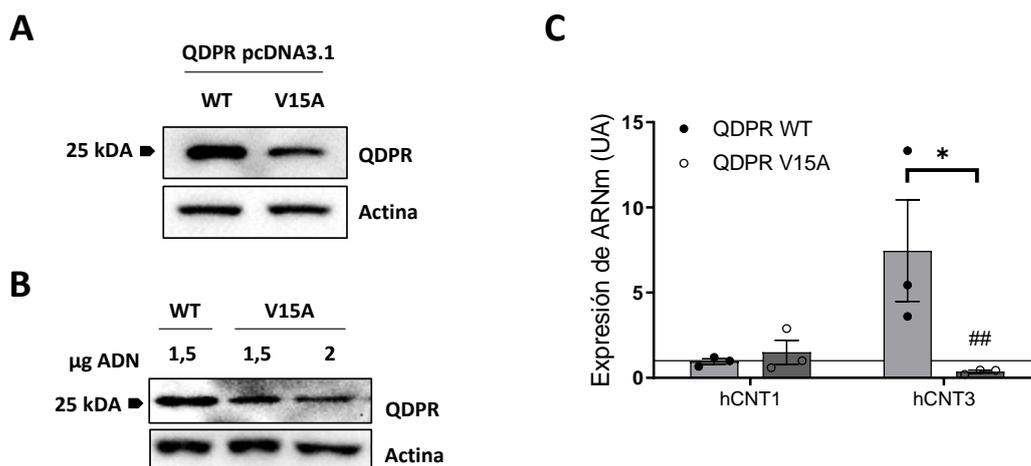


Figura 51. Regulación de hCNT3 por la variante patológica QDPR V15A. Las células HEK293 fueron transfectadas con (A) 1,5 µg o (B) 1,5 y 2 µg de ADN de QDPR WT o V15A. (A) Análisis de la expresión de proteína de QDPR WT o V15A por western blot, Se muestran imágenes representativas de 3-5 experimentos independientes. (C) La expresión de hCNT1 y hCNT3 fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes. Los resultados son referenciados al control pcDNA3.1 (representado con una línea) y están expresados en unidades arbitrarias (UA). Significancia estadística por ANOVA de dos vías entre grupos (* p < 0,05); T-Student no pareado a control pcDNA3.1 (representado con una línea) (## p < 0,05).

Con los resultados de western blot explicados anteriormente se comprobó que, a pesar de transfectar la misma cantidad de ADN, los niveles de proteína alcanzados por las dos variantes no fue la misma. Como la regulación de hCNT3 fue estudiada bajo estas mismas condiciones, existía la posibilidad de que la diferencia en la regulación de hCNT3 fuera producto de una diferencia en los niveles de proteína de QDPR. Fue por esto que, para corroborar el resultado, se decidió transfectar en células HEK293 diferentes cantidades de ADN de las dos variantes de QDPR, a modo de dosis respuesta. La expresión de QDPR WT y V15A fue analizada a nivel de proteína y de ARN con la finalidad de identificar las equivalencias de expresión con la de ADN transfectado. En primer lugar, se observó que ambas variantes alcanzaron niveles de expresión de ARN más o menos equivalentes a 1 y 1,5 µg de ADN transfectado (**Figura 52A**), por tanto, no parece que una inestabilidad del mensajero fuera la causa de la disminución de expresión de proteína. Sin embargo, las diferencias de expresión sí quedaron claras al analizar por western blot las mismas cantidades de vector transfectado (**Figura 52B**) reafirmando que la mutación V15A condiciona una menor cantidad de proteína. Pasando al análisis de la expresión del mensajero de hCNT3, se pudo ver como esta aumentaba a medida que incrementaba la cantidad de QDPR WT (**Figura 52C**) pero no lo hacía al sobreexpresar QDPR V15A, que más bien estuvo

regulado negativamente de forma significativa. Este resultado corroboró el resultado obtenido anteriormente. Cuando se analizó la expresión de hCNT1, se observó que 1,5 µg de ADN de la variante V15A la reguló negativamente y de forma significativa, resultado que fue diferente a lo observado previamente. Por último, se evaluó la expresión de la DHFR buscando posibles cambios en su expresión que pudieran ser vinculados a la expresión de la variante V15A. Sin embargo, al igual que ya se había visto con la variante WT, con esta variante patológica el mensajero de la DHFR tampoco se vio modulado (**Figura 52D**).

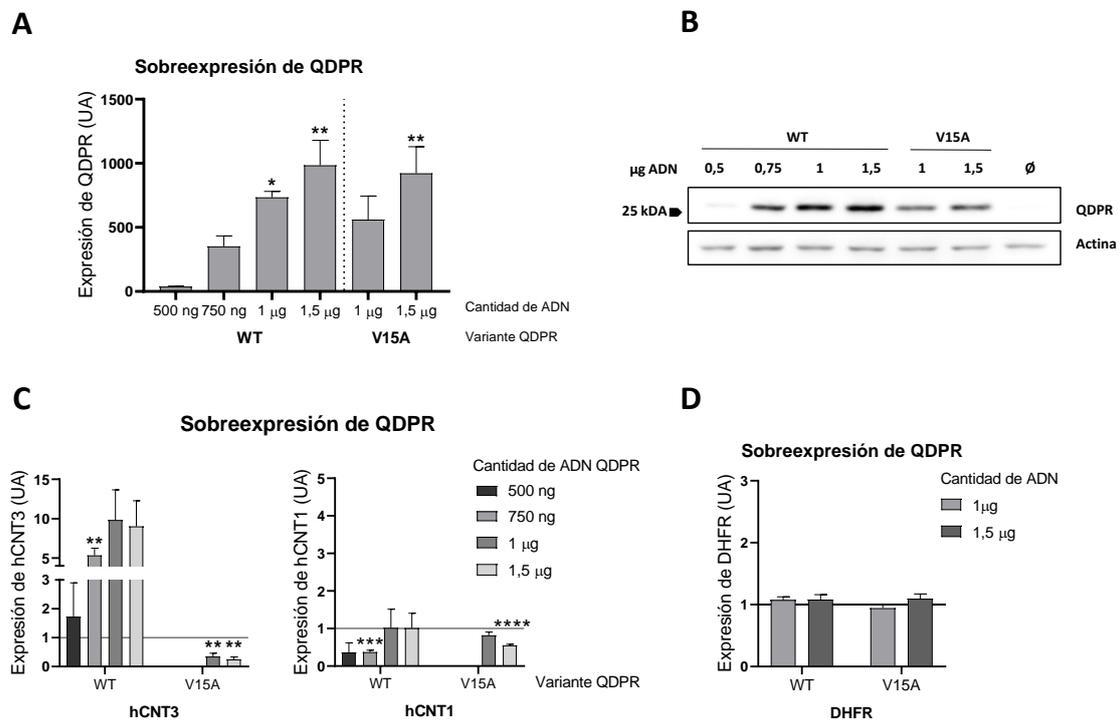


Figura 52. Estudio dosis-respuesta de la regulación de hCNT3 por QDPR. Las células HEK293 fueron transfectadas con diferentes cantidades de QDPR WT (500 ng, 750 ng, 1 µg o 1,5 µg) y V15A (1 µg, 1,5 µg). (A) La expresión de QDPR se analizó por RT-qPCR (B) La expresión de proteína fue analizada por western blot, revelando QDPR. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. La expresión de mensajeros de (C) hCNT3, hCNT1 o (D) DHFR fue analizada por RT-qPCR. Se muestra la media ± SEM de 3 experimentos independientes. Los resultados son referenciados al control pcDNA3.1 (representado con una línea) y están expresados en unidades arbitrarias (UA). Significancia estadística por ANOVA de una vía a control pcDNA3.1 (* p < 0,05; ** p < 0,01) o T-Student para datos no pareados a control pcDNA3.1 (** p < 0,01; *** p < 0,005; **** p < 0,001).

Durante la tesis de la Dra. Catalina Perelló, en el grupo se estudió la posible activación del promotor de hCNT3 por una activación del factor de transcripción NFκB. El factor nuclear -κB (NFκB) es un factor de transcripción que media las respuestas inflamatorias e inmunes y está vinculado a las respuestas al estrés, regulación de la proliferación

celular y apoptosis (Oeckinghaus y Ghosh 2009). En mamíferos, la familia está formada por cinco tipos de monómeros (p65/RelA, RelB, cRel, p50 y p52) que, para cumplir con su función de factores de transcripción, oligomerizan entre ellos pudiendo formar hetero u homodímeros. Al ser un factor de transcripción que regula la expresión de gran número de genes, su actividad está finamente regulada (Mitchell y col., 2016).

Los elementos reguladores de hCNT3 aún no han sido identificados. Sin embargo, se ha considerado que este transportador puede ser regulado por elementos de NFκB ya que trabajos previos de la Dra. Estefanía Muñoz estudiando la regulación transcripcional de hCNT3 por la aldosterona en la línea celular de riñón HK-2, permitieron identificar un sitio de unión a NFκB a 30 kb del 5' del promotor de hCNT3 (resultados no publicados del grupo) y observó que las subunidades RelB y p50 fueron los elementos de NFκB que interaccionaban con el promotor. En la tesis de la Dra. Perelló se midieron los niveles de expresión de los diferentes miembros de la familia NFκB/Rel en muestras donde se había observado un aumento en la expresión de la proteína de hCNT3. Esto fue hecho con la finalidad de correlacionar este último a cambios de expresión en alguna subunidad de NFκB. Sin embargo, no se pudieron observar cambios claros. Además, se analizó la actividad luciferasa de diferentes regiones del promotor de hCNT3 en presencia de QDPR. Para esto se trabajó con construcciones de diferentes regiones del promotor del gen de hCNT3 (*SLC28A3*) ubicadas a 30 kb del inicio de la transcripción, y expresadas en paralelo con QDPR. Entre las regiones estudiadas se incluyó una con una mutación en el sitio de unión de NFκB tratando de inducir cambios en la actividad del promotor en el caso de que NFκB fuera el factor de transcripción involucrado en la regulación de hCNT3. En general, en estos resultados no se observaron cambios en la activación del promotor entre los controles y la condición de sobreexpresión de QDPR. De todas las regiones analizadas en células HEK293, la que tuvo más actividad (25% más) con respecto al control no incluyó la región donde se ubica el sitio de unión de los NFκB, sugiriendo que en estas células la regulación podría venir dada por la interacción con otro factor de transcripción.

Sin embargo, sabiendo de la presencia del sitio de unión a NFκB en la región promotora de hCNT3, se aprovechó el hecho de tener dos variantes de QDPR con efectos contrarios sobre la regulación de hCNT3 para analizar los elementos del factor de transcripción por western blot y ver si la expresión de cada una de las variantes generaba diferencias en la expresión de las subunidades del factor de transcripción. Se analizaron los niveles de proteína de las subunidades RelB y p50, así como también de p65 y c-Rel, en las muestras de células HEK293 transfectadas con diferentes cantidades de ADN de las variantes WT y V15A de QDPR. De forma general, no se observaron

cambios evidentes en la expresión de ninguna de las subunidades de NFκB asociados a la expresión de cualquiera de las variantes de QDPR (**Figura 53**). Por tanto, estos resultados apoyarían a los resultados previos del grupo. En la línea celular HEK293 los NFκB no participarían en la regulación de hCNT3 y se tendría que estudiar entonces qué otros factores de transcripción podrían estar uniéndose a la región. El estudio de los elementos reguladores de hCNT3 y la confirmación de las regiones de interacción de estos elementos con el promotor podría ampliarse con ensayos de luciferasa utilizando la construcción que tuvo actividad y comparando la activación en presencia de la variante patológica que ya se conoce que genera una regulación negativa de hCNT3.

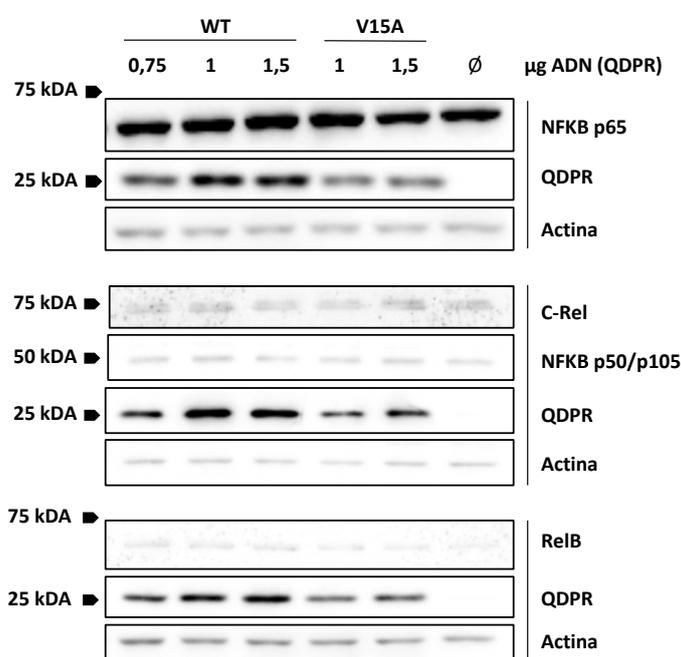


Figura 53. Regulación de elementos de NFκB al sobreexpresar QDPR. Las células HEK293 fueron transfectadas con diferentes cantidades de QDPR WT (750 ng, 1 μg o 1,5 μg) y V15A (1 μg o 1,5 μg) durante 48 h. La expresión de proteína fue analizada por western blot, revelando NFκB p65, NFκB p50/p105, c-Rel, RelB y QDPR. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

2.- Estudio de la interacción entre hCNT3 y QDPR V15A

La presencia de mutaciones en QDPR y los posibles cambios conformacionales locales que esta mutación produce podrían tener un impacto no solo sobre la regulación de hCNT3, sino también sobre la interacción con él. Estructuralmente, no han sido estudiadas las regiones de interacción entre las dos proteínas y se desconoce si el cambio de residuo en la posición 15 de la cadena implicaría un cambio conformacional

que afectara directa o indirectamente el sitio de unión con hCNT3. Como se comentó previamente, la mutación que se estudia está ubicada dentro de la región de unión del monómero de QDPR al cofactor NADH y está asociada a una actividad disminuida de la enzima. Para estudiar si la mutación V15A produce modificaciones en la interacción entre QDPR y hCNT3 se clonó esta variante patológica en el vector de NanoBRET pHTN, el mismo vector en el cual la variante WT tuvo mejor mBU en los ensayos con hCNT3.

Antes de iniciar el estudio de la interacción entre hCNT3 y la variante V15A, se propuso comparar la ubicación subcelular de esta con respecto a la WT para evaluar si las diferencias observadas en cuanto a regulación del transportador estaban acompañadas de una modificación en la distribución subcelular de la proteína. Para esto, se aprovechó la presencia del tag HT en los constructos generados para los ensayos NanoBRET. El utilizar un anticuerpo α -HT permitió evitar el marcaje de QDPR endógeno que pudiese enmascarar la localización de la variante V15A. Para estos estudios, las células HeLa fueron transfectadas con QDPR WT o V15A pHTN y, después de la fijación, las células transfectadas fueron marcadas con un anticuerpo contra el HT y un anticuerpo secundario Alexa 549, marcando así a las proteínas QDPR sobreexpresadas en rojo. Tal y como se observó en las imágenes de microscopía confocal, la distribución de V15A con respecto al WT fue muy similar, mostrándose un patrón difuso en todo el citoplasma, correspondiente a la ubicación citoplasmática descrita para la proteína (**Figura 54**).

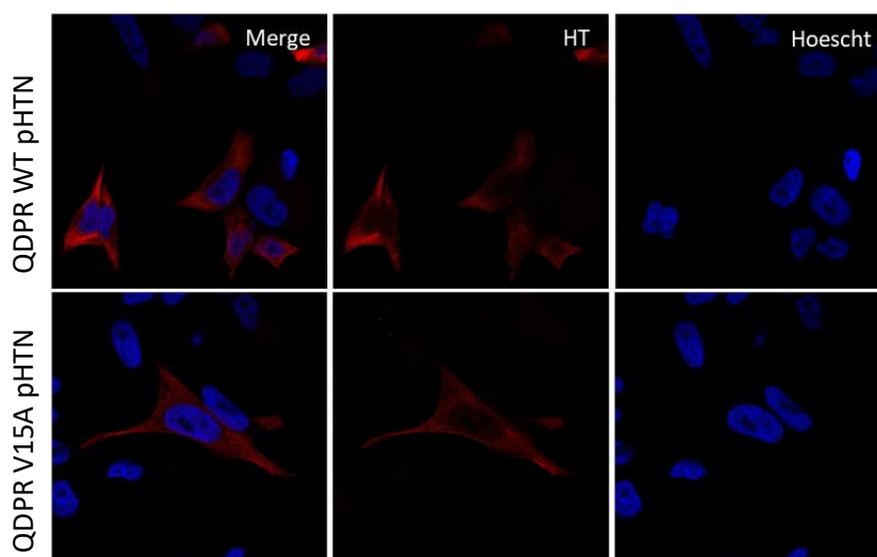


Figura 54. Ubicación subcelular de QDPR V15A. Las variantes QDPR WT y V15A (pHTN) fueron sobreexpresadas en células HeLa durante 48 h. Después de la fijación, el marcaje se hizo con α -HT (Rb) y luego se marcó en rojo con un α -Rb Alexa 549. Se muestra una imagen representativa de 2-3 experimentos independientes. Imágenes tomadas a 40x.

Habiendo verificado que la distribución de WT y V15A no se vio afectada al ser sobreexpresadas solas, nos propusimos estudiar si esta distribución se veía alterada de forma diferencial en una condición de co-expresión con hCNT3. En este caso, las células HeLa se co-transfectaron con una de las dos variantes de QDPR pHTN y hCNT3 pNLF1-N. Las células se marcaron con anticuerpos contra HT o NL, utilizando como anticuerpos secundarios unos conjugados con Alexa 549 o Alexa 488, respectivamente. De esta forma, QDPR WT o V15A se ve marcado de color rojo y hCNT3 en color verde.

En la co-expresión de QDPR WT y hCNT3 se observa que QDPR mantiene su distribución citoplasmática mientras que hCNT3 se ubica en la membrana plasmática (**Figura 55A**). Además, se pudo ver un marcaje perinuclear punteado correspondiente a hCNT3 que, como se observó también al sobreexpresar solo hCNT3 pNLF1-N, no es atribuible a la co-expresión de ambas proteínas. También tiene un leve marcaje difuso en el citoplasma. En el caso de la co-expresión de la variante V15A y hCNT3, se observó una distribución similar de V15A con respecto a la WT (**Figura 55B**), aunque en algunas células pudo verse un marcaje nuclear no muy claro. hCNT3 mantuvo su localización en membrana con el mismo marcaje punteado descrito anteriormente. En ambos casos se observó cierta colocalización entre QDPR y hCNT3 en compartimientos intracelulares y en regiones muy cercanas a la membrana celular. En conjunto, estos resultados de inmunofluorescencia sugieren que tanto la variante WT como la V15A de QDPR parecen colocalizar con hCNT3 y que, además, la mutación V15A no induce una redistribución de la enzima y tampoco pareciera modificar la distribución de hCNT3 en membrana plasmática.

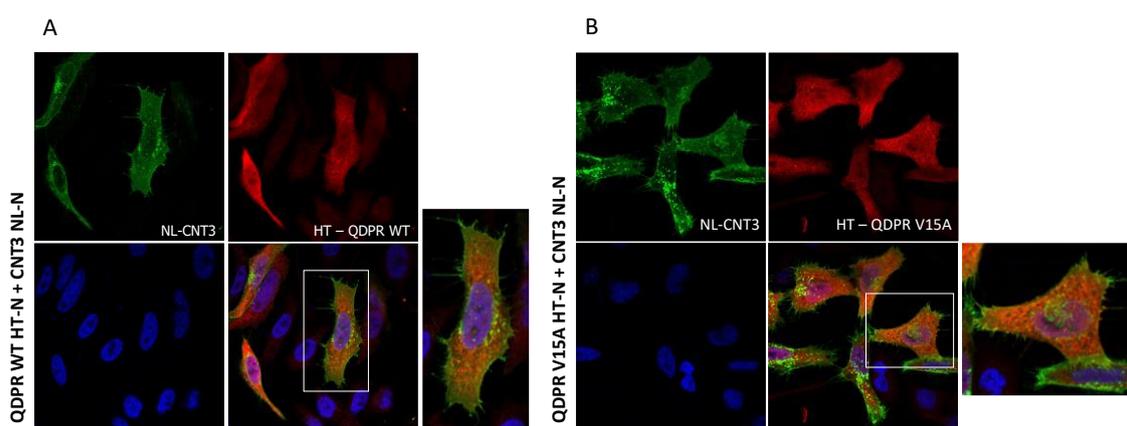


Figura 55. Ubicación subcelular de QDPR WT o V15A en co-expresión con hCNT3. Las variantes QDPR WT y V15A (pHTN) y hCNT3 (pNLF1-N) fueron co-expresadas en células HeLa durante 48 h. Se utilizaron anticuerpos α -HT o α -NL. QDPR (WT y V15A) se marcó en color rojo (HT) y hCNT3 en color verde (NL) con α -Rb Alexa 549 o α -m Alexa 488, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. Imágenes tomadas a 40x.

Habiendo caracterizado la distribución de las dos variantes de QDPR, así como la de hCNT3 en co-expresión con ellas, se pasó al estudio de interacción bioquímica. Se hicieron ensayos NanoBRET con las proteínas de fusión QDPR WT y hCNT3, acompañadas de la nueva construcción QDPR V15A pHTN. En primer lugar, y para determinar si la interacción de hCNT3 con la variante V15A se daba de forma específica, se realizó una prueba de saturación de donador - DSA. Con ambas variantes de QDPR se partió de la misma cantidad de ADN para mantener la ratio donador-aceptor igual a la que fue validada previamente en los ensayos de interacción de hCNT3:QDPR-WT (1:100). El ensayo DSA mostró que, de forma similar a la interacción de hCNT3 con el WT, la interacción hCNT3:QDPR V15A fue específica (**Figura 56A**). Luego, se quiso estudiar si la mutación V15A provocaba cambios en la interacción de QDPR con hCNT3. Entre las condiciones establecidas para estos ensayos también se tomó en cuenta la presencia o no de nucleósidos en el medio (suplementando el medio de cultivo con FBSi o dFBSi, respectivamente) para establecer si la respuesta a la disponibilidad de nucleósidos se veía alterada. Según esta primera aproximación, los mBU obtenidos con el mutante en medio con y sin nucleósidos fueron inferiores a los obtenidos con el WT en las mismas condiciones (**Figura 56B**).

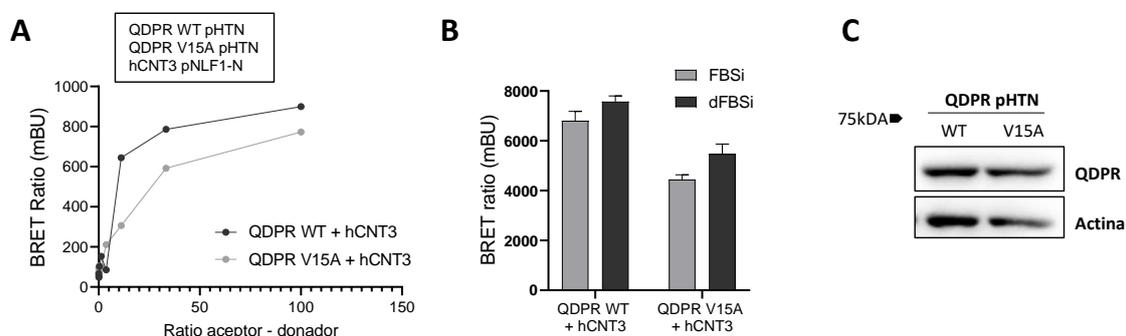


Figura 56. Interacción entre QDPR V15A y hCNT3. (A) Prueba de saturación del donador de los pares hCNT3 pNLF1-N:QDPR WT HT-N y hCNT3 pNLF1-N:QDPR V15A HT-N, con transfección de la misma cantidad de ADN de partida para ambas variantes de QDPR (ratio donador – aceptor 1:100) (n=1). (B) Ensayo NanoBRET en células HEK293 transfecando con 0,2 µg NL y 2 µg HT (QDPR WT y V15A) (ratio NL – HT 1:10), mantenidas con medio OptiMEM suplementado con FBSi o dFBSi durante 18-20 h. La interacción hCNT3:QDPR está expresada en BRET ratio (mBU). Se representan los resultados de la media ± SEM de 2 experimentos independientes. (C) Análisis de la expresión de proteína de QDPR WT o V15A pHTN, a partir de la transfección de 1,5 µg de ADN. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

Este resultado permitiría deducir que, aunque existe especificidad de interacción entre hCNT3 y QDPR V15A, esta estaría reducida con respecto a la interacción basal que puede ser detectada entre hCNT3 y QDPR WT, es decir, la mutación disminuiría la

interacción hCNT3:QDPR. Sin embargo, considerando que tal y como se ha mostrado anteriormente, la transfección de cantidades comparables de DNA de ambas variantes no da lugar a cantidades equivalentes de proteína, estos resultados debían ser validados analizando la proteína expresada por cada variante en estos vectores de expresión del sistema NanoBRET. Como V15A clonado en pcDNA3.1 expresaba niveles más bajos de proteína que el WT, se quiso comparar el nivel de proteína de las dos proteínas de fusión con el tag HT. Para ello, las células HEK293 fueron transfectadas con la misma cantidad de vector de ambas variantes de QDPR y los niveles de proteína fueron analizados por western blot. El resultado permitió determinar que, aun cuando hubo un poco menos de diferencia de expresión entre las variantes, la expresión de QDPR V15A pHTN tuvo una cantidad de proteína disminuida con respecto al WT (**Figura 56C**), al igual que en la sobreexpresión con el ADN clonado en el vector de expresión pcDNA3.1 (**Figura 51A**). Esto hizo que se replanteara la idea de estudiar la interacción partiendo de cantidades iguales de ADN de las dos variantes ya que, en las células HEK293, esto se traduciría a una cantidad de proteína diferente y no se podría saber si la variación en la interacción que se observó en los primeros NanoBRET venía dada o no por los diferentes niveles de expresión.

Partiendo de esto, se trató de conseguir una cantidad proteína de QDPR WT que fuera equivalente a la cantidad máxima expresada por QDPR V15A, en co-expresión con hCNT3. Es decir, se hizo necesario ajustar las cantidades de ADN de transfección del WT para obtener la misma cantidad de proteína que del mutante. A partir de los ensayos de dosis-respuesta con diferentes μg de vector QDPR se pudieron determinar las cantidades de ADN necesarias para tener cantidades relativas iguales de proteínas. De estos ensayos se estimó que 750 ng del WT parecían ser más o menos equivalentes a 1,5 μg de QDPR V15A pcDNA3.1 (**Figura 52**). Habiendo hecho la elección de las cantidades de partida de ADN, se volvió a evaluar la especificidad de la interacción hCNT3:QDPR V15A mediante un DSA con los ajustes antes comentados para QDPR WT. En este caso la cantidad de donador NL (hCNT3 pNLF1-N) se mantuvo igual, lo que hizo que las ratios donador-aceptor para los pares -según la variante de QDPR- fueran diferentes (ratio máxima de 1:1000 para hCNT3:V15A y de 1:350 para hCNT3:WT), pero manteniendo las cantidades de proteína equivalentes. En paralelo al DSA y como control, se analizó la cantidad de proteína QDPR HT en las ratios 1:1000 y 1:350 de V15A y WT, respectivamente, utilizando un ligando de HT permeable y fluorescente (Janelia 546) que permitió marcar *in vivo* a las proteínas y luego analizar los QDPR fusión con HT por SDS-PAGE.

Los resultados del DSA después de igualar las cantidades relativas de aceptor (HT), mostraron de nuevo ambas curvas como hipérbola, confirmando que hay especificidad en la interacción en ambos casos (**Figura 57B**). También se observó que, al igual que en el DSA anterior, hCNT3:QDPR WT alcanzó mBUs más altos que los de hCNT3:QDPR V15A. Sin embargo, a pesar de esta última observación, el diseño experimental del DSA no permite determinar si existe más o menos interacción. Además, en este punto habría que resaltar que, a pesar de haber hecho el ajuste en las cantidades de QDPR, las cantidades de proteína relativa producida por cada una de las variantes nunca logró ser exactamente la misma (**Figura 57B**), con lo que en cada experimento solo se logró acercar las cantidades lo más posible, sin que estas llegaran a ser iguales. Este factor se tomó en consideración para analizar los ensayos de interacción posteriores.

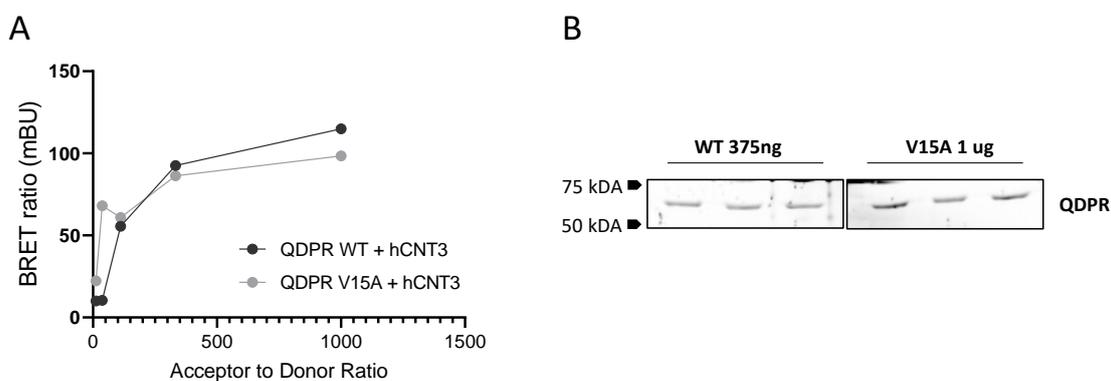


Figura 57. Optimización de los ensayos de interacción entre QDPR V15A y hCNT3. (A) Prueba de saturación del donador de los pares hCNT3 pNLF1-N:QDPR WT HT-N y hCNT3 pNLF1-N:QDPR V15A HT-N, con transfección de 1 μ g de ADN de la variante V15A y 375 ng de la variante WT. (B) Control de la expresión de QDPR WT (375 ng) y V15A (1 μ g) del DSA a la ratio 1:1000, por triplicado. El tag HT fue marcado con el ligando fluorescente Janelia 546 (n=1).

Los ensayos de NanoBRET entre hCNT3 y las dos variantes de QDPR, ya habiendo ajustado las cantidades relativas de proteína, se hicieron en paralelo en los medios de cultivo OptiMEM y DMEM. Además, cada medio fue suplementado con FBSi o dFBSi para así evaluar, aparte de la posible modulación diferencial generada por el enriquecimiento del medio, el papel de la presencia o no de nucleósidos. Este ensayo se realizó con el objetivo de identificar en paralelo si algún cambio en la interacción hCNT3:QDPR V15A respondía de manera similar a hCNT3:QDPR-WT a los factores extracelulares.

Indistintamente de la suplementación del medio extracelular, en casi todas las condiciones analizadas hCNT3:QDPR V15A obtuvo mBUs significativamente superiores a los de hCNT3:QDPR-WT (**Figura 58**), lo que sería indicativo de una mayor interacción. La interacción de hCNT3 con el mutante no pareció estar condicionada por la presencia o no de nucleósidos en el medio extracelular en el medio enriquecido OptiMEM pero si en DMEM, siendo este una respuesta muy parecida a la de hCNT3:QDPR-WT. Entonces, si se consideran los ajustes que tuvieron que ser hechos en cuanto a la cantidad de proteína y que, a pesar de esto, no se logró llegar a una equivalencia exacta, se podría afirmar que la interacción entre hCNT3 y las dos variantes de QDPR es condicionada por la cantidad relativa de proteína más que por cualquier elemento presente o no en el medio extracelular o por la misma mutación en sí. Si bien en las B-LCLs la expresión basal de QDPR WT y V15 fue igual, en otros tejidos esto podría no ser así. En riñón o hígado, donde la expresión de las diferentes variantes de QDPR podría ser diferente entre ellas, asociar la interacción al grado de expresión de QDPR podría ser fisiológicamente relevante.

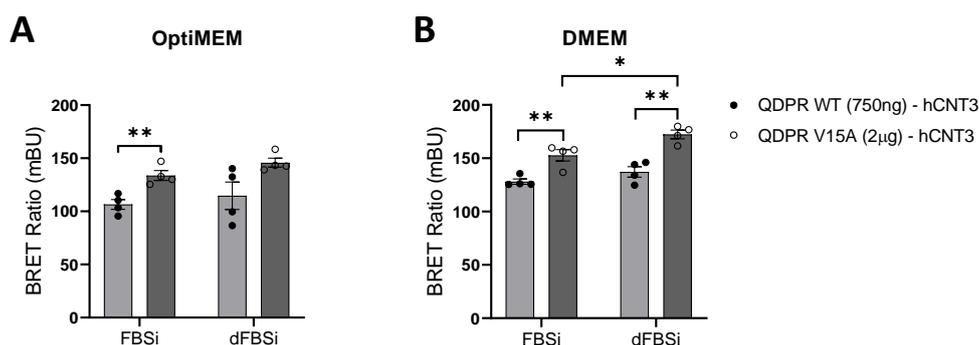


Figura 58. Interacción entre hCNT3 y QDPR V15A. Ensayo NanoBRET en células HEK293 transfeciendo con 0,2 µg NL y 2 µg (V15A) o 750 ng (WT) de QDPR HT (ratio NL – HT 1:10 y 1:3,75 respectivamente), mantenidas con medio OptiMEM o DMEM suplementado con FBSi o dFBSi durante 18-20 h. La interacción hCNT3:QDPR está expresada en BRET ratio (mBU). Se representan los resultados de la media ± SEM de 4 experimentos independientes. Significancia estadística por T- Student no pareado (* p < 0,05; **p < 0,01).

Del experimento anterior se pudieron establecer los valores basales para cada interacción, en medio con o sin nucleósidos. Si bien se confirmó que la interacción de hCNT3 con QDPR puede ser mantenida a pesar de la presencia de la mutación V15A, se quiso determinar si la interacción respondía del mismo modo que la WT a estrés metabólico provocado por un desbalance en los niveles de nucleósidos intracelulares y que este pudiera alterar la interacción basal preestablecida. Para ello se retomó la idea de modular los niveles internos relativos de nucleósidos alterando las vías de síntesis y recuperación de purinas y pirimidinas por inhibición de enzimas de las vías biosintéticas

o por bloqueo del transportador hENT1, respectivamente. Los estudios de interacción se realizaron en ambos medios de cultivo, OptiMEM y DMEM, por NanoBRET. Para facilitar la comparación, los resultados de cada tratamiento fueron referenciados a su control sin tratamiento (\emptyset), por grupo (FBSi o dFBSi).

Primero se analizó el efecto de cada uno de los tratamientos en el medio enriquecido OptiMEM (**Figura 59A-B**). En líneas generales, el bloqueo de las vías de síntesis y/o de recuperación de nucleósidos generó respuestas similares indistintamente de si el medio extracelular estaba o no enriquecido con nucleósidos, tal y como en el estudio de interacción con la variante WT. En el caso de la modulación en medio DMEM (**Figura 59C-D**), no hubo mayor diferencia en la interacción según el tratamiento, indistintamente de la suplementación del medio de cultivo. Habría que resaltar solo el hecho de que en un medio de cultivo DMEM, indistintamente de la presencia de nucleósidos extracelulares, la interacción se ve levemente favorecida cuando se inhibe la síntesis *de novo* de pirimidinas, en un resultado claramente diferente a lo observado con la interacción entre hCNT3 y QDPR WT con el mismo medio (**Figura 41**). Como resultados individuales, es complicado sacar conclusiones del efecto de cada tratamiento de forma aislada. Sin embargo, al observar los resultados en conjunto, una vez más se hace claro que la interacción entre hCNT3 y QDPR es sensible a cambios metabólicos provocados por desbalances en los niveles generales de nucleósidos internos y externos, más que a los niveles de un nucleósido en particular. Estos experimentos previos sientan las bases para plantear estrategias experimentales que permitan profundizar en el papel biológico de la interacción.

Siguiendo en la línea de posibles elementos reguladores, se pasó a evaluar el efecto de la modulación de folatos intracelulares sobre la interacción hCNT3:QDPR V15A, silenciando la enzima DHFR. Se observó como en medio OptiMEM el silenciamiento de la DHFR y por consiguiente el desbalance de los niveles de folatos intracelulares, no moduló la interacción hCNT3:QDPR V15A (**Figura 60A**), dando un resultado parecido al observado con la variante WT (**Figura 49**). Sin embargo, en medio DMEM, el bloqueo del metabolismo de los folatos por silenciamiento de la DHFR desfavoreció significativamente la interacción, tanto en presencia como en ausencia de nucleósidos extracelulares (**Figura 60B**). Comparando este resultado con el obtenido con la variante WT (**Figura 49B**), se puede pensar que la interacción de la variante patológica V15A con hCNT3, es más sensible a los niveles de folatos.

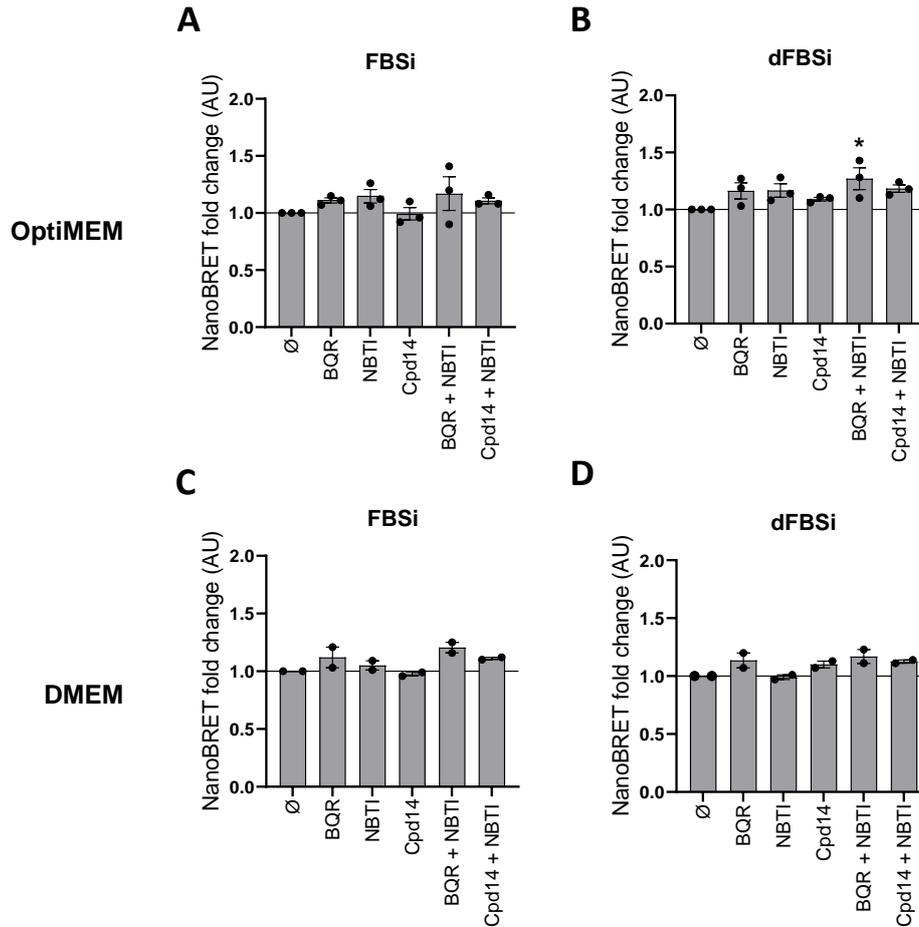


Figura 59. Implicación de los nucleósidos en la interacción entre QDPR V15A y hCNT3. Las células HEK293 fueron transfectadas con 0,2 µg NL y 2 µg HT (ratio NL – HT 1:10) y mantenidas en medio (A-B) OptiMEM o (C-D) DMEM. Los diferentes tratamientos con Cpd14 200 µM, BQR 10 µM y/o NBTI 10 µM se realizaron 20 horas postransfección, y durante 16-18 h. La interacción hCNT3:QDPR está expresada en unidades arbitrarias y los datos fueron normalizados al control sin tratamiento (∅ - Interacción basal). Se muestra la media ± SEM de 2-3 experimentos independientes. Significancia estadística por ANOVA de una vía al control sin tratamiento.

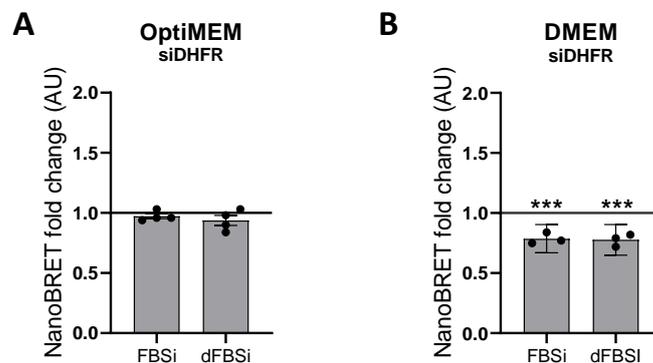


Figura 60. Implicación de la disponibilidad intracelular de folatos en la interacción entre QDPR V15A y hCNT3. Las células HEK293 fueron co-transfectadas con 0,2 µg NL, 2 µg HT (ratio NL – HT 1:10) y siDHFR o siControl 100nM y mantenidas en medio OptiMEM (A) o DMEM (B) con FBSi o dFBSi durante 16-18 h. La interacción hCNT3:QDPR está expresada en unidades arbitrarias y los datos fueron normalizados al control sin tratamiento (∅ - Interacción basal según el tipo de FBSi representado con una

línea). Se muestra la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. Significancia estadística determinada por T-Student no pareado al control (***) $p < 0,005$).

Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que al tener una QDPR funcional, esta podría compensar la ausencia de DHFR previniendo la degradación del THF. Sin embargo, las bajas cantidades de THF por una disminución de DHFR, una QDPR disfuncional no sería capaz de reestablecerlas y este desbalance de folatos generaría una disminución de la interacción con el transportador.

Todos los resultados obtenidos en este bloque sugieren una vinculación de la regulación de hCNT3 con el nivel de actividad de QDPR. En uno de los casos clínicos estudiados, el aumento de la pirimidinuria se corresponde a una pérdida de la expresión de QDPR. En el otro caso, a pesar de no haber pirimidinuria alterada, la expresión de la variante patológica disminuyó la expresión del transportador hCNT3. Además, la sobreexpresión de esa variante disminuyó la expresión de hCNT1, teniendo un efecto igual que al sobreexpresar la variante WT, pero estos resultados no fueron constantes entre experimentos y por tanto fueron poco conclusivos.

La actividad de QDPR parece condicionar al tipo de regulación transcripcional que ella tiene sobre hCNT3. Por esto se podría postular que los niveles de folatos son moduladores de esta interacción, y que esto a su vez podría tener un impacto sobre el flujo de las vías metabólicas de síntesis *de novo* de los nucleósidos. De hecho, el desfavorecimiento de la interacción entre hCNT3 y la variante patológica V15A al silenciar la DHFR en medio DMEM puso en manifiesto la importancia de los niveles de folatos internos cuando QDPR tiene una actividad alterada. Además, en un desbalance de folatos, la modulación diferencial de la interacción que ocurre en un medio sencillo como es el DMEM con respecto a un medio que tiene suplementación con una nucleobase y timidina (OptiMEM), refuerza la idea de que los niveles de nucleósidos participan de alguna manera en el sistema.

Discusión general

La biodisponibilidad de nucleótidos depende tanto de la síntesis *de novo* como de las reacciones de salvamento que permiten la recuperación de nucleobases y nucleósidos. Es en las vías de salvamento donde el transporte de nucleósidos a través de la membrana celular representa un proceso indispensable para asegurar sus niveles óptimos. A pesar de su importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular y de que su expresión está alterada en distintas patologías, los mecanismos que regulan la expresión, localización y función de los transportadores concentrativos de nucleósidos todavía no son bien conocidos.

En los organismos eucariotas, la reprogramación metabólica según las necesidades nutricionales de la célula puede ser estimulada por factores de crecimiento presentes en el medio extracelular (Graves, Guy, Kozlowski, Huang, Lazarowski, Pope, Collins, dahlstrand, Shelton Earp III, y col., 2000; Smith y Buchanan 1979). La disponibilidad de nutrientes provoca una señalización que puede llevar a la célula por vías catabólicas de producción de energía o a procesos anabólicos de biosíntesis de componentes celulares. Los niveles de estos nutrientes regulan el metabolismo celular y permite a la célula adaptarse a un ambiente cambiante. Durante procesos con alta tasa de proliferación y crecimiento, la necesidad de nutrientes como aminoácidos, lípidos, glucosa y nucleótidos está aumentada. En proliferación, es necesaria la duplicación del ADN por lo que las vías de síntesis *de novo* aportan una mayor cantidad de nucleótidos para cubrir la demanda celular. Por el contrario, en las células en reposo son los procesos de recuperación y de salvamento los que predominan, siendo suficientes para cubrir los requerimientos celulares sin un gasto elevado de energía. Para mantener la integridad del material genómico y evitar la mala incorporación de nucleótidos en la cadena de ADN naciente, es importante el mantenimiento de un balance correcto en las cantidades de nucleótidos de purinas y de pirimidinas (Mathews 2015). Esto es logrado gracias al estricto control en la regulación del catabolismo y biosíntesis de estas moléculas, pero también por el trabajo en conjunto con las vías de recuperación en donde los transportadores, y en concreto, los CNTs parecen tener un papel indispensable.

Los CNTs permiten la internalización de los nucleósidos obtenidos de la dieta, los producidos por la degradación de los ácidos nucleicos o los sintetizados *de novo* en otros tejidos. Estos transportadores también median la translocación de derivados de nucleósidos ampliamente utilizados en terapias antivirales y antitumorales, por lo que el estudio de los elementos reguladores que puedan modular su expresión ha sido de gran interés, sobre todo por el hecho de que la expresión de estos transportadores, principalmente hCNT1, está ampliamente perdida en muchos tipos de cáncer (Boces-

Pascual y col., 2021; Urtasun y col., 2017; Mohelnikova-Duchonova y col., 2013; Martínez-Becerra y col., 2012; Farre y col., 2004; Dragan y col., 2000). En el área del metabolismo de los nucleósidos, sigue sin estar claro cuáles son las señales ambientales que regulan los transportadores a nivel transcripcional y postraduccionales y tampoco es claro si la detección del desbalance de purinas y pirimidinas lleva a una regulación de los niveles de nucleótidos mediada por las vías de salvamento. Se ha podido ver que la disponibilidad de nucleósidos puede alterar el perfil de expresión de los transportadores en el intestino delgado en ratas (Valdes y col., 2000), por lo que se pudiera pensar que problemas en la recaptación o en la síntesis *de novo*, que alteren los niveles óptimos de purinas o de pirimidinas, sería suficiente para iniciar una respuesta que permitiera a la célula compensar de alguna forma el desbalance. Ya en el grupo (Tesis Dra. Liska Caviedes) se realizó una primera aproximación en el estudio del efecto de la disponibilidad de nucleósidos extracelulares sobre la expresión de los transportadores concentrativos y equilibrativos, pero también sobre la proteína PAICS, una enzima de la vía de síntesis *de novo* de purinas. En ese trabajo se observó que de los dos tipos de transportadores fueron los concentrativos los que parecieron tener mayor regulación al modular los niveles de nucleósidos de forma individual y global. Por ello en esta tesis se buscó profundizar en los factores que podrían afectar la expresión y la ubicación, y por tanto función, de los transportadores, utilizando un planteamiento experimental que pudiera generar estrés en las distintas vías del metabolismo de los nucleósidos. Los resultados obtenidos mostraron que las alteraciones generadas en distintos puntos de las vías básicamente inducían modulaciones en la expresión del ARN mensajero de los transportadores concentrativos de pirimidinas, hCNT1 y hCNT3. Estos resultados cobran sentido si consideramos que, en el caso de las pirimidinas, son los nucleósidos los que se recuperan mayoritariamente, mientras que, para las purinas son las nucleobases.

Como se comentó anteriormente, para hCNT1 fueron descritas características de transceptor (Perez-Torras y col., 2013), es decir, que aparte de su papel como transportador, hCNT1 puede señalizar y su restitución en líneas celulares de cáncer y en tumores sólidos genera una reversión de las características tumorales (Perez-Torras y col., 2013). Esta particularidad es de relevancia ya que la regulación positiva de hCNT1 podría indicar que este transportador se relaciona a la modulación de respuestas celulares ante cambios en la disponibilidad o niveles relativos de nucleósidos. Al ser un transportador específico de pirimidinas se podría esperar que su expresión estuviese vinculada principalmente a la asequibilidad de pirimidinas en el medio y que no necesariamente tendría que responder a cambios en los niveles de purinas. Sin

embargo, por electrofisiología se ha observado que la adenosina a altas concentraciones puede unirse a hCNT1 e inhibir casi por completo las corrientes generadas por ella en la captación de uridina (Larrayoz y col., 2004), sin que exista una captación eficiente de adenosina por el ortólogo de CNT1 en rata (Fang y col., 1996; Yao y col., 1996). Por lo tanto, que hCNT1 pueda ser modulado por las alteraciones en los niveles de purinas intracelulares permite sugerir que de alguna forma la interacción entre hCNT1 y al menos una purina como la adenosina podría tener relevancia en la señalización mediada por el transportador. Esta observación puede ser reforzada por el hecho de que la regulación transcripcional del transportador, en presencia de otro transportador de purinas y pirimidinas (hCNT3), no pareció ir acorde a una compensación según el tipo de nucleósido que estuviera deficiente en el medio, sino que más bien su regulación pareció responder a otro tipo de estímulo.

De los tres transportadores concentrativos, hCNT3 es el que puede translocar tanto purinas como pirimidinas y estaría en la posición de poder captar cualquiera de los dos tipos de nucleósidos en función de las necesidades celulares. Si se piensa en una co-regulación basada en la compensación de funciones, hCNT3 sería el mejor candidato para realizarla. En nuestro modelo, hCNT3 es modulado transcripcionalmente en función del tipo de nucleósido del que haya deficiencia, pero solo en presencia de hCNT1 sugiriendo que, por su versatilidad, la expresión de hCNT3 sería modulada para devolver la homeostasis a sistema. Esta particularidad de que sea regulado en co-expresión con hCNT1 llevaría a que la regulación de hCNT3 podría responder a cambios metabólicos relacionados a alguna de las actividades de hCNT1 como transportador o como transceptor. La relación observada en la expresión de hCNT1 y hCNT3, además de la capacidad para formar hetero-oligómeros que se observó entre estos dos transportadores, abre la posibilidad de que, si ocurre en condiciones fisiológicas, estas estructuras hetero-oligoméricas generen cambios en la actividad o en la señalización, en caso de hCNT1. Por esto, viendo los cambios transcripcionales, habría que profundizar en el impacto funcional de una co-regulación entre hCNT1 y hCNT3 y validar si el aumento de mensajeros se traduce en un aumento de la proteína en la membrana plasmática, ya que al final este será el factor determinante para validar la co-regulación que promueva las vías de salvamento o modificaciones en la actividad. Además, para poder validar completamente el impacto de los niveles de nucleósidos en todos los cambios observados, habrá que medir los niveles de nucleós(t)idos y desoxinucleós(t)idos en cada una de las condiciones experimentales.

Una parte importante de la regulación del metabolismo de los nucleótidos está establecida por la capacidad de oligomerizar de algunas de sus enzimas, pero también

de la formación de complejos proteicos entre ellas, lo que asegura el control y el correcto flujo de las vías. Además de estas interacciones, la ubicación de las enzimas dentro de redes proteicas funcionales permite tener el panorama claro de todas sus posibles funciones. Diferentes predicciones de interacción de proteínas de las vías de síntesis *de novo* de nucleótidos muestran posibles vínculos, no solo entre enzimas de la misma vía (ej. DHODH y CAD), sino que relacionan a enzimas de la biosíntesis de purinas con las de pirimidinas, e incluso con enzimas vinculadas a otras vías metabólicas, indicando que el balance y la interacción entre ellas sería necesaria para la viabilidad celular (Wang y col., 2021; Chitrakar y col., 2017). Por ejemplo, la enzima PAICS interactúa con enzimas del metabolismo de 1C (He y col., 2022), y también forma parte del purinosoma, donde su presencia es necesaria para la formación de este complejo multiproteico (Baresova y col., 2016; Kyoung y col., 2015; Deng y col., 2012). Por otra parte, la DHODH, enzima mitocondrial de la vía de síntesis *de novo* de las pirimidinas, está vinculada al sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Boukalova y col., 2020) y su inhibición compromete la integridad de la membrana mitocondrial y de la cadena respiratoria (Jiang y col., 2023; Fang y col., 2013). En nuestros resultados, la reducción de la expresión de PAICS y de DHODH disminuyó la expresión de hCNT3 a nivel transcripcional, y este efecto fue diferente a cuando las enzimas fueron inhibidas farmacológicamente. Analizando esto podemos suponer que la expresión de este transportador es sensible al impacto metabólico que supone que las enzimas de las vías de síntesis de nucleósidos no establezcan las interacciones que les corresponden y por tanto se rompan las redes funcionales en donde ellas participan.

Así como las enzimas del metabolismo de nucleótidos interactúan funcionalmente con enzimas de otras vías y estas interacciones controlan procesos vitales para la célula, la vinculación funcional de los hCNTs con diferentes proteínas podría relacionarlos a nuevas funciones que permitan el control de los niveles de nucleósidos intracelulares. El estudio del interactoma de hCNT3 permitió identificar a la enzima QDPR como una de sus proteínas de interacción. QDPR es una enzima encargada del reciclaje de BH₄ a partir de qBH₂ en el metabolismo de las biopterinas, pero también puede prevenir la oxidación y degradación del THF (Zheng y col., 2018). En primera instancia, se podría pensar en dos razones funcionales que justifiquen la interacción entre QDPR y hCNT3. La primera sería la posibilidad de que hCNT3 estuviese relacionado a los niveles de biopterinas y a su transporte. La segunda, que esta interacción estuviese vinculada de alguna forma al metabolismo de los nucleótidos, a través de la participación de QDPR en el mantenimiento de los niveles de folatos activos.

La deficiencia de QDPR causa hiperfenilalaninemia y una disminución en los niveles de neurotransmisores y folatos (Ponzzone y col., 2004) que deriva en serios problemas neurológicos. El producto enzimático de la QDPR, el BH₄, se utiliza para tratar la fenilcetonuria y otras enfermedades producidas por una deficiencia de BH₄, siendo administrado hoy en día su análogo sintético, la sapropterina (Opladen y col., 2020; Kure y col., 1999; Scaub y col., 1978; Bartholomé y col., 1977). En este proyecto se manejó la posibilidad de que hCNT3 pudiera transportar biopterinas, tal y como ha sido descrito para los hENTS (Ohashi y col., 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron que hCNT3 no transporta BH₂ a pH fisiológico, aunque queda la posibilidad de que este transporte fuera condicionado al pH si se considera que hCNT3 puede acoplar el transporte de nucleósidos a un co-transporte de protones (H⁺) bajo una selectividad diferente (Smith y col., 2005).

Después de la administración de BH₄ de forma oral, el cofactor es rápidamente oxidado, por lo que entra a la célula en forma de BH₂. Una vez dentro de la célula es reducido de nuevo a BH₄, en una reacción dependiente de la DHFR (Sawabe 2004). La sepiapterina (SP) es la forma dihidro de la 6-lactoil-tetrahydropterina, precursora inmediata de la BH₄ en la vía de síntesis *de novo*. En el modelo de ratón, se da una acumulación de BH₄ en tejido hepático y renal 30 minutos después de la administración intraperitoneal o endovenosa de SP o de BH₄ (Sawabe 2004; Hoshiga y col., 1993). En el caso de la administración oral, el pico de acumulación es alrededor de las 2 horas postratamiento (Sawabe 2004). Por otro lado, en cultivo celular, la acumulación de BH₄ por captación de SP puede ser lineal entre 1 hora (Yamamoto y col., 1996) y hasta 3 horas, en un proceso que parece depender de la dosis y del tiempo de incubación (Sawabe y col., 2008). El aumento de los niveles intracelulares de BH₄ después de la administración de SP se observa de forma general en células de diferentes orígenes como células epiteliales, endoteliales y otras células no epiteliales como de leucemia basofílica de rata, células B-pancreáticas de hámster y eritrocitos (Sawabe y col., 2008). En nuestro modelo de HEK293 (**Figura 61**), cuando se administró BH₂ o BH₄ se observó una disminución de la interacción de QDPR y hCNT3 a 1 hora después del tratamiento, pero ya a 2 horas no se observaron cambios. Pudiendo asumir que a 1 hora no se ha llegado al máximo de acumulación de BH₄, significaría que en ese tiempo aún está siendo reducido el BH₂ en un proceso dependiente de DHFR. Que esta actividad afecte a la interacción entre QDPR y hCNT3 podría significar que la interacción se modula porque QDPR tendría que ocuparse en el restablecimiento del THF mientras DHFR está secuestrada en otra actividad, lo que la desvincularía de la formación de THF. Sin

embargo, la importancia fisiológica de este cambio de actividad quedaría por ser determinada.

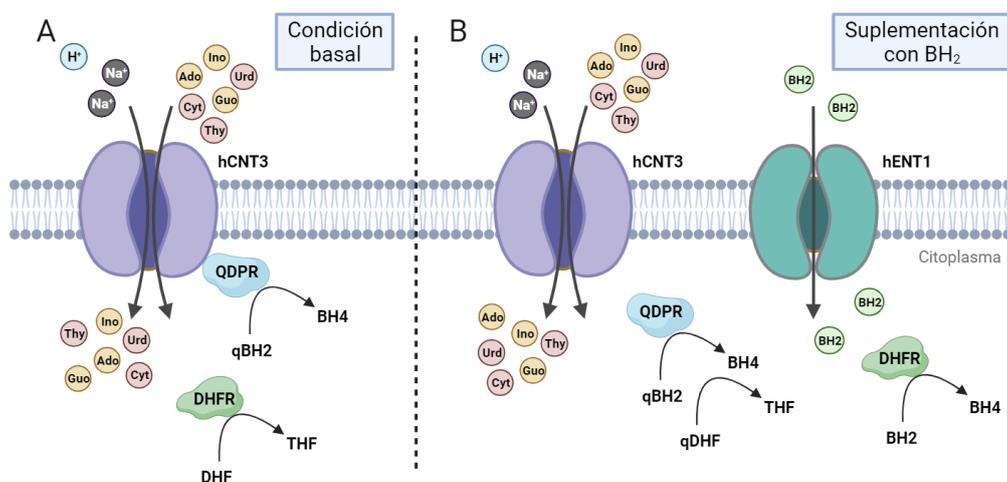


Figura 61.- Modelo de pteridinas como moduladoras de la interacción entre hCNT3 y QDPR. (A) En condiciones basales, la interacción entre hCNT3 y QDPR se mantiene, haya o no presencia de nucleósidos extracelulares. (B) Sin embargo, ante la suplementación con una pteridina, la BH₂ puede ser translocada a la célula a través de hENT1, y luego convertida a BH₄ por la DHFR. La enzima QDPR entonces, además de reciclar el BH₄, tendría que sustituir a la DHFR para evitar la degradación del THF y esto desfavorecería su interacción con el transportador hCNT3.

Debido a que a QDPR se le atribuyó la capacidad de prevenir la degradación del THF (Zheng y col., 2018, Wilquet y col., 2004), el estudio de su interacción con hCNT3 se hizo relevante ya que a través de esta relación quizás se podrían vincular elementos del salvamento de nucleósidos con elementos relacionados a la síntesis *de novo*. El estudio de los cuadros clínicos de los pacientes con deficiencia de QDPR ya había permitido plantear un vínculo entre la enzima y el metabolismo de los folatos (Pollock y Kaufman 1978) y en la actualidad el tratamiento estándar incluye una suplementación con ácido fólico. Ahora bien, los datos sobre la pirimidinuria provenientes de los pacientes con deficiencia de QDPR permitieron plantear una posible relación entre la ausencia de la enzima y cambios en la expresión o en la actividad de los transportadores de nucleósidos en el riñón, principalmente en aquellos que transportan pirimidinas. La importancia de elementos vinculados a las pirimidinas se hizo mayor al hacer un análisis de los cambios transcripcionales: la expresión de hCNT3 fue la más alterada por la sobreexpresión de QDPR, pero también el mensajero de hCNT1 fue modulado en sentido contrario, disminuyéndolo.

El mantenimiento de la integridad del metabolismo de los folatos es necesario para el crecimiento celular, el desarrollo embrionario, la activación inmunológica y la tumorigénesis. Por su papel esencial en la síntesis de ácidos nucleicos, la inhibición del

metabolismo de los folatos lleva a un bloqueo de la proliferación celular. En el cáncer, enzimas como la DHFR, TYMS, SHMT2 y MTHFD2 están consistentemente sobreexpresadas (Mehrmoahadi y col., 2014) y en algunos tipos, como en el cáncer de mama, esta última se vincula a un aumento de la capacidad de invasión y mala prognosis (Liu y col., 2014; Lehtinen y col., 2012). Por el interés de inhibir el metabolismo de un carbono se desarrollaron los primeros fármacos antineoplásicos basados en análogos de folatos, y son tratamientos que siguen siendo relevantes hoy en día. Entre los antimetabolitos más comúnmente utilizados para la inhibición de esta vía está el metotrexato (MTX), utilizado para inhibir la DHFR en el tratamiento de las leucemias, y el 5-fluorouracilo, un análogo de pirimidinas que inhibe la enzima TYMS (Ducker y Rabinowitz 2017; Longley y col., 2003; Huennekens 1994). Además de la DHFR, el MTX puede inhibir distintas enzimas dependientes de folatos, entre las que se encuentran las enzimas ATIC y TYMS (Bedoui y col., 2019) y por esto su uso no fue considerado en esta tesis.

Además del ciclo del folato, el metabolismo de un carbono se compone de una serie de vías metabólicas interrelacionadas siendo, entre otras, responsable de la producción de serina y glicina, pero también de mantener la homeostasis redox. En la mitocondria, la actividad de la MTHFD2 y ALDH1L2 generan NAD(P)H (Ducker y col., 2016; Fan y col., 2014), vinculando la vía con el estado respiratorio de la célula. En el citoplasma, las ratios de NADPH/NADP⁺ regulan el flujo de la vía hacia la producción de serina impulsado por la actividad deshidrogenasa de la MTHFD1 (Pelletier y MacKenzie 1995). La serina es el principal donador de unidades de un carbono en células en cultivo (Labuschagne y col., 2014; Fu y col., 2001), incluidas las células HEK293T (Ducker y col., 2016). En condiciones de cultivo normales, el formato es producido en la mitocondria a partir de la serina. Por el contrario, en el citoplasma, la dirección de la vía lleva al consumo de glicina y 5,10-metilen-THF para producir serina y THF por la enzima SHMT1. En condiciones basales, un aumento de la cantidad de serina quizás podría explicarse por un aumento del flujo metabólico hacia la producción de THF. Sin embargo, según el tejido, el metabolismo de un carbono también puede funcionar de forma mixta. Las unidades de un carbono pueden producirse en el citoplasma y en la mitocondria, como puede ser en el caso de riñón o del hígado, donde MTHFD1 y SHMT1 están muy expresadas (Ducker y Rabinowitz 2017). El uso de la vía citosólica podría estar relacionada a la disponibilidad de ácido fólico. En células tumorales de diferentes orígenes, cultivadas con concentraciones fisiológicas de ácido fólico (en el rango nM en suero) (Wishart y col., 2018; Fazili y col., 2008), se pudo relacionar la baja expresión del transportador de folatos RFC (*SLC19A1 - reduced folate carrier*) con el uso preferencial

de la vía citosólica sobre la vía mitocondrial (Lee y col., 2021). La sobreexpresión de QDPR aumentó las cantidades de serina en nuestro modelo celular, pero no reguló a SHMT1 ni a SHMT2. Ya que la enzima tiene un papel protector sobre el THF, su sobreexpresión podría tener un impacto sobre la síntesis de los folatos. Para estudiar esto mejor en el contexto de su interacción con hCNT3, se podría silenciar SHMT1 y SHMT2 en ensayos NanoBRET. El bloqueo de estas reacciones determinaría la relevancia de los productos citosólicos y mitocondriales de estas reacciones sobre la interacción.

La síntesis de dTMP a partir de la dUMP la realiza la enzima TYMS, en una reacción que requiere de 5,10-metilen-THF como cofactor, pero también para la síntesis de purinas es requerido un cofactor folato, el 10-formil-THF, en dos de las reacciones de la vía (Ducker y Rabinowitz 2017). La utilización de unidades de carbono provenientes del metabolismo de los folatos implica que la vía de producción de folatos reducidos esté activa en citoplasma y en mitocondria y que haya un correcto suministro de THF para poder generar los cofactores enzimáticos. Como estos cofactores son utilizados para la síntesis de purinas y pirimidinas, la inhibición de la vía de biosíntesis de nucleósidos podría modificar las concentraciones relativas de los cofactores 10-formil-THF y 5,10-metilen-THF, alterando la vía de 1C y regulando las enzimas que participan de ella, como la QDPR. Esto podría explicar porque en nuestros resultados, ante la inhibición de la vía de síntesis de las pirimidinas producto de la inhibición o el silenciamiento de la DHODH, QDPR fue regulada positivamente. Ya en esta tesis se había observado que la expresión de los transportadores concentrativos puede variar según si se altera la biodisponibilidad y el metabolismo de nucleósidos y llamó la atención que también fuera el caso para QDPR. Así mismo, al igual que los niveles de nucleósidos intracelulares deben estar en el equilibrio correcto, la proliferación y supervivencia celular también depende del mantenimiento óptimo de los niveles de folatos intracelulares. La deficiencia de ácido fólico disminuye la síntesis de purinas y de dTMP y por tanto la proliferación celular, llevando a la célula a apoptosis (Huang y col., 1999; James y col., 1997; Pogribny y col., 1995). Al faltar el cofactor 5,10-metilen-THF para TYMS, la ratio dUTP/dTTP aumenta y se incrementa la probabilidad de una incorporación errónea de dUTP al ADN, generando una inestabilidad de la doble cadena seguida por la fragmentación del ADN y la muerte celular por apoptosis. Este bloqueo del metabolismo de 1C por falta de THF, podría ser suficiente para inducir una respuesta celular que intente reestablecer el balance correcto de nucleósidos. Esto tendría sentido en nuestro modelo si se considera que, cuando se eliminó el ácido fólico del medio e incluso cuando se silenció la DHFR, se observó un aumento de los mensajeros de hCNT1 y hCNT3 en las células HEK293. Esta respuesta

celular va en concordancia con la idea de que los dos transportadores de pirimidinas, y principalmente hCNT3, puede ser regulado en función de la necesidad de reestablecer los niveles de nucleósidos, aunque según nuestros resultados esta regulación no parece ser detonada directamente por alteraciones en los niveles de nucleósidos sino más bien por la disponibilidad de los cofactores necesarios para su síntesis.

Entre las enzimas del metabolismo del carbono que se analizaron en este trabajo estuvo la DHFR, la enzima encargada de producir el THF, ya sea a partir del ácido fólico o de la reducción del DHF generado en la producción de dTMP (Lan y col., 2018). Esta enzima cobró más relevancia en esta tesis al observarse que la expresión de su mensajero estaba aumentada al co-expresar hCNT3 y QDPR y esto permitió intuir una importancia de la vía de 1C en la interacción que se está estudiando. El THF es el aceptor de la unidad de 1C proveniente de la serina en la mitocondria. DHFR también puede generar BH₄ por la vía de salvamento de las biopterinas. La síntesis de las purinas requiere de gran cantidad de unidades de un carbono, siendo la demanda de 10-formil-THF superior a la de 5,10-metilen-THF (Ducker y Rabinowitz 2017). En células en cultivo, las cantidades de 10-formil-THF y de 5,10-metilen-THF son superiores al de otras especies de folatos, pero el bloqueo del metabolismo de un carbono mitocondrial lleva a una disminución de ambos, acompañado de un aumento de THF, de 5,10-metilen-THF y de p-acetamidobenzoyl poliglutamato (pAcABG_n) (Zheng y col., 2018). Si la vía se altera por la inhibición o *knockout* de la DHFR, también se puede observar un aumento de pAcABG_n y de DHF. El pAcABG_n es un producto final del metabolismo de los folatos (Zheng y col., 2018; Murphy y col., 1976). Esto significa que, cuando el formato mitocondrial no se produce, o cuando no hay actividad de la DHFR en el citoplasma, los folatos son degradados (Zheng y col., 2018). Tomando esto en cuenta, se podría asumir que, en nuestros resultados, la generación de pAcABG_n en el sistema por el silenciamiento de DHFR no afecta la interacción entre hCNT3 y QDPR. A pesar de esto, en este trabajo la expresión de la DHFR fue regulada positivamente al co-expresar QDPR y hCNT3, por lo que se puede suponer que igualmente la presencia de la enzima está vinculada de alguna forma a la interacción.

En el panorama donde no hay DHFR, la sobreexpresión de QDPR no previene la degradación de los folatos, pero el doble *knockout* (DHFR-QDPR) lleva a una depleción mayor de las reservas de folato activo (Zheng y col., 2018). Es decir, que a pesar de que el folato se está degradando, la presencia de QDPR está de alguna forma previniendo una disminución aún mayor de los cofactores que se utilizan en otras vías metabólicas. Entonces a partir de los resultados obtenidos en esta tesis se puede intuir que, si ante una QDPR disfuncional (V15A), y en ausencia de DHFR, se altera la interacción con

hCNT3 significaría que ese pequeño porcentaje de folatos que se ve afectado por el mal funcionamiento de QDPR es capaz de modular la interacción entre hCNT3 y QDPR, desfavoreciéndola. Además, la variante V15A de QDPR también tuvo un efecto negativo sobre el mensajero de hCNT3, demostrándose que la funcionalidad de la enzima no solo afecta la estabilidad de la interacción, sino que también tiene efecto transcripcional sobre el transportador. Con base en esto y en que la alteración de los reservorios de folatos lleva a un desbalance en los niveles de nucleótidos, se podría asumir una participación de los niveles de nucleótido(s)/folatos en la regulación de la interacción entre hCNT3 y QDPR. En las células, la concentración de enzimas dependientes de folatos es parecida a la cantidad de folatos disponibles, por lo que las cantidades de cofactores folatos libres tendría que ser baja (Schirch y Strong 1989). En las células en reposo, el mantenimiento de las cantidades de folato activo por QDPR wt permitiría mantener las vías de biosíntesis en un flujo apropiado, asegurando el balance correcto de purinas y de pirimidinas y una interacción basal con hCNT3. Aunque se podría hipotetizar que la asociación de QDPR con hCNT3 regule hasta cierto punto la activación del salvamento de nucleósidos a través del transportador, resultados obtenidos en la tesis de la Dra. Catalina Perelló demostraron que la actividad de hCNT3 no se ve alterada por la sobreexpresión de QDPR.

Otro detalle previamente comentado es que los cambios en la interacción entre hCNT3 y QDPR V15A solo fueron evidentes en medio DMEM, indistintamente de la suplementación con nucleósidos. Que se haya observado el mismo efecto en el medio con nucleósidos o libre de ellos, aleja la idea de que la suplementación con timidina e hipoxantina del OptiMEM tuviesen relevancia por si solos en la modulación de la interacción, como mínimo a las concentraciones a las que se encuentren. Es por esto que no se puede descartar que en la formulación del OptiMEM exista algún aminoácido - como la serina - a diferente concentración, y que esta diferencia tenga la capacidad de tamponar el efecto combinado de la carencia de DHFR y de la poca actividad de QDPR sobre la interacción con hCNT3.

La importancia fisiológica de la regulación positiva de hCNT3 por QDPR, así como de su interacción no es del todo clara. Para poder identificar los puntos sensibles de la vía del metabolismo de 1C y profundizar en el impacto de la acumulación de cofactores folatos que regularían de forma más contundente la interacción hCNT3:QDPR se podrían bloquear las vías de síntesis de nucleósidos, principalmente en las reacciones que requieran de los cofactores 5,10-metil-THF y 10-formil-THF (TYMS, ATIC). Otra opción sería el bloqueo de la síntesis de serina y glicina en mitocondria y citoplasma, por silenciamiento de la SHMT1. Todas estas intervenciones permitirían tener un

panorama más claro del punto de la vía del metabolismo de 1C mayormente implicada en la interacción.

De momento, la posibilidad de obtener células a partir de, por ejemplo, iPSS, que permitan una expresión basal de hCNT3 y de QDPR permitiría profundizar en la importancia de esta interacción para hCNT3 en un modelo más fisiológico. Con las iPSS se podrían generar células que puedan ser polarizadas y que aseguren la correcta ubicación de hCNT3 en la membrana. hCNT3 se caracteriza por estar presente en epitelios polarizados como intestino o riñón, por lo que el uso de un modelo celular no polarizado como las HEK293 implica una limitación en el estudio. Tanto hCNT3 como QDPR están expresadas en los túbulos proximales del riñón (Rodríguez-Mulero y col., 2005; Human Protein Atlas), por lo que la interacción podría tener un impacto en la fisiología del órgano. Si bien el papel biológico de la interacción entre QDPR y hCNT3 aún debe ser más estudiado, el conjunto de resultados obtenidos en esta tesis permite establecer que la relación funcional entre QDPR y hCNT3 está relacionada a la disponibilidad y el mantenimiento de los niveles de cofactores folatos que luego serán usados para las vías de biosíntesis de purinas y de pirimidinas, y se presenta un modelo a modo de resumen (**Figura 62**).

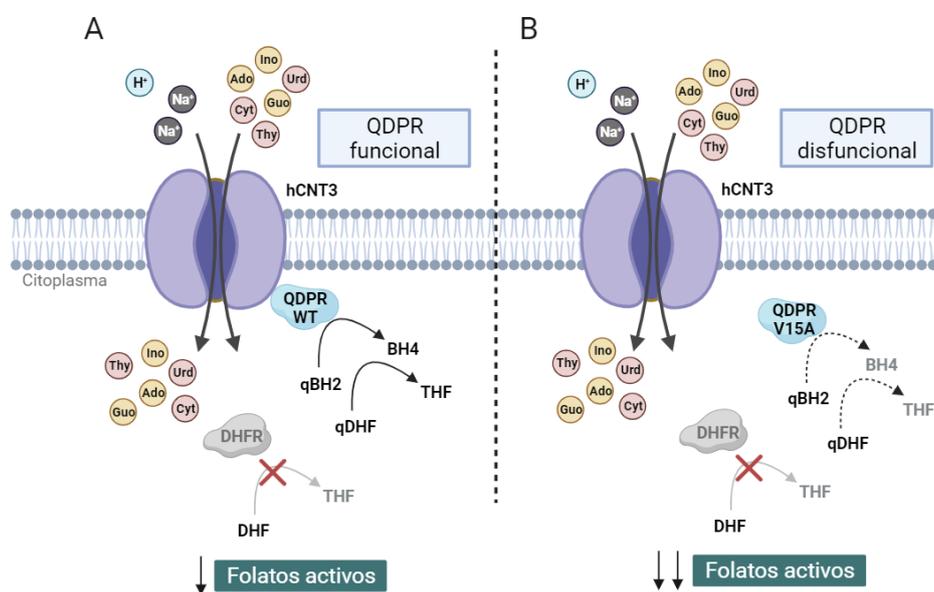


Figura 62.- Modelo de los folatos como reguladores de la interacción entre hCNT3 y QDPR. (A) Al alterar los niveles de folatos intracelulares por el silenciamiento de la DHFR, pero en presencia de una enzima QDPR funcional, esta QDPR podría prevenir la degradación del THF, regenerándolo a partir de la qDHF. A pesar de que habría degradación del THF, la acción de QDPR sobre la qDHF aseguraría el mantenimiento de cierta cantidad relativa de folatos activos. (B) En el caso de disminuir la expresión de DHFR en presencia de una QDPR disfuncional, no habría ninguna enzima que pudiera prevenir el daño oxidativo del THF y la cantidad relativa de folatos activos se vería disminuida, desfavoreciendo así la interacción entre hCNT3 y QDPR.

Conclusiones

- La interacción de monómeros de hCNT1 y hCNT3, ya sea como homo- o hetero-oligómeros, es estable y no se ve alterada por la modulación de los niveles de nucleósidos en general ni por cambios en la concentración de uridina ni citidina.
- La expresión de hCNT1 responde a cambios en la disponibilidad de nucleósidos, ya sea por alteración en los niveles de nucleósidos intracelulares como también los extracelulares. Esta regulación podría estar vinculada a la función de hCNT1 como tranceptor. Por su parte, la expresión de hCNT3 como respuesta al estrés metabólico está condicionada a la presencia y posiblemente a la actividad de hCNT1.
- hCNT3 es regulado transcripcionalmente por la sobreexpresión de QDPR, y esta regulación podría vincularse a alteraciones en el metabolismo de los folatos. La co-expresión de QDPR y hCNT3 produce un aumento en los niveles de folatos totales, concretamente de 5-MTHF y regula positivamente a la DHFR, lo que vincula a elementos del metabolismo de los folatos con la interacción.
- hCNT3 y QDPR interaccionan bioquímicamente y su interacción no se ve alterada por la disponibilidad de nucleósidos extracelulares, sino más bien por un desbalance en los niveles internos. Así mismo, la actividad de QDPR y su capacidad de mantener la disponibilidad intracelular de folatos activos en cierto límite condiciona su interacción con hCNT3.
- La variante patológica QDPR V15A, con una actividad reducida, regula negativamente el mensajero de hCNT3 y esto podría estar vinculado a una severidad en la patología asociada a la deficiencia de QDPR.

Bibliografía

A

- Abdulla, P., y I. R. Coe. (2007). "Characterization and functional analysis of the promoter for the human equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1", *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 26: 99-110.
- Aguayo, C., J. Casado, M. Gonzalez, J. D. Pearson, R. S. Martin, P. Casanello, M. Pastor-Anglada, y L. Sobrevia. (2005). "Equilibrative nucleoside transporter 2 is expressed in human umbilical vein endothelium, but is not involved in the inhibition of adenosine transport induced by hyperglycaemia", *Placenta*, 26: 641-53.
- Ali, E. S., y I. Ben-Sahra. (2023). "Regulation of nucleotide metabolism in cancers and immune disorders", *Trends Cell Biol.*
- An, A., R. Kumar, E. D. Sheets, y S. J. Benkovic. (2008). "Reversible Compartmentalization of de Novo Purine Biosynthetic Complexes in Living Cells", *Science*, 320: 103 - 06.
- Anderson, D. D., C. F. Woeller, E. P. Chiang, B. Shane, y P. J. Stover. (2012). "Serine hydroxymethyltransferase anchors de novo thymidylate synthesis pathway to nuclear lamina for DNA synthesis", *J Biol Chem*, 287: 7051-62.
- Anderson, D. D., C. F. Woeller, y P. J. Stover. (2007). "Small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) modification of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase", *Clin Chem Lab Med*, 45: 1760-3.
- Appling, Dean R. (1991). "Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes", *FASEB J*, 5: 2645-51.
- Asby, D. J., F. Cuda, M. Beyaert, F. D. Houghton, F. R. Cagampang, y A. Tavassoli. (2015). "AMPK Activation via Modulation of De Novo Purine Biosynthesis with an Inhibitor of ATIC Homodimerization", *Chem Biol*, 22: 838-48.
- Aymerich, I., M. Pastor-Anglada, y F. J. Casado. (2004). "Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells", *J Gen Physiol*, 124: 505-12.

B

- Baggott, J. E., y G. L. Johanning. (1999). "10-Formyl-dihydrofolic acid is bioactive in human leukemia cells", *J Nutr*, 129: 1315-8.
- Balasubramaniam, S., J. A. Duley, y J. Christodoulou. (2014). "Inborn errors of pyrimidine metabolism: clinical update and therapy", *J Inherit Metab Dis*, 37: 687-98.
- Baldwin, S. A., P. R. Beal, S. Y. Yao, A. E. King, C. E. Cass, y J. D. Young. (2004). "The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29", *Pflugers Arch*, 447: 735-43.
- Baldwin, S. A., S. Y. Yao, R. J. Hyde, A. M. Ng, S. Foppolo, K. Barnes, M. W. Ritzel, C. E. Cass, y J. D. Young. (2005). "Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes", *J Biol Chem*, 280: 15880-7.
- Baresova, Veronika, Matyas Krijt, Vaclava Skopova, Olga Souckova, Stanislav Kmoch, y Marie Zikanova. (2016). "CRISPR-Cas9 induced mutations along de novo purine synthesis in HeLa cells result in accumulation of individual enzyme substrates and affect purinosome formation", *Molecular Genetics and Metabolism*, 119: 270-77.
- Barlowe, C. K., y D. R. Appling. (1988). "In vitro evidence for the involvement of mitochondrial folate metabolism in the supply of cytoplasmic one-carbon units", *Biofactors*, 1: :171-76.
- Barnes, K., H. Dobrzynski, S. Foppolo, P. R. Beal, F. Ismat, E. R. Scullion, L. Sun, J. Tellez, M. W. Ritzel, W. C. Claycomb, C. E. Cass, J. D. Young, R. Billeter-Clark, M. R. Boyett, y S. A. Baldwin. (2006). "Distribution and functional characterization

- of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH", *Circ Res*, 99: 510-9.
- Bartholomaeus, I., L. Milan-Lobo, A. Nicke, S. Dutertre, H. Hastrup, A. Jha, U. Gether, H. H. Sitte, H. Betz, y V. Eulenburg. (2008). "Glycine transporter dimers: evidence for occurrence in the plasma membrane", *J Biol Chem*, 283: 10978-91.
- Bartholomé, K., D. J. Byrd, S. Kaufman, y S. Milstien. (1977). "Atypical phenylketonuria with normal phenylalanine hydroxylase and dihydropteridine reductase activity in vitro", *Pediatrics*, 59: 757-61.
- Bedoui, Y., X. Guillot, J. Selambarom, P. Guiraud, C. Giry, M. C. Jaffar-Bandjee, S. Ralandison, y P. Gasque. (2019). "Methotrexate an Old Drug with New Tricks", *Int J Mol Sci*, 20.
- Ben-Sahra, I., J.J Howell, J.M Asara, y B.D. Manning. (2013). "Stimulation of de Novo Pyrimidine Synthesis by Growth Signaling Through mTOR and S6K1", *Science*: 1323-28.
- Ben-Sahra, I., G. Hoxhaj, S. J. H. Ricoult, J. M. Asara, y B. D. Manning. (2016). "mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle", *Science*, 351: 728-33
- Bharadwaj, S., G. Liu, Y. Shi, R. Wu, B. Yang, T. He, Y. Fan, X. Lu, X. Zhou, H. Liu, A. Atala, J. Rohozinski, y Y. Zhang. (2013). "Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology", *Stem Cells*, 31: 1840-56.
- Bicket, A., y I. R. Coe. (2016). "N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function", *Biosci Rep*, 36.
- Blau, N. (2016). "Genetics of Phenylketonuria: Then and Now", *Hum Mutat*, 37: 508-15.
- Blau, N., C. W. Heizmann, W. Sperl, G. C. Korenke, y G. F. Hoffman. (1992). "Atypical (Mild) Forms of Dihydropteridine Reductase Deficiency: Neurochemical Evaluation and Mutation Detection", *Pediatric Research*, 32: 726-30.
- Blau, N.; Thony, B.; Cotton, R. G. H. y Hyland, K. (2001). "Disorders of Tetrahydrobiopterin and Related Biogenic Amines".
- Blau, N.; Thony, B.; Heizmann, C.W. y Dhondt, J-L. (1993). "Tetrahydrobiopterin deficiency: From Phenotype to Genotype", *Pteridines*, 4.
- Boces-Pascual, Clara, Aida Mata-Ventosa, Mireia Martín-Satué, Loreto Boix, Meritxell Gironella, Marçal Pastor-Anglada, y Sandra Pérez-Torras. (2021). "OncomiRs miR-106a and miR-17 negatively regulate the nucleoside-derived drug transporter hCNT1", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78: 7505-18.
- Boswell-Casteel, R. C., y F. A. Hays. (2017). "Equilibrative nucleoside transporters-A review", *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 36: 7-30.
- Boukalova, S., S. Hubackova, M. Milosevic, Z. Ezrova, J. Neuzil, y J. Rohlena. (2020). "Dihydroorotate dehydrogenase in oxidative phosphorylation and cancer", *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866: 165759.
- Buj, R., y K. M. Aird. (2018). "Deoxyribonucleotide Triphosphate Metabolism in Cancer and Metabolic Disease", *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9: 177.
- Burgos-Barragan, G., N. Wit, J. Meiser, F. A. Dingler, M. Pietzke, L. Mulderrig, L. B. Pontel, I. V. Rosado, T. F. Brewer, R. L. Cordell, P. S. Monks, C. J. Chang, A. Vazquez, y K. J. Patel. (2017). "Mammals divert endogenous genotoxic formaldehyde into one-carbon metabolism", *Nature*, 548: 549-54.
- Burnstock, G. (2017). "Purinergic Signalling: Therapeutic Developments", *Front Pharmacol*, 8: 661.

C

- Camici, M., V. Micheli, P. L. Ipata, y M. G. Tozzi. (2010). "Pediatric neurological syndromes and inborn errors of purine metabolism", *Neurochem Int*, 56: 367-78.

- Carter, C. J., A. H. Mekkawy, y D. L. Morris. (2021). "Role of human nucleoside transporters in pancreatic cancer and chemoresistance", *World J Gastroenterol*, 27: 6844-60.
- Casado, M., C. Sierra, M. Batllori, R. Artuch, y A. Ormazabal. (2018). "A targeted metabolomic procedure for amino acid analysis in different biological specimens by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Metabolomics*, 14: 76.
- Casanello, P., A. Torres, F. Sanhueza, M. Gonzalez, M. Farias, V. Gallardo, M. Pastor-Anglada, R. San Martin, y L. Sobrevia. (2005). "Equilibrative nucleoside transporter 1 expression is downregulated by hypoxia in human umbilical vein endothelium", *Circ Res*, 97: 16-24.
- Celis, N., J. Araos, C. Sanhueza, F. Toledo, A. R. Beltran, F. Pardo, A. Leiva, M. A. Ramirez, y L. Sobrevia. (2017). "Intracellular acidification increases adenosine transport in human umbilical vein endothelial cells", *Placenta*, 51: 10-17.
- Chan, C. Y., H. Zhao, R. J. Pugh, A. M. Pedley, J. French, S. A. Jones, X. Zhuang, H. Jinnah, T. J. Huang, y S. J. Benkovic. (2015). "Purinosome formation as a function of the cell cycle", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 1368-73.
- Chitrakar, I., D. M. Kim-Holzappel, W. Zhou, y J. B. French. (2017). "Higher order structures in purine and pyrimidine metabolism", *J Struct Biol*, 197: 354-64.
- Choi, D. S., M. Handa, H. Young, A. S. Gordon, I. Diamond, y R. O. Messing. (2000). "Genomic organization and expression of the mouse equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter 1 (ENT1) gene", *Biochem Biophys Res Commun*, 277: 200-8.
- Christensen, K. E., y R. E. MacKenzie. (2006). "Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals", *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 28(6), 595-605.
- Coe, I., Y. Zhang, T. McKenzie, y Z. Naydenova. (2002). "PKC regulation of the human equilibrative nucleoside transporter, hENT1", *FEBS Lett*, 517: 201-5.
- Cory, J. G., y A. Sato. (1983). "Regulation of ribonucleotide reductase activity in mammalian cells", *Mol Cell Biochem*.
- Cronin, S. J. F., C. Seehus, A. Weidinger, S. Talbot, S. Reissig, M. Seifert, Y. Pierson, E. McNeill, M. S. Longhi, B. L. Turnes, T. Kreslavsky, M. Kogler, D. Hoffmann, M. Ticevic, D. da Luz Scheffer, L. Tortola, D. Cikes, A. Jais, M. Rangachari, S. Rao, M. Paolino, M. Novatchkova, M. Aichinger, L. Barrett, A. Latremoliere, G. Wirnsberger, G. Lametschwandtner, M. Busslinger, S. Zicha, A. Latini, S. C. Robson, A. Waisman, N. Andrews, M. Costigan, K. M. Channon, G. Weiss, A. V. Kozlov, M. Tebbe, K. Johnsson, C. J. Woolf, y J. M. Penninger. (2018). "The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer", *Nature*, 563: 564-68.
- Cronstein, B. N., y T. M. Aune. (2020). "Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis", *Nat Rev Rheumatol*, 16: 145-54.

D

- Damaraju, V. L., A. N. Elwi, C. Hunter, P. Carpenter, C. Santos, G. M. Barron, X. Sun, S. A. Baldwin, J. D. Young, J. R. Mackey, M. B. Sawyer, y C. E. Cass. (2007). "Localization of broadly selective equilibrative and concentrative nucleoside transporters, hENT1 and hCNT3, in human kidney", *Am J Physiol Renal Physiol*, 293: F200-11.
- De Vitto, H., D. B. Arachchige, B. C. Richardson, y J. B. French. (2021). "The Intersection of Purine and Mitochondrial Metabolism in Cancer", *Cells*, 10.
- Deng, Y., J. Gam, J. B. French, H. Zhao, S. An, y S. J. Benkovic. (2012). "Mapping protein-protein proximity in the purinosome", *J Biol Chem*, 287: 36201-7.

- Diehl, F. F., T. P. Miettinen, R. Elbashir, C. S. Nabel, A. M. Darnell, B. T. Do, S. R. Manalis, C. A. Lewis, y M. G. Vander Heiden. (2022). "Nucleotide imbalance decouples cell growth from cell proliferation", *Nat Cell Biol*, 24: 1252-64.
- Dragan, Y., R. Valdes, M. Gomez-Angelats, A. Felipe, F. Javier Casado, H. Pitot, y M. Pastor-Anglada. (2000). "Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas", *Hepatology*, 32: 239-46.
- Ducker, G. S., L. Chen, R. J. Morscher, J. M. Ghergurovich, M. Esposito, X. Teng, Y. Kang, y J. D. Rabinowitz. (2016). "Reversal of Cytosolic One-Carbon Flux Compensates for Loss of the Mitochondrial Folate Pathway", *Cell Metab*, 23: 1140-53.
- Ducker, G. S., y J. D. Rabinowitz. (2017). "One-Carbon Metabolism in Health and Disease", *Cell Metab*, 25: 27-42.
- Duflot, S., B. Riera, S. Fernandez-Veledo, V. Casado, R. I. Norman, F. J. Casado, C. Lluís, R. Franco, y M. Pastor-Anglada. (2004). "ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors", *Mol Cell Biol*, 24: 2710-9.
- Duley, J. A., J. Christodoulou, y A. P. de Brouwer. (2011). "The PRPP synthetase spectrum: what does it demonstrate about nucleotide syndromes?", *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 30: 1129-39.

E

- Egger, S., A. Chaikuad, K. L. Kavanagh, U. Oppermann, y B. Nidetzky. (2011). "Structure and mechanism of human UDP-glucose 6-dehydrogenase", *J Biol Chem*, 286: 23877-87.
- Eichwald, T., L. B. da Silva, A. C. Staats Pires, L. Niero, E. Schnorrenberger, C. C. Filho, G. Espindola, W. L. Huang, G. J. Guillemin, J. E. Abdenur, y A. Latini. (2023). "Tetrahydrobiopterin: Beyond Its Traditional Role as a Cofactor", *Antioxidants (Basel)*, 12.
- Eltzschig, H. K., P. Abdulla, E. Hoffman, K. E. Hamilton, D. Daniels, C. Schonfeld, M. Loffler, G. Reyes, M. Duszenko, J. Karhausen, A. Robinson, K. A. Westerman, I. R. Coe, y S. P. Colgan. (2005). "HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia", *J Exp Med*, 202: 1493-505.
- Elwi, Adam N., Vijaya L. Damaraju, Stephen A. Baldwin, James D. Young, Michael B. Sawyer, y Carol E. Cass. (2006). "Renal nucleoside transporters: physiological and clinical implications This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB — Membrane Proteins in Health and Disease", 84: 844-58.
- Emmanuel, N., S. Raganathan, Q. Shan, F. Wang, A. Giannakou, N. Huser, G. Jin, J. Myers, R. T. Abraham, y K. Unsal-Kacmaz. (2017). "Purine Nucleotide Availability Regulates mTORC1 Activity through the Rheb GTPase", *Cell Rep*, 19: 2665-80.
- Engel, K., M. Zhou, y J. Wang. (2004). "Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain", *J Biol Chem*, 279: 50042-9.
- Errasti-Murugarren, E., P. Fernandez-Calotti, M. Veyhl-Wichmann, M. Diepold, I. Pinilla-Macua, S. Perez-Torras, H. Kipp, H. Koepsell, y M. Pastor-Anglada. (2012). "Role of the transporter regulator protein (RS1) in the modulation of concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia", *Mol Pharmacol*, 82: 59-67.
- Errasti-Murugarren, E., M. Molina-Arcas, F. J. Casado, y M. Pastor-Anglada. (2009). "A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum", *FASEB J*, 23: 172-82.
- Errasti-Murugarren, E., M. Pastor-Anglada, y F. J. Casado. (2007). "Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs", *J Physiol*, 582: 1249-60.

Evans, D. R., y H. I. Guy. (2004). "Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway", *J Biol Chem*, 279: 33035-8.

F

- Fairbanks, Lynette D., Margarita Bofill, Katarzyna Ruckemann, y H. Anne Simmonds. (1995). "Importance of Ribonucleotide Availability to Proliferating T-lymphocytes from Healthy Humans", *Journal of Biological Chemistry*, 270: 29682-89.
- Fan, J., J. Ye, J. J. Kamphorst, T. Shlomi, C. B. Thompson, y J. D. Rabinowitz. (2014). "Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production", *Nature*, 510: 298-302.
- Fang, J., T. Uchiumi, M. Yagi, S. Matsumoto, R. Amamoto, S. Takazaki, H. Yamaza, K. Nonaka, y D. Kang. (2013). "Dihydro-orotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction", *Biosci Rep*, 33: e00021.
- Fang, X., F. E. Parkinson, D. A. Mowles, J. D. Young, y C. E. Cass. (1996). "Functional characterization of a recombinant sodium-dependent nucleoside transporter with selectivity for pyrimidine nucleosides (cNT1rat) by transient expression in cultured mammalian cells.", *Biochem J*, 317: 457-65.
- Farias, M., C. Puebla, F. Westermeier, M. J. Jo, M. Pastor-Anglada, P. Casanello, y L. Sobrevia. (2010). "Nitric oxide reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving transcription factor complex hCHOP-C/EBPalpha in human umbilical vein endothelial cells from gestational diabetes", *Cardiovasc Res*, 86: 45-54.
- Farre, X., E. Guillen-Gomez, L. Sanchez, D. Hardisson, Y. Plaza, J. Lloberas, F. J. Casado, J. Palacios, y M. Pastor-Anglada. (2004). "Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors", *Int J Cancer*, 112: 959-66.
- Fazili, Z., C. M. Pfeiffer, M. Zhang, R. B. Jain, y D. Koontz. (2008). "Influence of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism on Whole-Blood Folate Concentrations Measured by LC-MS/ MS, Microbiologic Assay, and Bio-Rad Radioassay", *Clinical Chemistry*, 54: 197-201.
- Fernandez-Calotti, P., O. Casulleras, M. Antolin, F. Guarner, y M. Pastor-Anglada. (2016). "Galectin-4 interacts with the drug transporter human concentrative nucleoside transporter 3 to regulate its function", *FASEB J*, 30: 544-54.
- Fernandez-Calotti, P., y M. Pastor-Anglada. (2010). "All-trans-retinoic acid promotes trafficking of human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) to the plasma membrane by a TGF-beta1-mediated mechanism", *J Biol Chem*, 285: 13589-98.
- Fernandez-Veledo, S., R. Jover, F. J. Casado, M. J. Gomez-Lechon, y M. Pastor-Anglada. (2007). "Transcription factors involved in the expression of SLC28 genes in human liver parenchymal cells", *Biochem Biophys Res Commun*, 353: 381-8.
- Fernandez-Veledo, S., R. Valdes, V. Wallenius, F. J. Casado, y M. Pastor-Anglada. (2004). "Up-regulation of the high-affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter concentrative nucleoside transporter 1 by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in liver parenchymal cells", *J Hepatol*, 41: 538-44.
- Felix, J.S.; Sun, T.T.; Littlefield, J.W. (1980) "Human epithelial cells cultured from urine: growth properties and keratin staining". *In Vitro*, 16, 866-874.
- Felix, J.S.; Littlefield, J.W. (1979) "Urinary tract epithelial cells cultured from human urine". *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 1979, 10, 11-23.
- Firgaira, F A, R G Cotton, y D M Danks. (1981). "Isolation and characterization of dihydropteridine reductase from human liver", *Biochemical Journal*, 197: 31-43.

- Franzolin, E., G. Pontarin, C. Rampazzo, C. Miazzi, P. Ferraro, E. Palumbo, P. Reichard, y V. Bianchi. (2013). "The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 14272-7.
- French, J. B., S. A. Jones, H. Deng, A. M. Pedley, D. Kim, C. Y. Chan, H. Hu, R. J. Pugh, H. Zhao, Y. Zhang, T. J. Huang, Y. Fang, X. Zhuang, y S. J. Benkovic. (2016). "Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria", *Science*, 351: 733–37.
- Fu, T. F., J. P. Rife, y V. Schirch. (2001). "The role of serine hydroxymethyltransferase isozymes in one-carbon metabolism in MCF-7 cells as determined by ¹³C NMR", *Arch Biochem Biophys*, 393: 42-50.
- Fujita, M., D. D. L. Scheffer, B. L. Turnes, S. J. F. Cronin, A. Latremoliere, M. Costigan, C. J. Woolf, A. Latini, y N. A. Andrews. (2020). "Sepiapterin Reductase Inhibition Leading to Selective Reduction of Inflammatory Joint Pain in Mice and Increased Urinary Sepiapterin Levels in Humans and Mice", *Arthritis Rheumatol*, 72: 57-66.

G

- Garcia-Gil, M., M. Camici, S. Allegrini, R. Pesi, E. Petrotto, y M. G. Tozzi. (2018). "Emerging Role of Purine Metabolizing Enzymes in Brain Function and Tumors", *Int J Mol Sci*, 19.
- Godoy, V., J. M. Banales, J. F. Medina, y M. Pastor-Anglada. (2014). "Functional crosstalk between the adenosine transporter CNT3 and purinergic receptors in the biliary epithelia", *J Hepatol*, 61: 1337-43.
- Goldstone, D. C., V. Ennis-Adeniran, J. J. Hedden, H. C. Groom, G. I. Rice, E. Christodoulou, P. A. Walker, G. Kelly, L. F. Haire, M. W. Yap, L. P. de Carvalho, J. P. Stoye, Y. J. Crow, I. A. Taylor, y M. Webb. (2011). "HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase", *Nature*, 480: 379-82.
- Govindarajan, R., A. H. Bakken, K. L. Hudkins, Y. Lai, F. J. Casado, M. Pastor-Anglada, C. M. Tse, J. Hayashi, y J. D. Unadkat. (2007). "In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys, and placenta", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293: R1809-22.
- Govindarajan, R., G. P. Leung, M. Zhou, C. M. Tse, J. Wang, y J. D. Unadkat. (2009). "Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296: G910-22.
- Grande-Garcia, A., N. Lallous, C. Diaz-Tejada, y S. Ramon-Maiques. (2014). "Structure, functional characterization, and evolution of the dihydroorotase domain of human CAD", *Structure*, 22: 185-98.
- Grañé-Boladeras, N., C. M. Spring, W. J. Hanna, M. Pastor-Anglada, y I. R. Coe. (2016). "Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir", *Cell Mol Life Sci*, 73: 4559-75.
- Grañé-Boladeras, N., D. Williams, Z. Tarmakova, K. Stevanovic, L. A. Villani, P. Mehrabi, K. W. M. Siu, M. Pastor-Anglada, y I. R. Coe. (2019). "Oligomerization of equilibrative nucleoside transporters: a novel regulatory and functional mechanism involving PKC and PP1", *FASEB J*, 33: 3841-50.
- Graves, L. M., H. I. Guy, P. Kozlowski, M. Huang, E. Lazarowski, R.M. Pope, M.A. Collins, E.N. Dahlstrand, H. Shelton Earp III, y D. R. Evans. (2000). "Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase", *Nature*, 403: 328-32.
- Graves, L.M., H.I. Guy, P. Kozlowski, M. Huang, E. Lazarowski, R.M. Pope, M.A. Collins, E.N. Dahlstrand, H.S. Earp, y D.R. Evans. (2000). "Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase", *Nature*, 403: 328–32.

Gudinchet, F., R. A. Maeder P Fau - Meuli, T. Meuli Ra Fau - Deonna, J. M. Deonna T Fau - Mathieu, y J. M. Mathieu. (1992). "Cranial CT and MRI in malignant phenylketonuria", *Pediatric radiology*, 22: 223–24.

H

Hamilton, S. R., S. Y. Yao, J. C. Ingram, D. A. Hadden, M. W. Ritzel, M. P. Gallagher, P. J. Henderson, C. E. Cass, J. D. Young, y S. A. Baldwin. (2001). "Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1", *J Biol Chem*, 276: 27981-8.

Harley, E. H.; S.; Sacks, P.; Berman, L.; Cohen, H. A.; Simmonds, L. D.; Fairbanks, y D. Black. (1986). "Source and fate of circulating pyrimidines", *Adv Exp Med Biol*, 195 Pt A:109-13.

Hasegawa, H., K. Sawabe, N. Nakanishi, y O. K. Wakasugi. (2005). "Delivery of exogenous tetrahydrobiopterin (BH4) to cells of target organs: role of salvage pathway and uptake of its precursor in effective elevation of tissue BH4", *Mol Genet Metab*, 86 Suppl 1: S2-10.

He, J., L. N. Zou, V. Pareek, y S. J. Benkovic. (2022). "Multienzyme interactions of the de novo purine biosynthetic protein PAICS facilitate purinosome formation and metabolic channeling", *J Biol Chem*, 298: 101853.

Herz, F.; Schermer, A. y Koss, L.G. (1979) "Short-term Culture of Epithelial Cells from Urine of Adults". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1979;161(2):153-157.

Hirschi, M., Z. L. Johnson, y S. Y. Lee. (2017). "Visualizing multistep elevator-like transitions of a nucleoside transporter", *Nature*, 545: 66-70.

Hofer, A., M. Crona, D. T. Logan, y B. M. Sjoberg. (2012). "DNA building blocks: keeping control of manufacture", *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47: 50-63.

Hoshiga, M., K. Hatakeyama, M. Watanabe, M. Shimada, y H. Kagamiyama. (1993). "Autoradiographic distribution of [¹⁴C]tetrahydrobiopterin and its developmental change in mice", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267: 971.

Hoxhaj, G., J. Hughes-Hallett, R. C. Timson, E. Ilagan, M. Yuan, J. M. Asara, I. Ben-Sahra, y B. D. Manning. (2017). "The mTORC1 Signaling Network Senses Changes in Cellular Purine Nucleotide Levels", *Cell Rep*, 21: 1331-46.

Huang, R. F., Y. H. Ho, H. L. Lin, J. S. Wei, y T. Z. Liu. (1999). "Folate deficiency induces a cell cycle-specific apoptosis in HepG2 cells", *J Nutr*, 129: 25-31.

Huennekens, F. M. (1994). "The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents", *Advances in enzyme regulation*, 34: 397–419.

I

Ichinose, Hiroshi, Takahide Nomura, y Chiho Sumi-Ichinose. (2008). "Metabolism of tetrahydrobiopterin: Its relevance in monoaminergic neurons and neurological disorders", 8: 378-85.

J

James, S. J., B. J. Miller, A. G. Basnakian, I. P. Pogribny, M. Pogribna, y L. Muskhelishvili. (1997). "Apoptosis and proliferation under conditions of deoxynucleotide pool imbalance in liver of folate/methyl deficient rats", *Carcinogenesis*, 18: 287-93.

- James, S. J.; , B. J. Miller, R. R.; Cross, L. J.; McGarrity, y S. M Morris. (1993). "The Essentiality of Folate for the Maintenance of dNTPs precursors pools", *Enviromental Health Perspectives*, 101: 173-78.
- Jennings, L. L., C. Hao, M. A. Cabrita, M. F. Vickers, S. A. Baldwin, J. D. Young, y C. E. Cass. (2000). "Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside", *Neuropharmacology*, 40(5): 722–31.
- Jiang, M., Y. Song, H. Liu, Y. Jin, R. Li, y X. Zhu. (2023). "DHODH Inhibition Exerts Synergistic Therapeutic Effect with Cisplatin to Induce Ferroptosis in Cervical Cancer through Regulating mTOR Pathway", *Cancers (Basel)*, 15.
- Jing, X., X. J. Wang, T. Zhang, W. Zhu, Y. Fang, H. Wu, X. Liu, D. Ma, X. Ji, Y. Jiang, K. Liu, X. Chen, Y. Shi, Y. Zhang, M. Shi, W. Qiu, y R. Zhao. (2019). "Cell-Cycle-Dependent Phosphorylation of PRPS1 Fuels Nucleotide Synthesis and Promotes Tumorigenesis", *Cancer Res*, 79: 4650-64.
- Jinnah, H. A. (2009). "Lesch-Nyhan disease: from mechanism to model and back again", *Dis Model Mech*, 2: 116-21.
- Johnson, Z. L., C. G. Cheong, y S. Y. Lee. (2012). "Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å", *Nature*, 483: 489-93.
- Jurecka, A. (2009). "Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism", *J Inherit Metab Dis*, 32: 247.

K

- Kaufman, S. (1967). "Pteridine Cofactors", *Annual Review of Biochemistry*, 36: 171-84.
- Kaufman, Seymour. (1964). "Studies on the Structure of the Primary Oxidation Product Formed from Tetrahydropteridines during Phenylalanine Hydroxylation", *Journal of Biological Chemistry*, 239: 332-38.
- Keshet, R., P. Szlosarek, A. Carracedo, y A. Erez. (2018). "Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism", *Nat Rev Cancer*, 18: 634-45.
- Kilic, F., y G. Rudnick. (2000). "Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10.1073.
- Klein, K., G. A. Kullak-Ublick, M. Wagner, M. Trauner, y J. J. Eloranta. (2009). "Hepatocyte nuclear factor-4alpha and bile acids regulate human concentrative nucleoside transporter-1 gene expression", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296: G936-47.
- Kocabas, A. M., G. Rudnick, y F. Kilic. (2003). "Functional consequences of homo- but not hetero-oligomerization between transporters for the biogenic amine neurotransmitters", *J Neurochem*, 85: 1513-20.
- Kure, Shigeo, Dian-Chang Hou, Toshihiro Ohura, Hiroko Iwamoto, Shuhei Suzuki, Naruji Sugiyama, Osamu Sakamoto, Kunihiro Fujii, Yoichi Matsubara, y Kuniaki Narisawa. (1999). "Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency", *The Journal of Pediatrics*, 135: 375-78.
- Kwon, N. S., C. F. Nathan, y D. J. Stuehr. (1989). "Reduced Biopterin as a Cofactor in the Generation of Nitrogen Oxides by Murine Macrophages", *Journal of Biological Chemistry*, 264: 20496-501.
- Kyoung, M., S. J. Russell, C. L. Kohnhorst, N. N. Esemoto, y S. An. (2015). "Dynamic architecture of the purinosome involved in human de novo purine biosynthesis", *Biochemistry*, 54: 870-80.

L

- Labuschagne, C. F., N. J. van den Broek, G. M. Mackay, K. H. Vousden, y O. D. Maddocks. (2014). "Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells", *Cell Rep*, 7: 1248-58.

- Lai, Y., A. H. Bakken, y J. D. Unadkat. (2002). "Simultaneous expression of hCNT1-CFP and hENT1-YFP in Madin-Darby canine kidney cells. Localization and vectorial transport studies", *J Biol Chem*, 277: 37711-7.
- Lai, Y., C. M. Tse, y J. D. Unadkat. (2004). "Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs", *J Biol Chem*, 279: 4490-7.
- Lan, X., M. S. Field, y P. J. Stover. (2018). "Cell cycle regulation of folate-mediated one-carbon metabolism", *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 10: e1426.
- Lane, A. N., y T. W. Fan. (2015). "Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis", *Nucleic Acids Res*, 43: 2466-85.
- Larrayoz, I. M., F. J. Casado, M. Pastor-Anglada, y M. P. Lostao. (2004). "Electrophysiological characterization of the human Na(+)/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function", *J Biol Chem*, 279: 8999-9007.
- Lee, E. W., Y. Lai, H. Zhang, y J. D. Unadkat. (2006). "Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fluridine", *J Biol Chem*, 281: 16700-6.
- Lee, W. D., A. C. Pirona, B. Sarvin, A. Stern, K. Nevo-Dinur, E. Besser, N. Sarvin, S. Lagziel, D. Mukha, S. Raz, E. Aizenshtein, y T. Shlomi. (2021). "Tumor Reliance on Cytosolic versus Mitochondrial One-Carbon Flux Depends on Folate Availability", *Cell Metab*, 33: 190-98 e6.
- Leeming, R. J., A. Pollock, L. J. Melville, y C. G. B. Hamon. (1990). "Measurement of 5-methyltetrahydrofolic acid in man by high-performance liquid chromatography", *Metabolism*, 39: 902-04.
- Leeming, R.J.; y S.K. Hall. (2010). "Dihydropteridine reductase and Folate Metabolism Revisited", *Pteridines*, 21: 84-85.
- Lehtinen, L., K. Ketola, R. Mäkelä, J-P. Mpindi, M. Viitala, O. Kallioniemi, y K. Iljin. (2012). "High-throughput RNAi screening for novel modulators of vimentin expression identifies MTHFD2 as a regulator of breast cancer cell migration and invasion", *Oncotarget*, 4: 48-63.
- Leisewitz, A. V., E. I. Zimmerman, M. Huang, S. Z. Jones, J. Yang, y L. M. Graves. (2011). "Regulation of ENT1 expression and ENT1-dependent nucleoside transport by c-Jun N-terminal kinase", *Biochem Biophys Res Commun*, 404: 370-5.
- Lesch, Michael, y William L. Nyhan. (1964). "A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function", *The American Journal of Medicine*, 36: 561-70.
- Li, J., S. Huang, J. Chen, Z. Yang, X. Fei, M. Zheng, C. Ji, Y. Xie, y Y. Mao. (2007). "Identification and characterization of human uracil phosphoribosyltransferase (UPRTase)", *Journal of human genetics*, 52(5): 415-22.
- Lin, J. G., S. Kourtis, R. Ghose, N. Pardo Lorente, S. Kubicek, y S. Sdelci. (2022). "Metabolic modulation of transcription: The role of one-carbon metabolism", *Cell Chem Biol*.
- Liu, Feng, Yang Liu, Chuan He, Li Tao, Xiaoguang He, Hongtao Song, y Guoqiang Zhang. (2014). "Increased MTHFD2 expression is associated with poor prognosis in breast cancer", *Tumor Biology*, 35: 8685-90.
- Liu, Y. C., F. Li, J. Handler, C. R. Huang, Y. Xiang, N. Neretti, J. M. Sedivy, K. I. Zeller, y C. V. Dang. (2008). "Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc", *PLoS One*, 3: e2722.
- Longley, D. B., D. P. Harkin, y P. G. Johnston. (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies", *Nat Rev Cancer*, 3: 330-8.
- Lovenberg, W.; Jequier, A. y Sjoerdsma. (1967). "Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor". *Science* 155. 217-219.

M

- Mackey, J. R., C. M. Galmarini, K. A. Graham, A. A. Joy, A. Delmer, L. Dabbagh, D. Glubrecht, L. D. Jewell, R. Lai, T. Lang, J. Hanson, J. D. Young, H. Merle-Beral, J. L. Binet, C. E. Cass, y C. Dumontet. (2005). "Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations", *Blood*, 105: 767-74.
- Mailloux, R. J. (2015). "Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species", *Redox Biol*, 4: 381-98.
- Mangravite, L. M., J. H. Lipschutz, K. E. Mostov, y K. M. Giacomini. (2001). "Localization of GFP-tagged concentrative nucleosidetransporters in a renal polarized epithelial cell line", *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 280: F879–F885.
- Mangravite, L. M., G. Xiao, y K. M. Giacomini. (2003). "Localization of human equilibrative nucleoside transporters, hENT1 and hENT2, in renal epithelial cells", *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 284: F902–F910.
- Mani, R. S., J. R. Hammond, J. M. Marjan, K. A. Graham, J. D. Young, S. A. Baldwin, y C. E. Cass. (1998). "Demonstration of equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and hENT2) in nuclear envelopes of cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells by functional reconstitution in proteoliposomes", *J Biol Chem*, 273: 30818-25.
- Mannava, S., V. Grachtchouck, L. J. Wheeler, M. Im, D. Zhuang, E. G. Slavina, C. K. Mathews, D. S. Shewach, y M. A. Nikiforov. (2008). "Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells", *Cell Cycle*, 7: 2392–400.
- Martinez-Becerra, P., J. Vaquero, M. R. Romero, E. Lozano, C. Anadon, R. I. Macias, M. A. Serrano, N. Grane-Boladeras, L. Munoz-Bellvis, L. Alvarez, B. Sangro, M. Pastor-Anglada, y J. J. Marin. (2012). "No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors", *Mol Pharm*, 9: 1693-704.
- Mathews, C. K. (2015). "Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer", *Nat Rev Cancer*, 15: 528-39.
- McGee, M. M.; Greengard, O.; Knox, W. E. (1972). "The quantitative determination of phenylalanine hydroxylase in rat tissues. Its developmental formation in liver", *Biochem. J.*, 127: 669-74.
- Medina-Pulido, L., M. Molina-Arcas, C. Justicia, E. Soriano, F. Burgaya, A. M. Planas, y M. Pastor-Anglada. (2013). "Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells", *Biochem J*, 454: 437-45.
- Mehrmohamadi, M., X. Liu, A. A. Shestov, y J. W. Locasale. (2014). "Characterization of the usage of the serine metabolic network in human cancer", *Cell Rep*, 9: 1507-19.
- Meiser, J., S. Tumanov, O. Maddocks, C. F. Labuschagne, D. Athineos, N. Van Den Broek, G. M. Mackay, E. Gottlieb, K. Blyth, K. Vousden, J. J. Kamphorst, y A. Vazquez. (2016). "Serine one-carbon catabolism with formate overflow", *Sci Adv*, 2: e1601273.
- Mitchell, S., J. Vargas, y A. Hoffmann. (2016). "Signaling via the NFkappaB system", *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 8: 227-41.
- Mohelnikova-Duchonova, B., V. Brynychova, V. Hlavac, M. Kocik, M. Oliverius, J. Hlavsa, E. Honsova, J. Mazanec, Z. Kala, B. Melichar, y P. Soucek. (2013). "The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer", *Cancer Chemother Pharmacol*, 72: 669-82.

- Molina-Arcas, M., B. Bellosillo, F. J. Casado, E. Montserrat, J. Gil, D. Colomer, y M. Pastor-Anglada. (2003). "Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia", *Blood*, 101: 2328-34.
- Moreno-Morcillo, M., A. Grande-Garcia, A. Ruiz-Ramos, F. Del Cano-Ochoa, J. Boskovic, y S. Ramon-Maiques. (2017). "Structural Insight into the Core of CAD, the Multifunctional Protein Leading De Novo Pyrimidine Biosynthesis", *Structure*, 25: 912-23 e5.
- Morote-Garcia, J. C., D. Kohler, J. M. Roth, V. Mirakaj, T. Eldh, H. K. Eltzschig, y P. Rosenberger. (2013). "Repression of the equilibrative nucleoside transporters dampens inflammatory lung injury", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49: 296-305.
- Morote-Garcia, J. C., P. Rosenberger, N. M. Nivillac, I. R. Coe, y H. K. Eltzschig. (2009). "Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia", *Gastroenterology*, 136: 607-18.
- Mulinta, R., S. Y. M. Yao, A. M. L. Ng, C. E. Cass, y J. D. Young. (2017). "Substituted cysteine accessibility method (SCAM) analysis of the transport domain of human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) and other family members reveals features of structural and functional importance", *J Biol Chem*, 292: 9505-22.
- Muntau, A. C., M. du Moulin, y F. Feillet. (2018). "Diagnostic and therapeutic recommendations for the treatment of hyperphenylalaninemia in patients 0-4 years of age", *Orphanet J Rare Dis*, 13: 173.
- Murphy, M., M. Keating, P. Boyle, D. G. Weir, y J. M. Scott. (1976). "The elucidation of the mechanism of folate catabolism in the rat", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71: 1017-24.
- Musmanno, Lisa A., Robert S. Jamison, Richard S. Barnett, Edward Buford, y Jeffrey N. Davidson. (1992). "Complete hamster CAD protein and the carbamylphosphate synthetase domain of CAD complement mammalian cell mutants defective in de novo pyrimidine biosynthesis", *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 18: 309-18.

N

- Nagatsu, Toshiharu, Morton Levitt, y Sidney Udenfriend. (1964). "Tyrosine Hydroxylase", *Journal of Biological Chemistry*, 239: 2910-17.
- Nilsson, R., M. Jain, N. Madhusudhan, N. G. Sheppard, L. Strittmatter, C. Kampf, J. Huang, A. Asplund, y V. K. Mootha. (2014). "Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer", *Nat Commun*, 5: 3128.
- Nilsson, K., Klein, G., Henle, W. y Henle, G. (1971) "The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV". *Int. J. Cancer* 8, 443–450
- Nordlund, P., y P. Reichard. (2006). "Ribonucleotide Reductases", 75: 681-706.
- Nothmann, D., A. Leinenweber, D. Torres-Salazar, P. Kovermann, J. Hotzy, A. Gameiro, C. Grewer, y C. Fahlke. (2011). "Hetero-oligomerization of neuronal glutamate transporters", *J Biol Chem*, 286: 3935-43.

O

- Oeckinghaus, A., y S. Ghosh. (2009). "The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation", *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a000034.
- Ohashi, A., M. Fukumuro, K. Sawabe, K. Mamada, Y. Sugawara, H. Matsuoka, y H. Hasegawa. (2009). "Transcellular relocation of tetrahydrobiopterin across Caco-

- 2 cells: a model study of tetrahydrobiopterin absorption through epithelial cells of intestinal mucosa", *J Inherit Metab Dis*, 32: 73-8.
- Ohashi, A., K. Mamada, T. Harada, M. Naito, T. Takahashi, S. Aizawa, y H. Hasegawa. (2017). "Organic anion transporters, OAT1 and OAT3, are crucial biopterin transporters involved in bodily distribution of tetrahydrobiopterin and exclusion of its excess", *Mol Cell Biochem*, 435: 97-108.
- Ohashi, A., Y. Sugawara, K. Mamada, Y. Harada, T. Sumi, N. Anzai, S. Aizawa, y H. Hasegawa. (2011). "Membrane transport of sepiapterin and dihydrobiopterin by equilibrative nucleoside transporters: a plausible gateway for the salvage pathway of tetrahydrobiopterin biosynthesis", *Mol Genet Metab*, 102: 18-28.
- Opladen, T., G. F. Hoffmann, y N. Blau. (2012). "An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia", *J Inherit Metab Dis*, 35: 963-73.
- Opladen, T., E. Lopez-Laso, E. Cortes-SaladelaFont, T. S. Pearson, H. S. Sivri, Y. Yildiz, B. Assmann, M. A. Kurian, V. Leuzzi, S. Heales, S. Pope, F. Porta, A. Garcia-Cazorla, T. Honzik, R. Pons, L. Regal, H. Goetz, R. Artuch, G. F. Hoffmann, G. Horvath, B. Thony, S. Scholl-Burgi, A. Burlina, M. M. Verbeek, M. Mastrangelo, J. Friedman, T. Wassenberg, K. Jeltsch, J. Kulhanek, O. Kuseyri Hubschmann, y Disorders International Working Group on Neurotransmitter related. (2020). "Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH(4)) deficiencies", *Orphanet J Rare Dis*, 15: 126.
- Ormazabal, A., A. Garcia-Cazorla, B. Perez-Duenas, V. Gonzalez, E. Fernandez-Alvarez, M. Pineda, J. Campistol, y R. Artuch. (2006). "Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients: reference values for a paediatric population", *Clin Chim Acta*, 371: 159-62.
- Ormazabal, A., B. Perez-Duenas, C. Sierra, R. Urreizti, J. Montoya, M. Serrano, J. Campistol, A. Garcia-Cazorla, M. Pineda, y R. Artuch. (2011). "Folate analysis for the differential diagnosis of profound cerebrospinal fluid folate deficiency", *Clin Biochem*, 44: 719-21.

P

- Pareek, V., A. M. Pedley, y S. J. Benkovic. (2021). "Human de novo purine biosynthesis", *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 56: 1-16.
- Pastor-Anglada, M., P. Cano-Soldado, E. Errasti-Murugarren, y F. J. Casado. (2008). "SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins", *Xenobiotica*, 38: 972-94.
- Pastor-Anglada, M., y S. Perez-Torras. (2015). "Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets", *Front Pharmacol*, 6: 13.
- . (2018). "Emerging Roles of Nucleoside Transporters", *Front Pharmacol*, 9: 606.
- Pastor-Anglada, M., N. Urtasun, y S. Perez-Torras. (2018). "Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation", *Compr Physiol*, 8: 1003-17.
- Pavathuparambil Abdul Manaph, N., M. Al-Hawwas, L. Bobrovskaya, P. T. Coates, y X. F. Zhou. (2018). "Urine-derived cells for human cell therapy", *Stem Cell Res Ther*, 9: 189.
- Pedley, A. M., y S. J. Benkovic. (2017). "A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome", *Trends Biochem Sci*, 42: 141-54.
- Pelletier, J. N., y R. E. MacKenzie. (1995). "Binding and interconversion of tetrahydrofolates at a single site in the bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase", *Biochemistry*, 34: 12673-80.
- Pennycooke, M., N. Chaudary, I. Shuralyova, Y. Zhang, y I. R. Coe. (2001). "Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue", *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 951-9.

- Perez-Torras, S., A. Mata-Ventosa, B. Drogemoller, M. Tarailo-Graovac, J. Meijer, R. Meinsma, A. G. van Cruchten, W. Kulik, A. Viel-Oliva, A. Bidon-Chanal, C. J. Ross, W. W. Wassermann, C. D. M. van Karnebeek, M. Pastor-Anglada, y A. B. P. van Kuilenburg. (2019). "Deficiency of perforin and hCNT1, a novel inborn error of pyrimidine metabolism, associated with a rapidly developing lethal phenotype due to multi-organ failure", *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865: 1182-91.
- Perez-Torras, S., A. Vidal-Pla, P. Cano-Soldado, I. Huber-Ruano, A. Mazo, y M. Pastor-Anglada. (2013). "Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner", *Cell Death Dis*, 4: e648.
- Pérignon, Jean-Louis, Dominique M. Bories, Anne-Marie Houllier, Laure Thuillier, y Pierre H. Cartier. (1987). "Metabolism of pyrimidine bases and nucleosides by pyrimidine-nucleoside phosphorylases in cultured human lymphoid cells", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 928: 130-36.
- Persaud, A. K., M. C. Bernier, M. A. Massey, S. Agrawal, T. Kaur, D. Nayak, Z. Xie, B. Weadick, R. Raj, K. Hill, N. Abbott, A. Joshi, N. Anabtawi, C. Bryant, A. Somogyi, Z. Cruz-Monserrate, F. Amari, V. Coppola, A. Sparreboom, S. D. Baker, J. D. Unadkat, M. A. Phelps, y R. Govindarajan. (2023). "Increased renal elimination of endogenous and synthetic pyrimidine nucleosides in concentrative nucleoside transporter 1 deficient mice", *Nat Commun*, 14: 3175.
- Persaud, A. K., S. Nair, M. F. Rahman, R. Raj, B. Weadick, D. Nayak, C. McElroy, M. Shanmugam, S. Knoblauch, X. Cheng, y R. Govindarajan. (2021). "Facilitative lysosomal transport of bile acids alleviates ER stress in mouse hematopoietic precursors", *Nat Commun*, 12: 1248.
- Pfeiffer, C. M., Les Fazili Z Fau - McCoy, Ming McCoy L Fau - Zhang, Elaine W. Zhang M Fau - Gunter, y E. W. Gunter. (2003). "Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay", *Clin Chem*, 50(2):423-32.
- Plenge, Per, Erling T. Møllerup, y Mogens Nielsen. (1990). "Inhibitory and regulatory binding sites on the rat brain serotonin transporter: molecular weight of the [3H]paroxetine and [3H]citalopram binding proteins", *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 189: 129-34.
- Pogribny, I. P., B. J. Basnakian Ag Fau - Miller, N. G. Miller Bj Fau - Lopatina, L. A. Lopatina Ng Fau - Poirier, S. J. Poirier La Fau - James, y S. J. James. (1995). "Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats", *Cancer Res*, 1;5: 1894-901.
- Pollock, R. J.; Kaufman, S., y S. Kaufman. (1978). "Dihydropteridine reductase may function in tetrahydrofolate metabolism", *Journal of Neurochemistry*, 31: p. 115-23.
- Ponzone, A., M. Spada, S. Ferraris, I. Dianzani, y L. de Sanctis. (2004). "Dihydropteridine reductase deficiency in man: from biology to treatment", *Med Res Rev*, 24: 127-50.
- Pope, S., R. Artuch, S. Heales, y S. Rahman. (2019). "Cerebral folate deficiency: Analytical tests and differential diagnosis", *J Inherit Metab Dis*, 42: 655-72.
- Powell, R. D., P. J. Holland, T. Hollis, y F. W. Perrino. (2011). "Aicardi-Goutieres syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase", *J Biol Chem*, 286: 43596-600.

R

- Rabinovich, S., L. Adler, K. Yizhak, A. Sarver, A. Silberman, S. Agron, N. Stettner, Q. Sun, A. Brandis, D. Helbling, S. Korman, S. Itzkovitz, D. Dimmock, I. Ulitsky, S.

- C. Nagamani, E. Ruppin, y A. Erez. (2015). "Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis", *Nature*, 527: 379-83.
- Ratanasthien, K.; Blair, J.A.; Leeming, R. J. ; Cooke, W. T.; Melikian, V. (1974). "Ratahasthien Folates in human serum", *J. Clin. Path*, 27: 875-79.
- Reed, Lynn S., y Michael C. Archer. (1980). "Oxidation of tetrahydrofolic acid by air", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28: 801-05.
- Reyes, G., N. M. Nivillac, M. Z. Karim, L. Desouza, K. W. Siu, y I. R. Coe. (2011). "The Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT1) can be phosphorylated at multiple sites by PKC and PKA", *Mol Membr Biol*, 28: 412-26.
- Ritzel, M. W., A. M. Ng, S. Y. Yao, K. Graham, S. K. Loewen, K. M. Smith, R. G. Ritzel, D. A. Mowles, P. Carpenter, X. Z. Chen, E. Karpinski, R. J. Hyde, S. A. Baldwin, C. E. Cass, y J. D. Young. (2001). "Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib)", *J Biol Chem*, 276: 2914-27.
- Ritzel, M. W., S. Y. Yao, M. Y. Huang, J. F. Elliott, C. E. Cass, y J. D. Young. (1997). "Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1)", 272: C707-C14.
- Ritzel, M. W., S. Y. Yao, A. M. Ng, J. R. Mackey, C. E. Cass, y J. D. Young. (1998). "Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine", *Mol Membr Biol*, 15: 203-11.
- Robitaille, A.M., S. Christen, M. Shimobayashi, M. Cornu, L.L. Fava, S. Moes, C. Prescianotto-Baschong, U. Sauer, P. Jenoe, y M.N. Hall. (2013). "Quantitative Phosphoproteomics Reveal mTORC1 Activates de NovoPyrimidine Synthesis", *Science*, 339: 1320-23.
- Rodriguez-Mulero, S., E. Errasti-Murugarren, J. Ballarin, A. Felipe, A. Doucet, F. J. Casado, y M. Pastor-Anglada. (2005). "Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: effect of diabetes", *Kidney Int*, 68: 665-72.

S

- Sato, T., H. Akasu, W. Shimono, C. Matsu, Y. Fujiwara, Y. Shibagaki, J. J. Heard, F. Tamanoi, y S. Hattori. (2015). "Rheb protein binds CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, and dihydroorotase) protein in a GTP- and effector domain-dependent manner and influences its cellular localization and carbamoyl-phosphate synthetase (CPSase) activity", *J Biol Chem*, 290: 1096-105.
- Satoh, K., S. Yachida, M. Sugimoto, M. Oshima, T. Nakagawa, S. Akamoto, S. Tabata, K. Saitoh, K. Kato, S. Sato, K. Igarashi, Y. Aizawa, R. Kajino-Sakamoto, Y. Kojima, T. Fujishita, A. Enomoto, A. Hirayama, T. Ishikawa, M. M. Taketo, Y. Kushida, R. Haba, K. Okano, M. Tomita, Y. Suzuki, S. Fukuda, M. Aoki, y T. Soga. (2017). "Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E7697-E706.
- Sawabe, K., Y. Suetake, N. Nakanishi, K. O. Wakasugi, y H. Hasegawa. (2005). "Cellular accumulation of tetrahydrobiopterin following its administration is mediated by two different processes; direct uptake and indirect uptake mediated by a methotrexate-sensitive process", *Mol Genet Metab*, 86 Suppl 1: S133-8.
- Sawabe, K., K. Yamamoto, Y. Harada, A. Ohashi, Y. Sugawara, H. Matsuoka, y H. Hasegawa. (2008). "Cellular uptake of sepiapterin and push-pull accumulation of tetrahydrobiopterin", *Mol Genet Metab*, 94: 410-16.

- Sawabe, K.; Wakasugi, K.O.; Hasegawa, H. (2004). "Tetrahydrobiopterin Uptake in Supplemental Administration", *J Pharmacol Sci*, 96, 124 – 133.
- Scaub, J., S. Daumling, H. C. Curtius, A. Niederwieser, K. Bartholomes, M. Viscontini, y J. H. Bieri. (1978). "Tetrahydrobiopterin therapy of atypical phenylketonuria due to defective dihydrobiopterin biosynthesis", *Archives of Disease in Childhood*, 53: 674-83.
- Schirch, Verne, y William B. Strong. (1989). "Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 269: 371-80.
- Schmidt, H., R. Ullrich K Fau - Korinthenberg, P. E. Korinthenberg R Fau - Peters, y P. E. Peters. (1988). "Basal ganglion calcification in hyperphenylalaninemia due to deficiency of dihydropteridine reductase", *Pediatric radiology*, 19: 54–56.
- Seegmiller, J. E.; F. M.; Rosenbloom, y W. N. Kelley. (1967). "Enzyme Defect Associated with a Sex-Linked Human Neurological Disorder and Excessive Purine Synthesis", *Science*, 155: 1682-84.
- Smith, I., y J. Lloyd. (1974). "Atypical phenylketonuria accompanied by a severe progressive neurological illness unresponsive to dietary treatmentpdf", *Pediatric Research Society*: 245.
- Smith, K. M., M. D. Slugoski, S. K. Loewen, A. M. Ng, S. Y. Yao, X. Z. Chen, E. Karpinski, C. E. Cass, S. A. Baldwin, y J. D. Young. (2005). "The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics", *J Biol Chem*, 280: 25436-49.
- Smith, Margaret L., y John M. Buchanan. (1979). "Nucleotide and pentose synthesis after serum-stimulation of resting 3T6 fibroblasts", 101: 293-309.
- Snider, J., S. Kittanakom, D. Damjanovic, J. Curak, V. Wong, y I. Stagljär. (2010). "Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast", *Nat Protoc*, 5: 1281-93.
- Springer, S., P. Malkus, B. Borchert, U. Wellbrock, R. Duden, y R. Schekman. (2014). "Regulated oligomerization induces uptake of a membrane protein into COPII vesicles independent of its cytosolic tail", *Traffic*, 15: 531-45.
- Spurr, I. B., C. N. Birts, F. Cuda, S. J. Benkovic, J. P. Blaydes, y A. Tavassoli. (2012). "Targeting tumour proliferation with a small-molecule inhibitor of AICAR transformylase homodimerization", *Chembiochem*, 13: 1628-34.
- Staats Pires, A., B. Heng, V. X. Tan, A. Latini, M. A. Russo, D. M. Santarelli, D. Bailey, K. Wynne, J. A. O'Brien, G. J. Guillemin, y P. J. Austin. (2020). "Kynurenine, Tetrahydrobiopterin, and Cytokine Inflammatory Biomarkers in Individuals Affected by Diabetic Neuropathic Pain", *Front Neurosci*, 14: 890.
- Stecula, A., A. Schlessinger, K. M. Giacomini, y A. Sali. (2017). "Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 (hCNT3, SLC28A3) Forms a Cyclic Homotrimer", *Biochemistry*, 56: 3475-83.
- Sweet, Douglas H. (2021). "Organic Cation Transporter Expression and Function in the CNS", *Handbook of experimental pharmacology*, 266: 41-80.

T

- Tayeh, M. A., y M. A. Marletta. (1989). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor", *J Biol Chem*, 25;264(33):19654-8.
- Tendi, E. A., M. Guarnaccia, G. Morello, y S. Cavallaro. (2022). "The Utility of Genomic Testing for Hyperphenylalaninemia", *J Clin Med*, 11.
- Thöny, Beat, y Nenad Blau. (2006). "Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase", 27: 870-78.

- Tibbetts, A. S., y D. R. Appling. (2010). "Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism", *Annu Rev Nutr*, 30: 57-81.
- Tietz, Alisa, M. Lindberg, y Eugene P. Kennedy. (1964). "A New Pteridine-requiring Enzyme System for the Oxidation of Glyceryl Ethers", *Journal of Biological Chemistry*, 239: 4081-90.
- Tong, X., F. Zhao, y C. B. Thompson. (2009). "The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells", *Curr Opin Genet Dev*, 19: 32-7.
- Torres, G. E., A. Carneiro, K. Seamans, C. Fiorentini, A. Sweeney, W. D. Yao, y M. G. Caron. (2003). "Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter", *J Biol Chem*, 278: 2731-9.
- Traut, T. W. (1994). "Physiological concentrations of purines and pyrimidines", *Mol Cell Biochem*, 9;140(1): 1-22.

U

- Urtasun, N., C. Boces-Pascual, L. Boix, J. Bruix, M. Pastor-Anglada, y S. Pérez-Torras. (2017). "Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma", *Oncotarget*, 8: 90185–96.

V

- Valdes, R., S. Fernandez-Veledo, I. Aymerich, F. J. Casado, y M. Pastor-Anglada. (2006). "TGF-beta transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells", *Cell Mol Life Sci*, 63: 2527-37.
- Valdes, R., M. A. Ortega, F. J. Casado, A. Felipe, A. Gil, A. Sanchez-Pozo, y M. Pastor-Anglada. (2000). "Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine", *Gastroenterology*, 119: 1623-30.
- Vander Heiden, M. G., y R. J. DeBerardinis. (2017). "Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology", *Cell*, 168: 657-69.
- Vega, J. L., C. Puebla, R. Vasquez, M. Farias, J. Alarcon, M. Pastor-Anglada, B. Krause, P. Casanello, y L. Sobrevia. (2009). "TGF-beta1 inhibits expression and activity of hENT1 in a nitric oxide-dependent manner in human umbilical vein endothelium", *Cardiovasc Res*, 82: 458-67.
- Vergis, J. M., K. G. Bullock, K. G. Fleming, y G. P. Beardsley. (2001). "Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity", *J Biol Chem*, 276: 7727-33.
- Villa, Elodie, Eunus Ali, Umakant Sahu, y Issam Ben-Sahra. (2019). "Cancer Cells Tune the Signaling Pathways to Empower de Novo Synthesis of Nucleotides", *Cancers*, 11.

W

- Wang, W., J. Cui, H. Ma, W. Lu, y J. Huang. (2021). "Targeting Pyrimidine Metabolism in the Era of Precision Cancer Medicine", *Front Oncol*, 11: 684961.
- Ward, J. L., G. P. Leung, S. V. Toan, y C. M. Tse. (2003). "Functional analysis of site-directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2", *Arch Biochem Biophys*, 411: 19-26.

- Watts, Richard W. E., Karl Engelman, James R. Klinenberg, J. Edwin Seegmiller, y Albert Sjoerdsma. (1964). "Enzyme Defect in a Case of Xanthinuria", *Nature*, 201: 395-96.
- Werner, E. R., N. Blau, y B. Thony. (2011). "Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology", *Biochem J*, 438: 397-414.
- Werner, Ernst R. (2013). "Three classes of tetrahydrobiopterin-dependent enzymes", *Pteridines*, 24: 7-11.
- Wilquet, V., M. Van de Castele, D. Gigot, C. Legrain, y N. Glansdorff. (2004). "Dihydropteridine reductase as an alternative to dihydrofolate reductase for synthesis of tetrahydrofolate in *Thermus thermophilus*", *J Bacteriol*, 186: 351-5.
- Wishart, D. S., Y. D. Feunang, A. Marcu, A. C. Guo, K. Liang, R. Vázquez-Fresno, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, N. Karu, Z. Sayeeda, E. Lo, N. Assempour, M. Berjanskii, S. Singhal, D. Arndt, Y. Liang, H. Badran, J. Grant, A. Serra-Cayuela, Y. Liu, R. Mandal, V. Neveu, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, C. Manach, y A. Scalbert. (2018). "HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018", *Nucleic acids research*, 46: D608–D17.
- Woeller, C. F., D. D. Anderson, D. M. Szebenyi, y P. J. Stover. (2007). "Evidence for small ubiquitin-like modifier-dependent nuclear import of the thymidylate biosynthesis pathway", *J Biol Chem*, 282: 17623-31.
- Woody, R. C., C. Brewster Ma Fau - Glasier, y C. Glasier. (1989). "Progressive intracranial calcification in dihydropteridine reductase deficiency prior to folic acid therapy", *Neurology*, 39: 673-5.
- Wright, A. J., J. R. Dainty, y P. M. Finglas. (2007). "Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK", *Br J Nutr*, 98: 667-75.
- Wright, N. J., y S. Y. Lee. (2019). "Structures of human ENT1 in complex with adenosine reuptake inhibitors", *Nat Struct Mol Biol*, 26: 599-606.

X

- Xu, F., Y. Sudo, S. Sanechika, J. Yamashita, S. Shimaguchi, S. Honda, C. Sumi-Ichinose, M. Mori-Kojima, R. Nakata, T. Furuta, M. Sakurai, M. Sugimoto, T. Soga, K. Kondo, y H. Ichinose. (2014). "Disturbed biopterin and folate metabolism in the Qdpr-deficient mouse", *FEBS Lett*, 588: 3924-31.
- Xu, Y., y C. R. Vakoc. (2017). "Targeting Cancer Cells with BET Bromodomain Inhibitors", *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(7): a026674.

Y

- Yamamoto, K., M. Nagano, N. Nakanishi, y H. Hasegawa. (1996). "A comparison of sepiapterin and tetrahydrobiopterin uptake by RBL2H3 cells", *Pteridines*, 7: 154-56.
- Yang, C., Y. Zhao, L. Wang, Z. Guo, L. Ma, R. Yang, Y. Wu, X. Li, J. Niu, Q. Chu, Y. Fu, y B. Li. (2023). "De novo pyrimidine biosynthetic complexes support cancer cell proliferation and ferroptosis defence", *Nat Cell Biol*, 25: 836-47.
- Yao, S. Y. M., y J. D. Young. (2018). "Inward- and outward-facing homology modeling of human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) predicts an elevator-type transport mechanism", *Channels (Austin)*, 12: 291-98.
- Yao, S. Y., A. M. Ng, C. E. Cass, S. A. Baldwin, y J. D. Young. (2011). "Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1)", *J Biol Chem*, 286: 32552-62.
- Yao, S. Y., M. W. Ng Am Fau - Ritzel, W. P. Ritzel Mw Fau - Gati, C. E. Gati Wp Fau - Cass, J. D. Cass Ce Fau - Young, y J. D. Young. (1996). "Transport of adenosine

- by recombinant purine- and pyrimidine-selective sodium/nucleoside cotransporters from rat jejunum expressed in *Xenopus laevis* oocytes", *Molecular pharmacology*, 50: 1529–35.
- Yee, S. W., J. E. Shima, S. Hesselson, L. Nguyen, S. De Val, R. J. Lafond, M. Kawamoto, S. J. Johns, D. Stryke, P. Y. Kwok, T. E. Ferrin, B. L. Black, D. Gurwitz, N. Ahituv, y K. M. Giacomini. (2009). "Identification and characterization of proximal promoter polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter 2 (SLC28A2)", *J Pharmacol Exp Ther*, 328: 699-707.
- Young, J. D., S. Y. Yao, J. M. Baldwin, C. E. Cass, y S. A. Baldwin. (2013). "The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29", *Mol Aspects Med*, 34: 529-47.
- Yubero, D., N. Brandi, A. Ormazabal, A. Garcia-Cazorla, B. Perez-Duenas, J. Campistol, A. Ribes, F. Palau, R. Artuch, J. Armstrong, y Group Working. (2016). "Targeted Next Generation Sequencing in Patients with Inborn Errors of Metabolism", *PLoS One*, 11: e0156359.

Z

- Zhang, Jing, Frank Visser, Karen M. King, Stephen A. Baldwin, James D. Young, y Carol E. Cass. (2007). "The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs", *Cancer and Metastasis Reviews*, 26: 85-110.
- Zheng, Y., y L. C. Cantley. (2019). "Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease", *J Exp Med*, 216: 253-66.
- Zheng, Y., T. Y. Lin, G. Lee, M. N. Paddock, J. Momb, Z. Cheng, Q. Li, D. L. Fei, B. D. Stein, S. Ramsamooj, G. Zhang, J. Blenis, y L. C. Cantley. (2018). "Mitochondrial One-Carbon Pathway Supports Cytosolic Folate Integrity in Cancer Cells", *Cell*, 175: 1546-60 e17.
- Zhou, Y., L. Liao, C. Wang, J. Li, P. Chi, Q. Xiao, Q. Liu, L. Guo, L. Sun, y D. Deng. (2020). "Cryo-EM structure of the human concentrative nucleoside transporter CNT3", *PLoS Biol*, 18: e3000790.