



Nuevas funciones de los transportadores concentrativos de nucleósidos CNT1 y CNT2

Lorena Medina Pulido

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.



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Nuevas funciones de los transportadores concentrativos de
nucleósidos CNT1 y CNT2**

Lorena Medina Pulido
Barcelona 2013

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA
UNIVERSITAT DE BARCELONA
PROGRAMA DE BIOMEDICINA (2008)
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTADA POR
LORENA MEDINA PULIDO

La interesada,

Lorena Medina Pulido

Visto bueno de los directores,

Dr. MARÇAL PASTOR ANGLADA

Catedrático de Bioquímica
Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular
Universitat de Barcelona

Dra. SANDRA PÉREZ TORRAS

Profesora Asociada e Investigadora
CIBERehd
Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular
Universitat de Barcelona

Índice general

Introducción

1. Transportadores de nucleósidos.....	3
1.1. Transportadores de nucleósidos equilibrativos (familia génica SLC29).....	4
1.2. Transportadores de nucleósidos concentrativos (familia génica SLC28).....	7
1.3. Papel farmacológico de los transportadores de nucleósidos.....	10
1.3.1. Fármacos antitumorales.....	11
1.3.2. Fármacos antivirales.....	13
1.4. Distribución tisular y regulación de los transportadores de nucleósidos....	15
1.4.1. Regulación de los transportadores de nucleósidos en el hígado....	21
1.4.2. Transportadores de nucleósidos en cerebro.....	24
1.4.2.1. Papel de la adenosina en el Sistema Nervioso Central.....	26
1.4.2.2. Receptores de adenosina en cerebro.....	27
2. De transportador a “transceptor”	29
2.1. hCNT1: modulador de la progresión tumoral.....	32
2.2. hCNT2: metabolismo celular.....	33
3. Metabolismo tumoral.....	35
3.1. Metabolismo glucídico tumoral.....	36
3.2. Metabolismo lipídico tumoral.....	39
3.3. Efecto del eje cdk4-E2F1-pRB sobre el metabolismo.....	39
Objetivos.....	45

Materiales y métodos

1. Cultivo Celular.....	49
1.1. Cultivo de líneas celulares.....	50
1.1.1. Tripsinización y replaqueo.....	51

1.1.2. Congelación y descongelación.....	52
1.2. Líneas celulares utilizadas.....	53
1.2.1. Línea celular PC-12.....	53
1.2.2. Líneas celulares BCLCs.....	54
1.2.3. Línea celular Hek293.....	54
1.2.4. Línea celular 911.....	55
1.2.5. Línea celular HHL5.....	55
1.3 Generación de líneas celulares estables.....	55
2. Tratamiento de los cultivos celulares.....	57
3. Técnica de Citometría.....	58
3.1. Análisis del perfil de ciclo celular.....	59
4. Transporte de nucleósidos.....	60
4.1. Medios de transporte.....	61
4.2. Ensayo de transporte de células en monocapa.....	62
4.3. Cálculos.....	63
5. Análisis de la expresión de proteínas.....	64
5.1. Obtención de proteína total a partir de cultivos celulares.....	64
5.2. Valoración de la concentración proteica.....	66
5.2.1. Método del ácido bicinonínico (BCA).....	66
5.2.2. Método Bradford.....	67
5.3. Electroforesis en SDS-PAGE.....	68
5.4. Western Blot.....	72
5.5. Inmunocitoquímica.....	77
5.6. CoInmunoprecipitación.....	79
6. Análisis del metabolismo celular.....	81
6.1. Cuantificación de la respiración celular.....	81
6.2. Determinación del lactato del medio de cultivo mediante lector de ELISA.....	85
6.3. Cuantificación del ATP intracelular.....	87
7. Técnicas de expresión heteróloga.....	88
7.1. Transfección con CaCl ₂	88

7.2. Transfección con transIT-siQUEST.....	89
8. Técnicas relacionadas con la manipulación del RNA.....	90
8.1. Obtención de RNA total.....	90
8.2. Cuantificación del RNA por espectrofotometría.....	91
8.3. Síntesis de cDNA: Retrotranscripción.....	91
8.4. <i>Real-Time</i> PCR (PCR a tiempo real).....	93
8.4.1. Cuantificación relativa de la expresión génica.....	97
8.4.2. Cuantificación absoluta de la expresión génica.....	97
9. Técnicas relacionadas con la manipulación del DNA.....	99
9.1. Aislamiento de DNA plasmídico.....	99
9.2. Análisis de DNA en geles de agarosa.....	99
9.3. Reacción de PCR.....	100
9.4. Digestión de los fragmentos de DNA con endonucleasas.....	101
9.5. Purificación del DNA.....	103
9.5.1. Purificación de banda de agarosa.....	103
9.5.2. Purificación de DNA por precipitación.....	103
9.6. Ligación de fragmentos de DNA.....	104
9.7. Secuenciación.....	105
10. Técnicas relacionadas con la manipulación de bacterias.....	107
10.1. Preparación de células competentes.....	107
10.2. Transformación por choque térmico.....	108
10.3. Transformación por electroporación.....	109
11. Técnicas relacionadas con la manipulación de adenovirus.....	109
11.1. Generación de adenovirus.....	109
11.1.1. Clonación del gen de interés en un vector lanzadera.....	109
11.1.2. Doble transformación del vector lanzadera y el genoma adenoviral.....	110
11.2. Amplificación de los adenovirus.....	111
11.3. Titulación de los stocks virales.....	112
11.4. Transducción de células en monocapa con adenovirus.....	113
12. <i>Wound-healing</i>.....	114

Resultados y discusión

1. Validar la interacción de hCNT1 con sus posibles proteínas <i>partner</i>.....	117
1.1. Validación de las interacciones de hCNT1 con RhoGDI2 y RACK1.....	119
1.1.1. Análisis de la expresión de la proteína RhoGDI2 en diferentes líneas celulares.....	119
1.1.2. Co-Inmunoprecipitación de hCNT1 y RhoGDI2.....	125
1.1.3. Co-Inmunoprecipitación de hCNT1 y Rack1.....	128
1.2. Expresión de hCNT1 y sus posibles proteínas <i>partner</i> en muestras de cáncer de colon (CRC).....	130
1.3. Análisis de la expresión de la proteína de hCNT1 en tumores de endometrio.....	134
2. Expresión y regulación del transportador concentrativos de nucleósidos CNT2 en un modelo neuronal.....	137
2.1. Diferenciación de la línea celular PC12.....	138
2.1.1. Caracterización de la línea celular PC12.....	139
2.1.2. Actividad de los transportadores de nucleósidos.....	140
2.2. Regulación purinérgica de CNT2.....	145
2.3. Activación de la AMPK.....	149
2.4. Regulación de CNT2 por hipoxia.....	153
2.5. Expresión de los transportadores de nucleósidos y receptores de adenosina en un modelo <i>in vivo</i> de isquemia cerebral de rata.....	154
3. Estudiar la implicación de hCNT2 en la regulación del metabolismo energético.....	159
3.1. Análisis de la actividad de tipo CNT2 en la línea celular no transformada HHL5.....	160
3.2. Análisis de la expresión y actividad de CNT2 en una batería de líneas tumorales (BCLC) derivadas de hepatocarcinoma humano.....	162

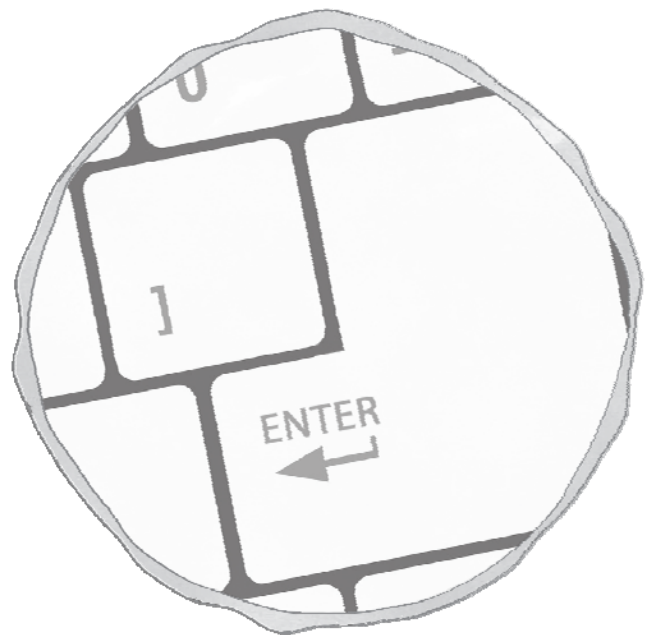
3.3. Restitución de la función CNT2 en aquellas líneas celulares que no lo expresan.....	166
3.3.1. Generación del adenovirus hCNT2.....	166
3.3.2. Efectividad de la infección con AdhCNT2.....	167
3.3.3. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 sobre el ciclo celular.....	169
3.4. Efecto de la inhibición de la ciclina Cdk4 con el inhibidor PD0332991 sobre los transportadores de nucleósidos en un modelo <i>in vivo</i>	170
3.5. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 sobre el metabolismo energético...173	
3.5.1. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 en la respiración celular...177	
3.5.2. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 sobre la producción de lactato y ATP intracelular.....	180
3.5.3. Metabolómica.....	182

Conclusiones.....	189
--------------------------	------------

Bibliografía.....	191
--------------------------	------------

Publicaciones

Introducción



1. Transportadores de nucleósidos

Los nucleósidos son moléculas formadas por una base nitrogenada púrica (adenina, guanina) o pirimidínica (timina, citosina, uracilo) unida covalentemente a la posición 1 de un azúcar de cinco átomos (pentosa) a través de un enlace N-glucosídico. Estas moléculas son clave para el organismo, no sólo por ser precursores de los nucleótidos (generados por la esterificación de un grupo fosfato al azúcar), necesarios para la formación de los ácidos nucleicos, sino también por estar implicados en numerosos procesos metabólicos. Así pues, encontramos nucleósidos formando parte del ATP, permitiendo la transducción de ciertas señales endocrinas y moléculas donadoras de energía en reacciones metabólicas o como ligandos de los receptores purinérgicos.

Dos rutas metabólicas diferentes pueden conducir a la biosíntesis de nucleósidos y nucleótidos. La primera de ellas es la síntesis *de novo*, en la cuál tiene lugar una serie de reacciones anabólicas que comportan un alto gasto energético. La segunda vía de obtención es la ruta de recuperación o *salvage*, mucho más favorable energéticamente y que implica el aprovechamiento de las bases nitrogenadas o de los nucleósidos existentes o provenientes de la dieta.

Los nucleósidos y nucleótidos son moléculas hidrofílicas que difícilmente pueden atravesar la membrana plasmática, por lo que se requiere la presencia de proteínas transportadoras específicas. La existencia de estas proteínas, en cuyo estudio se centra la presente memoria, permite no sólo la reutilización de nucleósidos como mecanismo de eficiencia energética sino también la regulación de los niveles de nucleósidos biológicamente activos. Debido a su presencia en epitelios absortivos y a su especificidad, estos transportadores juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis de los nucleósidos naturales, así como en la farmacodinámica y farmacocinética de los derivados nucleosídicos con actividades antineoplásica y antivírica.

Hay dos familias génicas principales de transportadores de nucleósidos: la SLC29, compuesta por los transportadores de tipo equilibrativo (*Equilibrative*

Nucleoside Transporter o ENT) caracterizados por una baja afinidad pero amplia selectividad de sustrato, tiene cuatro miembros (ENT1, ENT2, ENT3 y ENT4); y la SLC28, integrada por los de índole concentrativa (*Concentrative Nucleoside Transporter* o CNT) tiene tres miembros (CNT1, CNT2 y CNT3), que presentan una mayor afinidad por el sustrato pero una selectividad más restringida (Griffith DA y Jarvis SM, 1996; Cass CE *et al.*, 1999; Molina-Arca M *et al.*, 2009).

La clonación de las diferentes proteínas responsables de los sistemas de transporte, así como su expresión en distintos sistemas de forma heteróloga, ha permitido avanzar en el conocimiento de las características moleculares y estructurales de los transportadores de nucleósidos. Gracias a la generación de anticuerpos específicos contra estas proteínas se han podido realizar estudios de distribución y localización subcelulares así como de regulación.

1.1. Transportadores de nucleósidos equilibrativos (familia génica SLC29)

Los transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs) median la entrada de los nucleósidos a través de la membrana plasmática a favor de gradiente de concentración. Son independientes de sodio y bidireccionales, permitiendo tanto la entrada como la salida del sustrato (Baldwin SA *et al.*, 2004). Las proteínas hENT1 (SLC28A1) y hENT2 (SLC28A2), son los dos transportadores mejor caracterizados. Ambos presentan una amplia selectividad de sustrato, transportando tanto purinas como pirimidinas, pero lo hacen con baja afinidad, presentando constantes aparentes en el rango μM medio-alto (100-800 μM) (Ward JL *et al.*, 2000). hENT2 es capaz también de transportar nucleobases como la hipoxantina pero con menor afinidad que para los nucleósidos (Osses N *et al.*, 1996). hENT1 y hENT2 se diferencian por su sensibilidad a la nitrobenziltioinosina (NBTI), un análogo estructural de la adenosina. El transportador hENT1, es inhibible por concentraciones del orden nM de NBTI mientras que el transportador hENT2 es inhibible a concentraciones superiores a 1 μM . Además del NBTI, agentes vasodilatadores como dilazep, dipiridamol o draflazina pueden inhibir ambos sistemas de

transporte, aunque también en este caso, el transportador hENT1 es más sensible que hENT2 (Visser F *et al.*, 2002). hENT1 y hENT2 son los principales transportadores de tipo equilibrativo que transportan nucleósidos a través de la membrana plasmática, aunque ambas proteínas se han detectado en organelas intracelulares, como en la mitocondria (hENT1) y núcleo (hENT1 y hENT2) (Mani RS *et al.*, 1998; Lai Y *et al.*, 2004; Lee EW *et al.*, 2006). En la figura 1 se muestran los sustratos naturales afines para cada uno de los transportadores equilibrativos, y sus valores de K_m para cada uno sus sustratos.

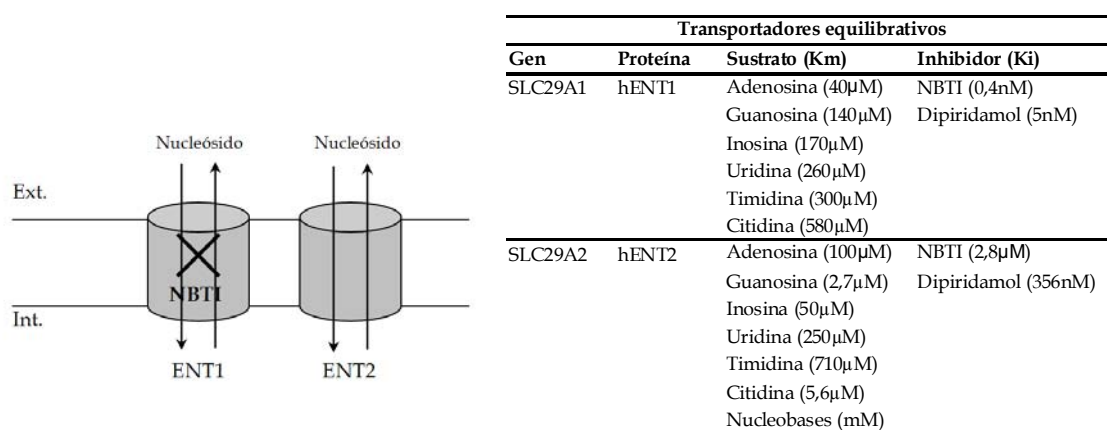


Figura 1: Sistemas cinéticos de transportadores de tipo equilibrativo y las entidades moleculares que los identifican.

El gen que codifica hENT3 (SLC29A3) fue clonado en 2005 y hasta ese momento, su función fisiológica no había sido descrita en detalle (Baldwin SA *et al.*, 2005). La isoforma humana de ENT3, de 475 aminoácidos, presenta una baja identidad con hENT1, del 29%, y en un inicio se pensó que se trataba de un transportador lisosomal altamente dependiente de pH, con un pH óptimo de 5.5. hENT3 muestra una amplia selectividad de sustrato, transporta nucleósidos y adenina con baja afinidad pero es relativamente insensible a los inhibidores NBTI, dipiridamol y dilazep. Recientemente, se ha sugerido que hENT3 podría ser una transportador mitocondrial (Govindarajan R *et al.*, 2009), aunque su localización subcelular necesita ser estudiada en profundidad. De hecho, conseguir un mayor conocimiento sobre la selectividad de este transportador, así como de su localización subcelular, celular y la distribución de esta proteína en tejidos es uno de los mayores objetivos en el ámbito. Esto es debido a que

ENT3 es el único transportador de nucleósidos estudiado hasta la fecha relacionado con enfermedades hereditarias, como el Síndrome H (Molho-Pessach V *et al.*, 2008) y el Síndrome PHID (*Pigmented Hypertrichosis with Insulin dependent Diabetes*) (Spiegel R *et al.*, 2010), que han sido asociadas con mutaciones en el gen SLC29A3 (Huber-Ruano I *et al.*, 2012).

Por otro lado, la isoforma hENT4 es la más alejada funcionalmente del resto de miembros de la familia y, de hecho, inicialmente se catalogó como un transportador de monoaminas y otros cationes orgánicos, denominado PMAT (*Plasma Membrane monoamine Transporter*). Aunque en un principio se había descrito que no transportaba nucleósidos, posteriormente demostraron una leve actividad de transporte a pH 7.5 y un acusado incremento del transporte de adenosina a pH entre 5.5–6.5. Este transporte no es dependiente de iones sodio, no es inhibido por NBTI, pero sí es inhibido de forma parcial, por dipiridamol y dilazep (Barnes K *et al.*, 2006; Baldwin SA *et al.*, 2004; Engel K *et al.*, 2004). Estos nuevos miembros, ENT3 y ENT4, se encuentran tanto en tejidos humanos como en murinos (Hyde RJ *et al.*, 2001; Baldwin SA *et al.*, 2004).

Estudios recientes de mutagénesis sobre residuos susceptibles de glucosilación (Sundaram M *et al.*, 2001) han confirmado el modelo topológico propuesto inicialmente por los análisis de predicción a partir de secuencia. Así, la estructura básica de los transportadores equilibrativos constaría de 11 dominios transmembrana conectados por regiones hidrófilas cortas, a excepción de dos grandes *loops* comprendidos entre los dominios transmembranas 1-2 y 6-7 y con el extremo N-terminal citoplasmático y el C-terminal extracelular (figura 2). hENT1 presenta un sitio de N-glucosilación en el gran *loop* extracelular entre los dominios transmembrana 1 y 2, mientras que ENT2 contiene dos en el mismo lazo extracelular, no pareciendo esencial dicha glicosilación para su función (Vickers MF *et al.*, 1999; Ward JL *et al.*, 2003).

Con el fin de determinar los dominios responsables de la especificidad de sustrato de estos transportadores se han realizado estudios basados en la generación de quimeras. Estos estudios han puesto de manifiesto que la región entre los dominios transmembrana 3 y 6 es la responsable de la sensibilidad o

resistencia a los inhibidores NBTI, dipiridamol y dilazep (Sundaram M *et al.*, 1998; Sundaram M *et al.*, 2001). Por otro lado la región entre los dominios transmembrana 1 y 6 parece responsable de la habilidad de hENT2 para transportar desoxinucleósidos, mientras que los dominios 5 y 6 están implicados en el reconocimiento de nucleobases (Sundaram M *et al.*, 2001; Yao, SY *et al.*, 2002). Adicionalmente, la generación de mutaciones puntuales en diversos residuos de hENT1 ha demostrado que la sustitución de la Gly154 de hENT1 por su residuo equivalente en hENT2 no afecta a la actividad de transporte pero supone la pérdida de sensibilidad a NBTI. El proceso contrario no sensibiliza a hENT2, indicando que además de Gly154 deben participar otros residuos en la sensibilidad diferencial de hENT1 y hENT2 al inhibidor (Hyde RJ *et al.*, 2001).

Resultados más recientes han puesto de manifiesto el papel clave que juegan los residuos Ser160 y Met89 en conferir sensibilidad al dipiridamol y la afinidad por adenosina y guanósina respectivamente (Endres CJ *et al.*, 2005).

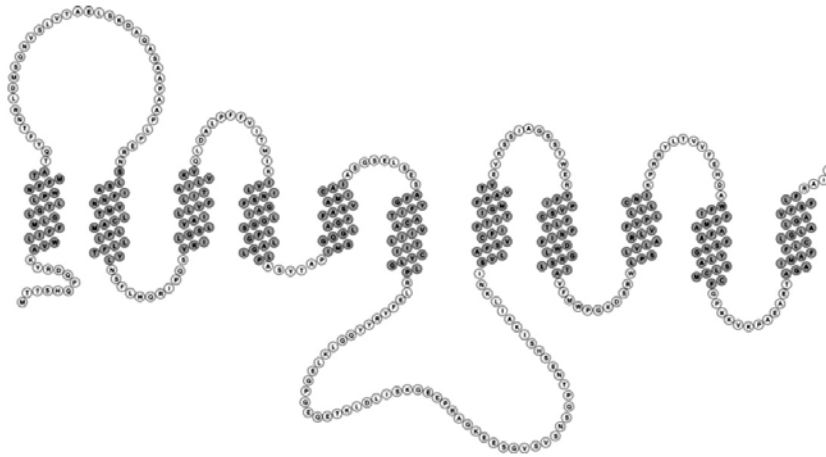
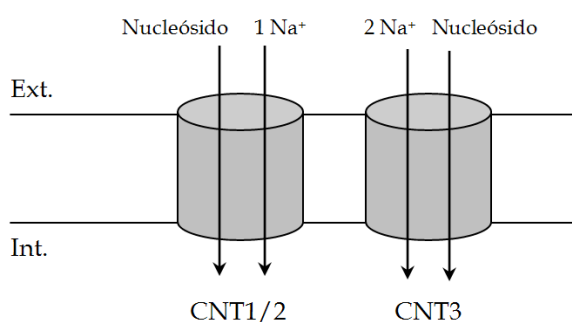


Figura 2: Modelo de la topología propuesta para hENT1.

1.2. Transportadores de nucleósidos concentrativos (familia génica SLC28)

Los transportadores concentrativos (CNTs) median el flujo unidireccional de nucleósidos con un gasto energético asociado al mantenimiento del gradiente transmembrana de sodio. A diferencia de los

transportadores equilibrativos, la ausencia de inhibidores de alta especificidad para los transportadores concentrativos, obligó inicialmente a clasificarlos según la selectividad de sustrato. En general, los transportadores concentrativos muestran una mayor afinidad por sus sustratos que los equilibrativos, con valores de K_m aparentes en el rango μM bajo (1-100 μM). Además, como las concentraciones de nucleósidos circulantes son mucho menores que los valores de K_m aparente, probablemente estos transportadores no estarán saturados en condiciones normales (Saito H *et al.*, 1999). Los tres miembros de la familia génica se diferencian entonces por su diferente selectividad y por su estequiometría sodio: nucleósido (Gray JH *et al.*, 2004) (figura 3).



Transportadores concentrativos		
Gen	Proteína	Sustrato (K_m)
SLC28A1	hCNT1	Uridina (40-50 μM)
		Timidina (6 μM)
		Citidina (34 μM)
SLC28A2	hCNT2	Uridina (80 μM)
		Adenosina (8 μM)
		Guanosina (21 μM)
		Inosina (4,5 μM)
SLC28A3	hCNT3	Uridina (1,1 μM)
		Timidina (3,4 μM)
		Citidina (3,7 μM)
		Adenosina (4,3 μM)
		Guanosina (4,6 μM)
		Inosina (5,1 μM)

Figura 3: Sistemas cinéticos de transportadores de tipo concentrativo y las entidades moleculares que los identifican.

La proteína hCNT1 (codificada por SLC28A1) media la entrada de nucleósidos pirimidínicos (Ritzel MW *et al.*, 1997), hCNT2 (SLC28A2) transporta purinas y uridina (Ritzel MW *et al.*, 1998), y el transportador hCNT3 (SLC28A3) presenta un amplio espectro de selectividad, siendo capaz de translocar tanto purinas como pirimidinas (Ritzel MW *et al.*, 2001). Los CNTs también difieren en las cantidades estequiométricas de ión sodio requerido por nucleósido transportado. En este sentido, CNT3 ha demostrado necesitar dos Na^+ por nucleósido (Ritzel MW *et al.*, 2001), mientras que la actividad de CNT1 y CNT2 está acoplada solamente a uno (Ritzel MW *et al.*, 1998; Smith KM *et al.*, 2004).

Además hCNT3 puede acoplar al transporte de nucleósidos el cotransporte de protones e iones de litio, con una estequiometría de 1:1 (Hu H *et al.*, 2006). Esto, demuestra que hCNT3 presenta una amplia selectividad y una mayor capacidad concentrativa.

La isoforma hCNT1 consta de 648 aminoácidos (71 kDa) y presenta una homología del 83% con el ortólogo de rata. La secuencia nucleotídica de hCNT2 predice una proteína de 659 aminoácidos (72 kDa) y el cDNA de hCNT3 codifica para una proteína de 691 aminoácidos (77 kDa) y su homología con los transportadores hCNT1 y hCNT2 es de un 48% y 47 %, respectivamente, mientras que hCNT2 es idéntico a hCNT1 en un 72%.

La topología predicha para los CNTs es de 13 dominios transmembrana, con un N-terminal citosólico y un C-terminal extracelular (Hamilton SR *et al.*, 2001). Sin embargo, en una publicación muy reciente se muestra la estructura del cristal de CNT de *Vibrio cholerae*, el cual tendría una topología de 8 dominios transmembrana (figura 4) (Johnson Z *et al.*, 2012). El ortólogo humano además tendría 3 dominios del extremo N- terminal (los cuales no están en procariontas). Los tres sistemas de transporte tendrían por tanto una estructura probable de 11 dominios transmembrana.

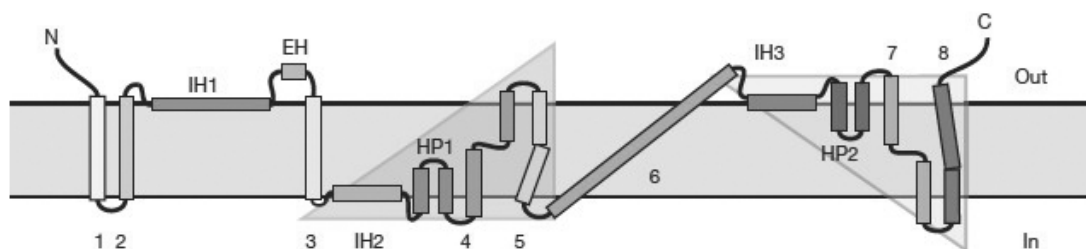


Figura 4: Representación esquemática de la topología de CNT de *Vibrio cholerae*. (Imagen de Johnson Z *et al.*, 2012).

Análogamente a los estudios que se realizaron para los transportadores equilibrativos, los dominios estructurales implicados en la unión de sustratos y determinantes moleculares responsables de la diferente selectividad de transporte, se han determinado mediante mutagénesis dirigida y la generación de quimeras. En este sentido, la eliminación de 174 aminoácidos del N-terminal

en la proteína de hCNT1 no le hace perder ni su habilidad de unión al sodio, ni su función (Hamilton SR *et al.*, 2001). Estudios sobre hCNT3 demuestran que es en el C-terminal, donde reside la unión a cationes, definiendo su estequiometría, así como el lugar de unión a sus sustratos (Smith KM *et al.*, 2005). De hecho, los TM8 y TM9 parecen contener los residuos involucrados en la unión a sustrato y selectividad. Cuando se sustituyen estos dominios de rCNT1 por la misma zona de rCNT2, pasa a transportar nucleósidos de purina en vez de pirimidinas (Wang J *et al.*, 1997). La sustitución del residuo Ser319 en hCNT1 por el correspondiente residuo de hCNT2, Gly313, posibilita el transporte de purinas, convirtiendo hCNT1 en un transportador con selectividad de sustrato similar a hCNT3 (Loewen SK *et al.*, 1999); la sustitución adicional del residuo Ser353 en el dominio transmembrana 8 cambia la especificidad de nucleósido, mientras que el cambio de residuo Leu354Val aumenta la afinidad aparente por los iones sodio y litio (Slugoski MD *et al.*, 2007).

1.3. Papel farmacológico de los transportadores de nucleósidos

Los nucleósidos pueden ser modificados estructuralmente con el objetivo de generar derivados farmacológicamente activos. Estos compuestos terapéuticos mimetizan los nucleósidos de los cuales derivan en como son transportados y metabolizados en el interior celular (Errasti-Murugarren E y Pastor-Anglada M, 2010). Como resultado de esta metabolización, los derivados de nucleósidos interfieren en la síntesis del DNA promoviendo efectos antiproliferativos y/o resistencia a la replicación vírica de las células infectadas. Además, muchos de estos compuestos inhiben a la vez enzimas clave del metabolismo de nucleótidos y de la síntesis de ácidos nucleicos, efectos que acaban provocando la muerte celular (Pastor-Anglada M *et al.*, 1998; Pastor-Anglada M *et al.*, 2005). Los transportadores de nucleósidos tienen, por tanto, una gran importancia clínica, ya que son los responsables de la internalización de los fármacos en el tejido tumoral.

1.3.1. Fármacos antitumorales

Muchos de los fármacos usados en la quimioterapia del cáncer son también análogos de nucleósidos. Estos compuestos pueden ser citotóxicos de por sí, o pueden sensibilizar a las células tumorales a la radiación mediante la alteración del metabolismo endógeno de nucleósidos (McGinn CJ *et al.*, 1994). Esencialmente, estos análogos son derivados de nucleósidos o nucleobases de pirimidina o de purina. Todos ellos comparten características comunes como la internalización a través de transportadores de membrana, la activación por quinasas como la desoxicitidina quinasa (dCK) y la desfosforilación por las 5'-nucleotidasas (figura 5). Sin embargo, presentan individualmente propiedades específicas que explican las variaciones observadas en el tratamiento de las diferentes patologías en las que se utilizan.

Ambos, tanto análogos de purinas como de pirimidinas se utilizan actualmente como fármacos antineoplásicos. Los análogos púricos, derivados principalmente de la adenosina, como la cladribina o la 2-CdA (2-clorodesoxiadenosina) y la fludarabina o F-araA (fluoroarabinosiladenosina) son ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades linfoproliferativas (Robak T *et al.*, 2009). En cambio, los análogos pirimidínicos como la gemcitabina (2',2'-difluorodesoxicitidina) y la capecitabina son los derivados que presentan eficiencia clínica frente a una gran variedad de tumores sólidos (Saiko P *et al.*, 2005; Wong A *et al.*, 2009). Sin embargo, la citarabina (análogo estructural de la desoxicitidina) es uno de los compuestos más eficaces en el tratamiento de ciertas enfermedades linfoproliferativas (leucemias agudas y linfomas) (Johnson SA *et al.*, 2001; Wong A *et al.*, 2009). La activación metabólica de la capecitabina requiere tres reacciones secuenciales hasta la formación del 5- fluorouracilo (5-FU). Las dos primeras reacciones son catalizadas por enzimas hepáticos; en cambio la última, la conversión de 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) a 5-fluorouracilo, tiene lugar mayoritariamente en los tumores que expresan el enzima timidina fosforilasa

(Walko CM *et al.*, 2005). El 5-fluorouracilo ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de varios tumores sólidos, mientras que las nucleobases 6-mercaptopurina y 6-tioguanina son efectivas en pacientes con un tipo particular de enfermedades hematológicas, con cierto grado de respuesta autoinmune y enfermedades inflamatorias (Longley DB *et al.*, 2003; Sahasranaman S *et al.*, 2008).

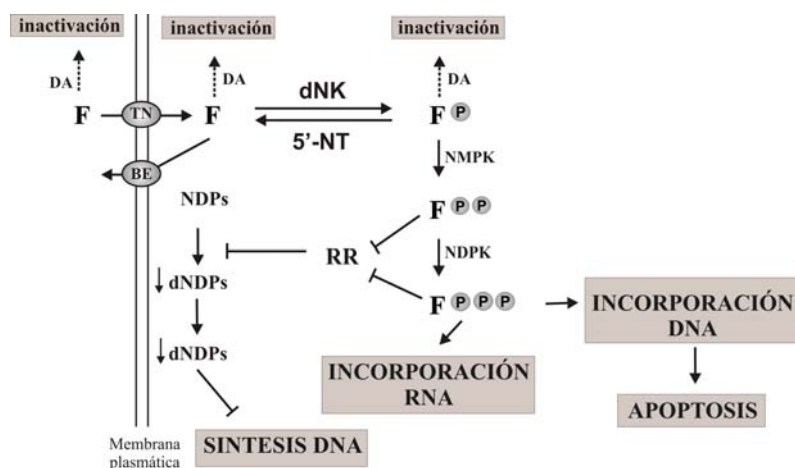


Figura 5. Representación esquemática del transporte, el metabolismo y el mecanismo de acción de los fármacos (F) análogos de nucleósidos. El fármaco es internalizado por los transportadores de nucleósidos (TN) y es fosforilado rápidamente hasta las formas activas bifosfato y trifosfato que serán las que ejercerán la acción citotóxica inhibiendo la ribonucleótido reductasa (RR) o incorporándose al DNA o RNA, siendo la apoptosis el resultado final. El fármaco también puede ser transportado de nuevo hacia el exterior por las bombas de extrusión (BE) o inactivado por las desaminasas (DA). (Figura adaptada de Galmarini CM *et al.*, 2001 y Jordheim LP *et al.*, 2007).

La mayoría de los análogos de nucleósidos utilizados en la terapia contra el cáncer son internalizados a la célula vía ENTs y CNTs. Sin embargo, algunos transportadores han sido implicados en la salida de los derivados de nucleósidos y/o de sus metabolitos fosforilados (Errasti-Murugarren E y Pastor-Anglada M, 2010). El perfil farmacológico de estas proteínas se ha obtenido usando combinaciones de sustratos, estudios de inhibición y electrofisiología. La selectividad que presentan los transportadores de nucleósidos para los fármacos es similar a la presentada por sus sustratos naturales, pero en general con menor afinidad.

Fármacos Antitumorales	CNT1	CNT2	CNT3	ENT1	ENT2	ENT3
Citarabina	S	NT	S	S	S	
Gemcitabina	S (24 μ M)	NT	S (60 μ M)	S (160 μ M)	S (740 μ M)	S
5-azacitidina	S (63 μ M)			S		
Zebularina			S			
5-fluoro-5'-deoxiuridina	S (209 μ M)	S	S	S	S	
5-fluoro-2'-deoxiuridina	S	S	S			
Fludarabina	NT	NT ^a	S	S (107 μ M)	S	
Cladribina	NT	S	S	S (23 μ M)	S	
Clofarabina	NT	S (81 μ M)	S (52 μ M)	S (108 μ M)	S (328 μ M)	
Forodesina				S	S	
AraG				S	S	
Mizoribina	S	S ^b		S	S	
6-mercaptapurina			S		S	
6-thioguanina			S		S	

S: Sustrato (cuando es conocido, se muestran los valores de Km). S^b valores obtenidos en ortólogos de rata. NT: no es sustrato. NT^a: no es sustrato pero inhibe

Tabla 1. Perfil farmacológico de los transportadores de nucleósidos para fármacos antitumorales.

1.3.2. Fármacos antivirales

Algunos de los fármacos clásicos para el tratamiento del SIDA son análogos de nucleósidos e inhibidores de la transcriptasa inversa viral. Algunos de estos inhibidores son análogos de pirimidinas, concretamente los 2',3'-dideoxynucleósidos, como la zidovudina o AZT fue el primero de una lista creciente de análogos de nucleósidos usados en el tratamiento del SIDA, entre los cuales también se encuentran la zalcitabina, la stavudina y la lamivudina, también se encuentra el derivado púrico didanosina (ddI) (Tozzi V, 2010). Todas estas moléculas requieren su activación hasta la forma trifosfato para poder ser incorporadas a la cadena de DNA creciente, parando así la síntesis del DNA vírico. El uso de antivirales derivados de nucleósidos no se limita al tratamiento del VIH. La ribavirina, un derivado de adenosina, se co-administra con interferón α en el tratamiento rutinario de la hepatitis C y la clebudina se utiliza para otras infecciones virales.

El AZT se transporta al interior celular mediante hCNT1, hCNT2, hENT2 y hENT3, con poca afinidad, pero no, sorprendentemente, por hENT1 (Yao SY

et al., 2001; Cano-Soldado P *et al.*, 2004; Errasti-Murugarren E *et al.*, 2007; Govindajaran R *et al.*, 2009). Sin embargo, AZT puede inhibir el transporte mediado por hENT1. De manera similar, hCNT1 aun siendo un transportador de pirimidinas, no es capaz de transportar zalcitabina pero es inhibido por éste (Cano-Soldado P *et al.*, 2004). Algunos fármacos pueden unirse al transportador pero no pueden ser translocados. Esto es algo que ya sucede con el nucleósido natural adenosina; se puede unir con mucha afinidad a hCNT1, pero no se transporta, inhibiendo el transporte de otros nucleósidos (Larrayoz IM *et al.*, 2004). Algunos de los transportadores de nucleósidos transportan peor los fármacos antivirales que los antitumorales. Por ejemplo, hCNT1 no transporta derivados de la citidina como son ddC o 3tC, pero en cambio transporta muy eficientemente gemcitabina y citarabina. Si comparamos las estructuras químicas entre estos análogos de nucleósidos, la diferencia radica en que los antivirales no tiene el grupo 3'-hidroxilo. De hecho el estudio de determinantes estructurales implicados en la entrada del fármaco muestra que el grupo hidroxil participa en el reconocimiento de sustrato (Zhang J *et al.*, 2003).

En resumen, los transportadores de nucleósidos están implicados en la captación de muchos análogos de nucleósidos utilizados en terapia, aunque la selectividad y afinidad por ellos varia en función de las modificaciones químicas que presentan. Por estas razones, los niveles de expresión de estas proteínas no sólo son importantes para la quimiosensibilidad, sino también para el contexto farmacocinético.

Fármacos Antivirales	CNT1	CNT2	CNT3	ENT1	ENT2	ENT3
Zidovudina (AZT)	S (450µM)	NT	S (310µM)	NT ^a	S	S
Zalcitabina (ddC)	NT	NT	S	S	S (>7,5µM)	S
Didanosina (ddI)	NT	S	S	S	S (3µM)	S
Stavudina (d4T)	S (15,6µM)	NT	S	NT		S
Lamivudina (3tC)	NT	NT		NT		S
Ribavirina	NT	S (81µM)	S (52µM)	S (160µM)	S (328µM)	S
Clevudina				S	S	

S: Sustrato (cuando es conocido, se muestran los valores de Km). NT: no es sustrato.

NT^a: no es sustrato pero inhibe

Tabla 2. Perfil farmacológico de los transportadores de nucleósidos para fármacos antivirales.

1.4. Distribución tisular y regulación de los transportadores de nucleósidos

Las proteínas CNT y ENT se expresan en todas las barreras epiteliales que desempeñan un papel importante en la farmacocinética de fármacos, incluyendo intestino, riñón e hígado entre otros (figura 6). De hecho, tanto los estudios funcionales como los de inmunodetección parecen confluir hacia un modelo de distribución asimétrica (Patil SD *et al.*, 1997; Scharrer E y Grenacher B, 2001). Las proteínas CNT están mayoritariamente, pero no exclusivamente, en el lado apical, mientras que las proteínas ENT se encuentran concentradas en el lado basolateral (Mangravite LM *et al.*, 2001; Mangravite LM *et al.*, 2003; Pastor-Anglada M *et al.*, 2007). Esta distribución en los enterocitos maduros y en las células de túbulo renal permite el flujo vectorial de los análogos de nucleósidos a través de las barreras epiteliales (Lai Y *et al.*, 2002; Errasti-Murugarren E *et al.*, 2007). Además, estudios tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que las condiciones de diferenciación promueven la expresión de las proteínas CNT. Cuando la línea celular derivada de cripta intestinal IEC-6 crece en presencia de glucocorticoides, como la dexametasona, conocida por promover la maduración de los enterocitos, aumenta la expresión de los CNT (Aymerich I *et al.*, 2004). En este sentido, la expresión de hCNT1 y hCNT2 en biopsias de cripta de duodeno es muy baja o incluso inapreciable, pero fácilmente detectable en enterocitos maduros (Govindarajan R *et al.*, 2008). En cambio, los transportadores de tipo equilibrativo, presentan una distribución tisular ubicua, aunque existe una gran variabilidad en los niveles de expresión entre los diferentes tejidos (Griffith DA y Jarvis SM, 1996).

De manera general, podemos afirmar que la expresión de ENT1 se considera constitutiva y el aumento de su expresión se relaciona con estímulos de tipo proliferativo, por lo que sus niveles de expresión suelen ser altos en tumores (Huang Y *et al.*, 2004). La inhibición farmacológica de ENT1 con NBTI inhibe la proliferación inducida por *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) en macrófagos de médula ósea en ratones, hecho que se acompaña con una disminución significativa en la incorporación de timidina tritiada del medio

extracelular al DNA (Soler C, García-Manteiga J *et al.*, 2001). Los macrófagos también expresan CNT1 y CNT2, pero no se regulan por estímulos proliferativos, pero en cambio sí frente a estímulos de activación provocados por TNF- α o LPS (Soler C, Valdés R *et al.*, 2001).

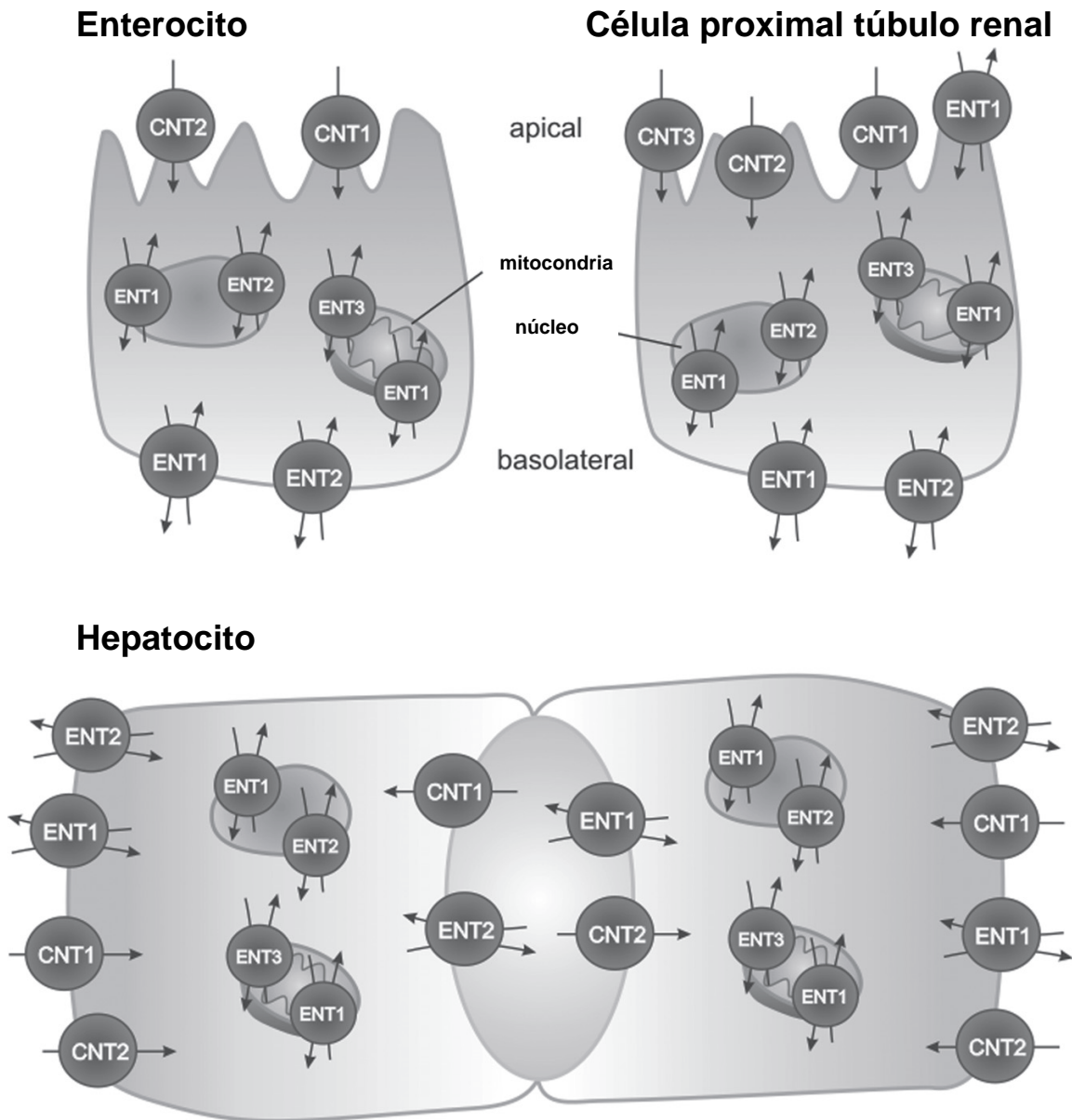


Figura 6: Localización subcelular de los transportadores de nucleósidos implicados en la farmacocinética de los fármacos derivados de nucleósidos. (Figura adaptada del capítulo *Nucleoside Transporters (SLC28 and SLC29) Family* escrito por Miriam Molina-Arcas y Marçal Pastor-Anglada englobado en el libro *Pharmacogenomics of Human Drug Transporters*, Toshihisa Ishikawa, Richard B. Kim y Jörg König, 2013).

Incluso en la línea celular de intestino IEC-6, se observa que la adición de TGF- α o EGF, ambos conocidos por promover la proliferación de células intestinales inmaduras, resulta en un aumento en la expresión de las proteínas ENT, mayoritariamente de ENT1 (Aymerich I *et al.*, 2004). Sin embargo, ENT1 no resulta crucial para la supervivencia celular, tal como demuestra el hecho de que el ratón *knock-out* para este transportador sea viable (Choi DS *et al.*, 2004). La redundancia en el rango de nucleósidos que son sustrato de los diferentes transportadores podría justificar la ausencia de letalidad. En particular se han descrito niveles elevados de expresión de mRNA y proteína de ENT1 en: placenta, eritrocitos, cerebro, corazón, hígado, pulmón y colon, entre otros (Pennycooke M *et al.*, 2001; Jennings LL *et al.*, 2001). De igual forma, la distribución de ENT2 se considera ubicua, aunque es particularmente abundante en el músculo esquelético (Griffiths M *et al.*, 1997; Crawford CR *et al.*, 1998; Pennycooke M *et al.*, 2001).

Los transportadores equilibrativos juegan un papel importante en la captación de nucleósidos provenientes de la dieta o producidos por tejidos como el hígado, capaces de llevar a cabo la síntesis *de novo* de nucleósidos. Así, la actividad de los ENTs permite que ciertos tipos celulares como los eritrocitos puedan proveerse de nucleósidos desde el medio extracelular y garantizar la cobertura de sus necesidades nucleotídicas gracias a la vía de recuperación. Además, ENT1 y ENT2 también han demostrado su importancia en la regulación de la concentración de adenosina extracelular y tono vascular en el cordón umbilical, demostrándose en la diabetes gestacional una disminución del mRNA de ENT1 y un incremento de la adenosina extracelular en células HUVEC, derivadas de endotelio de cordón umbilical (Vásquez G *et al.*, 2004). Asimismo, la exposición de estas mismas células a estímulos hipóxicos (1-2% de O₂) provoca una disminución de la actividad de ENT1 que se acompaña también de una disminución del mRNA y de la proteína (Casanello P *et al.*, 2005). La coexistencia de ENT1 y ENT2 en un mismo tipo celular ha sido tradicionalmente difícil de justificar dado que ambos transportadores presentan una selectividad muy similar que comportaría cierta redundancia. No obstante,

pequeñas diferencias en la afinidad parece que podrían justificar la presencia de ambos. A ENT1 también se le ha atribuido un papel en la respuesta a la adicción al alcohol en ratones *knock-out* para este transportador, hecho asociado a una reducción de los niveles de adenosina y del receptor de adenosina A₁ (Choi DS *et al.*, 2004). Por otro lado, la capacidad de hENT2 de transportar nucleobases como la hipoxantina podría asignar a este transportador una mayor relevancia en el caso de la recuperación de purinas por el ahorro energético que supone, aunque recientemente ha sido propuesto que ENT1 podría transportar también nucleobases (Yao SY *et al.*, 2011). Además, se ha sugerido que la mayor afinidad de ENT2 por la inosina justificaría su papel en la captación y eflujo de los metabolitos de la adenosina en el músculo (Crawford CR *et al.*, 1998). ENT3 también se expresa en numerosos tejidos, aunque es particularmente abundante en placenta. A diferencia de ENT1 y ENT2, su localización es mayoritariamente intracelular y parece intervenir en la translocación de nucleósidos a través de la membrana lisosomal, hecho que justifica la gran dependencia de su actividad con el pH, presentando una actividad óptima a pH 5.5 (Baldwin SA *et al.*, 2005). Se le asigna, pues, una posible función en la recuperación de derivados de la degradación de los ácidos nucleicos, ya que los lisosomas han mostrado ser el principal lugar de degradación del RNA (Heydrick SJ *et al.*, 1991). ENT4 se expresa cuantiosamente en la membrana ventricular de los miocitos y en las células endoteliales vasculares, donde se le asigna un papel en el transporte de serotonina y en la regulación de la concentración de adenosina extracelular, particularmente en situaciones acidóticas asociadas con isquemia (Barnes K *et al.*, 2006).

Sorprendentemente, contrario a lo que se ha dicho anteriormente, la distribución de los transportadores de nucleósidos en el dominio apical y basolateral puede ser distinta entre las diferentes barreras epiteliales (figura 6). En el hígado, los transportadores concentrativos se distribuyen de otra forma, demostrándose tanto en hepatocitos de rata como humanos. En este caso, CNT1 se sitúa en el dominio apical, en contacto con el canalículo biliar,

desempeñando un papel en la absorción de nucleósidos provenientes de la acción de ectonucleotidasas. En cambio, CNT2 se sitúa preferentemente en el dominio basolateral, correspondiente al dominio celular en contacto con el sinusoides hepático, por el cuál circula la sangre proveniente de la circulación hepática y portal (Duflot S *et al.*, 2002; Govindarajan R *et al.*, 2008). El hecho de que hCNT1, hCNT2 y hENT1 se localicen en ambos dominios, da a entender la importancia de los mecanismos de recuperación y liberación de nucleósidos tanto en el lado sinusoidal como en el canalicular de estas células. Además, la localización de hENT1 y hCNT2 en el lado sinusoidal de los hepatocitos humanos evidencian la importancia de estas proteínas en la captación de fármacos antivirales usados en pacientes con hepatitis C o B (Govindarajan R *et al.*, 2008).

De los transportadores concentrativos, CNT1 ha sido detectado en homogenados de hígado y riñón (Duflot S *et al.*, 2002) y en menor medida en intestino delgado, corazón, pulmón, tejido adiposo marrón y páncreas. Por otra parte, se ha demostrado también la presencia de CNT2 en estos tejidos citados y además en: cerebro (Guillén-Gómez E *et al.*, 2004) y en músculo esquelético, siendo en la barrera hematoencefálica el CNT que más se expresa, sino el único (Li JY *et al.*, 2001; Cansev M, 2006). El último de los transportadores concentrativos clonado CNT3, contrariamente a lo que se creía, se encuentra ampliamente representado en muchos tejidos, con una distribución incluso más amplia que los anteriores. El patrón de distribución de hCNT3 fue investigado utilizando un array de RNA con cDNA de 76 tejidos y líneas celulares. El resultado fue una gran cantidad de transcritos en glándula mamaria, médula ósea, tráquea y páncreas; también se detectó en intestino, hígado, pulmón, placenta, próstata, testículos y diferentes partes de cerebro y corazón, aunque los niveles son moderados o bajos (Ritzel MW *et al.*, 2001). El estudio de distribución de los diferentes transportadores en rata y ratón ha demostrado que el patrón de expresión de CNT3 parece ser diferente en ambas especies (Lu H *et al.*, 2004). En ratas, los niveles más elevados de mRNA se han detectado en pulmón, siendo dicha expresión un 87% superior en machos respecto a

hembras. En ratones, en cambio, los niveles de mRNA más elevados se encuentran en útero, mientras que en el pulmón son bajos. En ambas especies se ha encontrado una expresión moderada en testículo, próstata, ovario, cerebro, pituitaria y estómago y baja en el resto de tejidos, aunque en ratón también se observa una moderada expresión en intestino delgado, que en rata es difícilmente detectable. También resultan claras las diferencias entre estas especies y la humana, como en el caso del hígado o la médula ósea, tejidos en los que mCNT3 y rCNT3 no parecen expresarse (Lu H *et al.*, 2004). El papel fisiológico de los transportadores concentrativos es especialmente relevante en tejido epitelial renal e intestinal. El análisis de expresión de mRNA en estos tejidos muestra que CNT1 y CNT3 son más abundantes en riñón, mientras que en intestino la expresión de CNT2 es 20 veces superior a la del resto de transportadores (Shin HC *et al.*, 2003). En el riñón de rata, se ha visto una distribución segmental de los transportadores concentrativos. En el glomérulo donde es necesaria una alta capacidad de reabsorción de nucleósidos, se expresan las tres isoformas y estarían contribuyendo al aclaramiento renal. Sin embargo, en las zonas donde la adenosina tiene un papel importante en la regulación de la función renal (por ejemplo en el túbulo colector), sólo se encontró expresión de CNT2 y CNT3, lo cual sugeriría una contribución anexa de estos transportadores en la modulación de las concentraciones extracelulares de adenosina (Rodríguez-Mulero S *et al.*, 2005).

Aunque en un principio se pensaba que los CNTs sólo se expresaban en tejidos epiteliales y que su expresión es altamente dependiente de la diferenciación, explicando su baja expresión en tumores sólidos de origen epitelial, los CNTs también se expresan en otros tejidos no epiteliales. Los CNTs se expresan en macrófagos de médula ósea como se ha comentado anteriormente (Soler C *et al.*, 2001a, 2001b), y en líneas derivadas de células B (Soler C *et al.*, 1998; 2000). De hecho, en células de leucemia linfática crónica (CLL) se expresan hCNT2, hCNT3, hENT1 y hENT2. Sin embargo, aunque las actividades de tipo hENTs y hCNT2 se detectan normalmente en cultivo primario de CLL, la función de hCNT3 es muy baja o indetectable en estas

células (Molina-Arcas M *et al.*, 2003). Aunque, curiosamente la actividad de transporte de tipo hCNT3 se ve aumentada en las células MEC1, células derivadas de CLL, al tratarlas con ácido retinoico (ATRA) (Fernández-Calotti P y Pastor-Anglada M, 2010). Este efecto está mediado por TGF- β 1 involucrando el tráfico intracelular de hCNT3 contenido en vesículas hacia la membrana plasmática. Además, hENTs y hCNT2 son abundantes en linfocitos T, mientras que en monocitos, monocitos derivados de macrófagos (MDMs) y monocitos inmaduros derivados de células dendríticas se expresa mayoritariamente hCNT3 (Minuesa G *et al.*, 2008).

Análogamente a otras familias de transportadores, queda demostrado que los transportadores de nucleósidos están altamente regulados por un gran número de elementos que incluyen, desde hormonas y factores de crecimiento, hasta efectos nutricionales, hipoxia o progresión del ciclo celular (Soler C *et al.*, 2001; Sakowicz M *et al.*, 2004; Eltzhig HK *et al.*, 2005; Valdés R *et al.*, 2002). Además, la regulación de los transportadores de nucleósidos es dependiente de tejido, ya que un mismo elemento regulador puede actuar en sentidos contrarios o no tener ningún efecto en tejidos diferentes (Delicado EG *et al.*, 1994; Coe I *et al.*, 2002; Sen RP *et al.*, 1996). La abundancia de los transportadores de nucleósidos en los diferentes tipos celulares depende en parte de las vías que estimulan la proliferación o diferenciación de las células.

El conocimiento de la expresión constitutiva y/o regulada de los transportadores de nucleósidos no sólo permite comprender el papel fisiológico específico de cada miembro sino que también supone una herramienta de estudio de la bioasequibilidad de ciertos fármacos análogos de nucleósidos que depende de la expresión de estos transportadores (Molina-Arcas M *et al.*, 2003; Molina-Arcas M y Pastor-Anglada M, 2010).

1.4.1. Regulación de los transportadores de nucleósidos en el hígado

El hígado constituye la mayor reserva de nucleósidos disponible para aquellos tejidos que carecen de la vía de síntesis '*de novo*'. Nuestro grupo de

investigación ha demostrado la expresión de ENT1, ENT2, CNT1 y CNT2 en células derivadas de parénquima hepático, siendo los niveles de expresión de los diferentes miembros dependientes del estado de diferenciación celular (del Santo B *et al.*, 1998; Pastor-Anglada M *et al.*, 1998; del Santo B *et al.*, 2001; Pastor-Anglada M *et al.*, 2001). Así, en hepatocitos fetales se detecta una fracción de transporte equilibrativo considerablemente mayor que la fracción dependiente de sodio. La disminución de la expresión de los transportadores concentrativos en diferentes modelos de hepatocarcinogénesis corroboran estos resultados, ya que en estos modelos se da un proceso de desdiferenciación celular (Dragan Y *et al.*, 2000). La inducción de la diferenciación con dexametasona y hormona tiroidea T3 provoca un incremento en la expresión de la componente purino-preferente CNT2, tanto a nivel de su mRNA como de su proteína (del Santo B *et al.*, 2001). Del mismo modo, el tratamiento de la línea de hepatoma de rata FAO con agentes diferenciadores como la dexametasona es capaz de inducir la expresión de CNT2 (Valdes R *et al.*, 2006). Durante las fases iniciales de crecimiento hepático posterior a una hepatectomía parcial se detecta un incremento del transporte de nucleósidos dependiente de sodio que se acompaña de un aumento en los niveles de proteína de CNT1 y de CNT2 (Ruiz-Montasell B *et al.*, 1993; Felipe A *et al.*, 1997).

Después de una lesión de hígado, se requiere una gran cantidad de citoquinas o factores de crecimiento para iniciar y mantener la proliferación del hepatocito. Dos de estas citoquinas, el TNF- α y la IL-6, fueron estudiadas en la línea celular FAO y en células parenquimales hepáticas. Ambos factores indujeron tanto la expresión como la actividad CNT1, pero por mecanismos diferentes, jugando el TNF- α un papel de modulador prioritario y la IL-6 secundario (Dufлот S *et al.*, 2002) (figura 7). Además, en la línea celular FAO, derivada de hepatoma de rata, la regulación de dicho transportador es dependiente del ciclo celular (Valdés R *et al.*, 2002) (figura 7). Sin embargo, el transportador CNT2 permaneció insensible a estos factores, aunque fue altamente regulado por el agente pro-apoptótico TGF- β 1, a través de la vía JNK (Valdés R *et al.*, 2006) (figura 7). El hecho de que estos dos transportadores de

nucleósidos presentes en un mismo tejido, se regulen de manera diferencial frente a distintos moduladores, anticipa la posibilidad de que estas dos proteínas puedan tener funciones diferentes.

CNT2 es un transportador de alta afinidad para adenosina, de forma que puede ser un buen candidato para regular los niveles de adenosina extracelular. En la línea celular FAO y en células parenquimales hepáticas, se ha demostrado que CNT2 está bajo control purinérgico vía el receptor A_1 , de una manera dependiente de los canales K_{ATP} (Duflot S *et al.*, 2004) (figura 7). En el mismo modelo se ha demostrado, que el tratamiento con ácidos biliares aumenta también la actividad CNT2, lo cual resulta en un aumento del transportador en la membrana plasmática (Fernández-Veledo S *et al.*, 2006) (figura 7).

Se ha observado también, regulación de tipo nutricional en los transportadores concentrativos en el hígado de forma opuesta a la regulación observada en intestino delgado. Se ha visto que CNT1 es sensible a la disponibilidad de nutrientes en el intestino delgado, ya que su expresión se veía incrementada en la superficie del epitelio intestinal en ratas mantenidas en ayuno durante 48 horas, con un correspondiente aumento en la actividad sodio-dependiente. Parece que el responsable de estos efectos son los propios nucleótidos de la dieta, ya que si se administra a las ratas una dieta libre de nucleótidos, también se observa un incremento de la expresión de CNT1 (Valdés R *et al.*, 2000) (figura 7).

Todos estos datos nos llevan a concluir que la regulación de los transportadores de nucleósidos en hígado es un complejo y coordinado proceso en el que intervienen diferentes factores y vías.

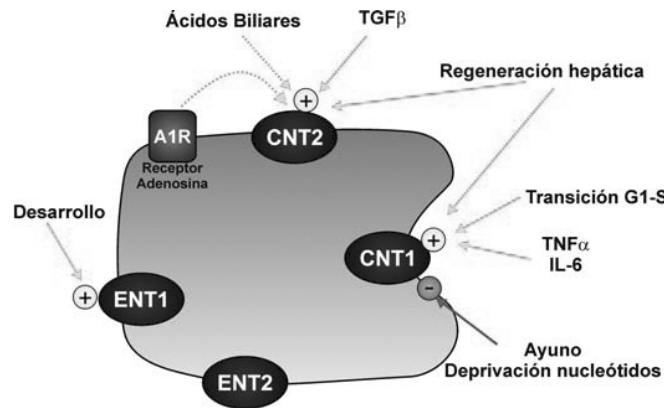


Figura 7: Modelo de la regulación del transporte de nucleósidos en el hepatocito. Imagen adaptada de la Tesis doctoral de Pedro Cano.

1.4.2. Transportadores de nucleósidos en cerebro

Hasta la fecha, se dispone de muy poca información acerca de los transportadores de nucleósidos en el sistema nervioso. Mediante RT-PCR, northern blot e hibridación *in situ* se han detectado los transcritos de rENT1 y rENT2 en muchas regiones cerebrales. Para ENT1, se detectaron niveles de transcrito en las neuronas piramidales del hipocampo, en neuronas granulares del giro dentado, Purkinje y neuronas granulares del cerebelo, así como neuronas corticales y del estriado. En cuanto a ENT2 la localización descrita incluye hipocampo, corteza, estriado y cerebelo pero de forma más amplia. Por eso se propuso que en cerebro de rata ENT2 podría ser el principal transportador de nucleósidos (Anderson CM *et al.*, 1999a, b). Estudios más recientes han caracterizado por primera vez la distribución de los ENTs en neuronas y astrocitos mediante anticuerpos policlonales, demostrando por inmunohistoquímica que tanto ENT1 como ENT2 se encuentran en la mayoría de las neuronas, pero sólo algunos astrocitos presentan ENT1 y de forma esporádica ENT2 (Alanko L *et al.*, 2006). Sin embargo, un estudio reciente examina los mecanismos de transporte de guanina y guanosina en cultivo primario de neuronas y astrocitos de rata, y ambos modelos presentan mayoritariamente un transporte equilibrativo de tipo ENT2 (Nagasawa K *et al.*, 2007).

También mediante anticuerpos específicos contra las isoformas humanas de ENT1 y ENT2, se ha realizado un barrido de muestras cerebrales mediante western blot que indica que la expresión de ENT1 es más abundante en la corteza cerebral, tálamo, cerebro medio y ganglios basales, mientras que ENT2 se encontró en el cerebelo y en el tronco encefálico. Además, la distribución de ENT1 se correlaciona con la del receptor de adenosina A₁, lo que en principio sugeriría un papel importante del transportador ENT1 en el control de acciones neuromoduladoras mediadas por los receptores A₁ de adenosina en el cerebro (Anderson CM *et al.*, 1999a, b).

La adenosina se transporta hacia el interior de las células por la mayoría de transportadores de nucleósidos, pero parece ser que los transportadores principales serían ENT1 y CNT2 ya que muestran unas *K_m* aparentes por este nucleósido de 40 µM en el caso de ENT1 y de 8 µM para CNT2 (Mackey JR *et al.*, 1999). Existen pocos trabajos sobre la distribución de los CNTs en cerebro. Anderson y colaboradores demostraron por RT-PCR la presencia de CNT1 y CNT2 en diferentes zonas del cerebro (Anderson CM *et al.*, 1999a, b). Más tarde por hibridación *in situ* se mostró una amplia distribución de rCNT2 en cerebro, pero más predominante en amígdala, hipocampo, regiones neocorticales y cerebelo (Guillén-Gómez E *et al.*, 2004). En este mismo estudio se evaluó el efecto de la privación total de sueño en ratones, observándose como los niveles de mRNA para CNT2 disminuyen drásticamente. Esta disminución en la transcripción de CNT2 específica sugiere un nuevo papel fisiológico para el transportador en la modulación de los niveles extracelulares de adenosina y el ciclo de sueño/vigilia (Guillén-Gómez E *et al.*, 2004). También se ha demostrado la expresión de mRNA de CNT2 en cultivos primarios de astrocitos de ratón (Peng L *et al.*, 2005), y en lo que se refiere a CNT3, se han detectado niveles de mRNA por northern blot (Ritzel MW *et al.*, 2001). Recientemente la proteína CNT2 ha sido identificada en membrana plasmática y en preparaciones de membrana de vesículas de cuerpo estriado de rata, lo que sugiere que CNT2 está contribuyendo a la señalización de la adenosina en cerebro (Melani A *et al.*, 2012).

1.4.2.1. Papel de la adenosina en el Sistema Nervioso Central

La adenosina no es un neurotransmisor clásico, ya que no se almacena en vesículas y no se conocen sinapsis donde el neurotransmisor principal sea este metabolito (Dunwiddie TV y Masino SA, 2001), por lo que la adenosina se considera un neuromodulador que actúa por otros mecanismos. Existen dos posibles vías de liberación de adenosina en cerebro: la vía clásica, basada en la formación intracelular de adenosina a partir de nucleótidos de adenina y un posterior flujo vía transportadores equilibrativos de nucleósidos; y la vía alternativa, que implica la liberación de ATP y su hidrólisis vía ecto-5'-nucleotidasa hasta la formación de adenosina. La existencia de dos vías para formar adenosina extracelular es probablemente debido a que la adenosina ejerce dos papeles paralelos: uno de neuromodulador en situaciones no estresantes (adenosina a partir del ATP liberado), y otro de modulador homeostático en situaciones de estrés (adenosina extracelular liberada como tal) (Malva JO *et al.*, 2003).

La adenosina tiene un papel muy importante en el cerebro, actuando incluso como neuroprotector. De hecho, los niveles de adenosina que incrementan dramáticamente en condiciones de isquemia, como consecuencia de un fallo en el metabolismo energético, juegan un papel crítico en la progresión del daño cerebral. Este efecto final se produce por un balance en la activación de los diferentes receptores de adenosina. Cualquier modificación en estos receptores determinaría la acción de la adenosina durante la isquemia y otras situaciones de estrés. Se ha demostrado recientemente, en estudios en cerebro de rata *in vivo*, que en 24h de isquemia en córtex no hay cambios ni de unión ni de funcionamiento del receptor A_{2A} , en cambio en estriado hay una disminución significativa en la afinidad de A_{2A} , asociada a un incremento en la densidad del receptor (Trincavelli ML *et al.*, 2008).

El transporte de la adenosina a través de la membrana celular es la principal vía para eliminar la adenosina del espacio extracelular (Gu JG *et al.*, 1992). Se sabe que la adenosina se transporta a través de ENT1 en sinaptosomas

(Gu JG *et al.*, 1995). Un simple aumento en la concentración intracelular de adenosina conduce a un incremento de la adenosina extracelular, lo que puede provocar la inhibición de la actividad sináptica. Por otro lado, la liberación de adenosina por neuronas o glía da lugar a la vasodilatación, ya que se encuentra implicada en la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral (Wahl M y Schilling L, 1993) y la administración de antagonistas provoca vasoconstricción y revierte la vasodilatación mediada por la adenosina (Hylland P *et al.*, 1994).

Teniendo en cuenta que la liberación extracelular de adenosina por células y tejidos durante condiciones de estrés, como la isquemia o anoxia, se da vía transportadores de nucleósidos equilibrativos y, que la principal manera de internalizarla también es a través de transportadores de nucleósidos, determinar su localización en cerebro tanto a nivel regional como celular, y determinar y caracterizar su actividad y regulación, es de gran importancia a nivel farmacológico.

1.4.2.2. Receptores de adenosina en cerebro

Los receptores purinérgicos se dividen en dos grupos, los receptores P1 que se unen preferentemente a la adenosina modulando la actividad de la adenilato ciclasa y los P2 que regulan la actividad de la fosfolipasa C y las concentraciones de Ca^{2+} intracelular vía ATP (Burnstock G y Wood JN, 1996). Hasta el momento, se han clonado cuatro receptores P1 preferentes por adenosina (**Tabla 3**); todos ellos constan de 7 dominios transmembrana, están acoplados a proteínas G y se encuentran ligados a mecanismos de transducción de señal implicando al AMPc. El receptor A_1 , el más abundante en cerebro, está acoplado a la activación de canales de K^+ (Trussell LO y Jackson MB, 1985) e inhibición de canales de Ca^{2+} , lo que da lugar a la inhibición de la actividad neuronal. Este receptor inhibe la adenilato ciclasa y activa la fosfolipasa C (PLC). De hecho, concentraciones elevadas de agonistas de A_1 o niveles elevados de expresión del receptor potencian efectos en la PLC, lo que activa la proteína quinasa C (PKC) vía la producción de inositol trifosfato (IP_3) (Biber K *et al.*, 1997). El receptor A_{2A} está presente con niveles elevados en algunas zonas

concretas del cerebro como el estriado, *nucleus accumbens* y bulbo olfativo y se encuentra ligado a la activación de la adenilato ciclasa. El receptor A_{2B} también activa esta enzima y parece que se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, aunque con niveles bastante bajos, de forma que podría ser relevante no en condiciones normales, pero sí, por ejemplo, en ciertas condiciones patológicas. Su estudio es difícil, ya que no se conocen agonistas ni antagonistas específicos de este receptor. Parece que los receptores A₁ y A₂ tienen efectos opuestos en la activación del AMP cíclico (AMPC), mientras que los efectos del primero sobre la adenosina son inhibidores en el tejido diana, a través de A₂ son excitadores, aunque cada vez son más los trabajos que demuestran la necesidad de colaboración de estos dos receptores (García N *et al.*, 2013). El cuarto de ellos, A₃, está poco caracterizado pero parece que desacopla al receptor A₁ y los receptores de glutamato metabotrópicos vía un mecanismo dependiente de una proteína quinasa C (Dunwiddie TV *et al.*, 1997; Macek TA *et al.*, 1998), de esta manera, una de sus funciones podría ser la modulación de otros receptores.

Receptor	Afinidad por Adenosina	Mecanismos de Transducción	Acciones en cerebro	Distribución en cerebro
A ₁	~ 70 nM	-Inhibición de AC y canales de Ca ²⁺ -Activación de GIRKS y PLC	Inhibición de la transmisión sináptica Hiperpolarización de neuronas	Amplia
A _{2A}	~ 150 nM	-Activación de AC y canales de Ca ²⁺ ?? -Inhibición de canales de Ca ²⁺	Facilita/inhíbe la liberación del neurotransmisor	Estriado, tubérculo olfativo y nucleus accumbens
A _{2B}	~ 5100 nM	-Activación de AC y PLC	Aumenta AMPC en secciones de cerebro. Modulación de función de canales de Ca ²⁺	Amplia (niveles bajos) por RT-PCR
A ₃	~ 6500 nM	-Activación de PLC -Inhibición de AC -Aumento de C ²⁺ intracelular	Desacopla A ₁	Amplia (niveles bajos) por RT-PCR

Tabla 3. Tipos de receptores de adenosina. A₁ y A_{2A} son los receptores de alta afinidad (nM), mientras que A_{2B} y A₃ se consideran de baja afinidad (µM). La mayoría se encuentran ampliamente distribuidos en cerebro, pero los niveles más elevados corresponden al receptor A₁. Aunque A_{2A} también se expresa con niveles elevados, su localización es más limitada.

2. De transportador a “transceptor”

El vocablo transceptor ha sido acuñado recientemente para definir la capacidad que presentan algunos transportadores de transducir señales al interior de la célula. De hecho, transceptor proviene de la contracción de las palabras transportador y receptor, lo que significa que la unión y/o transporte de sus sustratos activa vías de señalización intracelulares (figura 8). Estas nuevas funciones de los transportadores fueron descritas originariamente para transportadores de aminoácidos en levaduras (Donaton MC *et al.*, 2003; Galan JM *et al.*, 1996; Petersson J *et al.*, 1999; Felice MR *et al.*, 2005; Erpapazoglou Z *et al.*, 2008; Kim Y *et al.*, 2002). Aunque en un primer momento se pensó que podrían estar restringidas a eucariotas inferiores, no se tardó en identificar nuevos transceptores en moscas y células de mamíferos (Goberdhan DC *et al.*, 2005; Gojon A *et al.*, 2011; Rogato A *et al.*, 2010; Hyde R *et al.*, 2007; Stolarczyk E *et al.*, 2010). El descubrimiento de cada vez más funciones receptoras en varios transportadores, sugiere que muchos transportadores podrían ser transceptores, aunque no parece ser algo fácil de detectar. La inmediata metabolización de cualquier sustrato que se transporta al interior de la célula, puede confundir y atribuir así, erróneamente, cualquier efecto o cambio en ciertos parámetros celulares como consecuencia de su metabolismo. Incluso el paso en sí de la translocación de sustratos puede tener efectos indirectos causados por ejemplo, por los iones que son co-transportados. Por lo tanto, la función de señalización de un transportador puede obviarse con mucha facilidad. Aún más difícil es reconocer una situación en la que el metabolismo parcial de los nutrientes de señalización y su transporte deben actuar conjuntamente para causar una cierta respuesta celular.

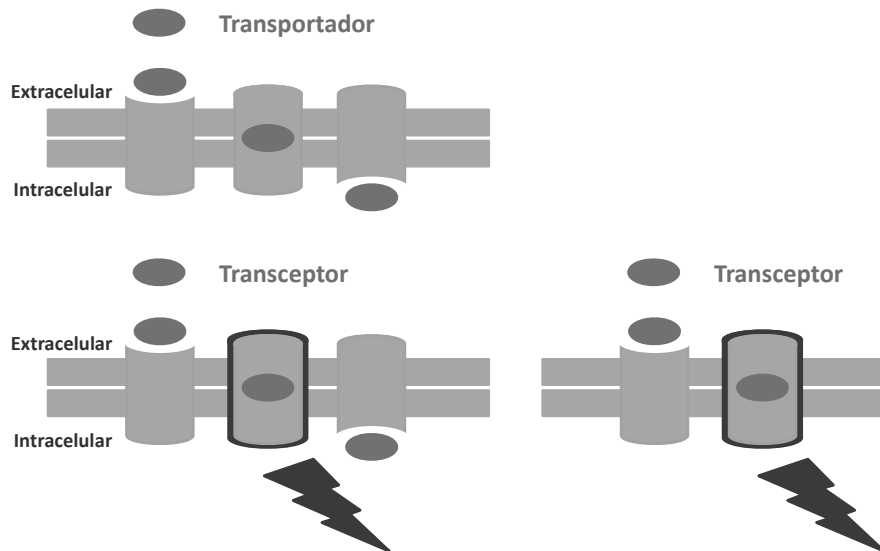


Figura 8: Esquema de una proteína transceptora. La unión y/o transporte de sus sustratos activa vías de señalización intracelulares. (Figura adaptada de Thevelein JM y Voordeckers K, 2009)

En levaduras, el transportador de aminoácidos GAP1, media la señalización intracelular a través de la proteína quinasa A (PKA). Su internalización endocítica y su tráfico intracelular están sujetos al control de aminoácidos (Donaton MC *et al.*, 2003). Por lo tanto, la fina regulación del tráfico intracelular sobre transportadores de nutrientes puede estar relacionada con la necesidad de un estricto control de la señalización inducida por los mismos nutrientes. Son muchos los transceptores que han sido descritos en levaduras, el transportador de uracilo Fur4 (Galan JM *et al.*, 1996), el transportador de fosfato Pho84 (Petersson J *et al.*, 1999), y varios transportadores más de iones metálicos (Felice MR *et al.*, 2005) así como también sideróforos (Erpapazoglou Z *et al.*, 2008; Kim Y *et al.*, 2002). Todos estos transportadores están fuertemente inducidos por ausencia de sustrato, y la adición de sus sustratos al medio causa su rápida pérdida en la membrana plasmática.

En eucariotas superiores, también se han obtenido evidencias de transportadores que funcionan como transceptores, el sensor de alta afinidad de aminoácidos PATH en *Drosophila* (Goberdhan DC *et al.*, 2005), el transportador de nitrato NRT1.1 (Gojon A *et al.*, 2011) y el de amonio AMT1-3

en plantas (Rogato A *et al.*, 2010). En mamíferos los transportadores de glucosa SGLT1 o GLUT2 también han sido descritos recientemente como transeptores así como también el transportador de aminoácidos SNAT2 (Hyde R *et al.*, 2007). Estos hallazgos son de gran interés médico, ya que pueden ayudar a entender mejor los trastornos metabólicos y enfermedades como la obesidad o la diabetes. Incluso se sugirió que la función de señalización de GLUT2 podría constituir una diana terapéutica interesante para el tratamiento de estos trastornos y enfermedades metabólicas asociadas (Stolarczyk E *et al.*, 2010). Alrededor de la mitad de todos los medicamentos utilizados actualmente actúan sobre proteínas receptoras. Por lo tanto los transeptores pueden constituir nuevas dianas terapéuticas, especialmente para las enfermedades metabólicas, por ello es de suma importancia estudiar bien los procesos que regulan estas proteínas ya que pueden estar relacionados con su función de señalización en lugar de con actividad transportadora. En este ámbito, las proteínas CNTs tienen un papel importante en la fisiología celular debido a su función como transportadores de nucleósidos y análogos que son ampliamente utilizados en terapia antitumoral y antiviral. De hecho, los transportadores de nucleósidos, de la misma manera que muchos transportadores de nutrientes, están regulados por la asequibilidad de sustrato, que muchas veces y sobretodo en el caso del epitelio intestinal viene determinada por el tipo de dieta. Como se explica con anterioridad en el apartado de distribución y regulación de los transportadores de nucleósidos, nuestro grupo de investigación puso de manifiesto que la expresión y la actividad de los transportadores concentrativos de nucleósidos, *in vivo*, están regulados por la asequibilidad de sustrato (Valdés R *et al.*, 2000).

Las proteínas CNT en sistemas eucariotas presentan un gran dominio N-terminal citosólico siendo de 83, 80 y 101 aminoácidos para CNT1, CNT2 y CNT3 respectivamente. En cambio, sus ortólogos en sistemas procariotas carecen de este dominio intracelular así como de los 3 primeros dominios transmembrana, lo que nos permite anticipar que esta de la proteína es una

adquisición evolutiva y no sería necesaria ni para el reconocimiento ni para la translocación de sus sustratos.

Por otro lado, también han empezado a emerger evidencias que relacionan las funciones de transducción de señales de algunos transportadores con su interacción directa con otras proteínas, lo que podría contribuir a su regulación. En este sentido, la interacción del transportador de iodo NIS (*sodium/iodide symporter*) con el factor de recambio de guanina de RhoA asociado a Leucemia, LARG (*leukemia-associated RhoA guanine exchange factor*) regula la invasividad y la motilidad de las células tumorales (Lacoste C *et al.*, 2012). De igual manera el transportador de monocarboxilato acoplado a sodio, SMCT1 (*sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*) suprime la progresión tumoral a través de la depleción de survinina (Coothankandaswamy V *et al.*, 2013).

Hallazgos recientes en nuestro grupo ponen de manifiesto la implicación de algunos de los transportadores concentrativos de nucleósidos en funciones cruciales de la fisiología celular que van más allá de su papel como meros mediadores de la bioasequibilidad de sus sustratos, confirmando a estas proteínas la habilidad de funcionar como transeptores, pudiendo ejercer hCNT1 un papel como modulador del crecimiento tumoral (Pérez-Torras S *et al.*, 2013) y hCNT2 como probable regulador del metabolismo energético celular (Huber-Ruano I *et al.*, 2010).

2.1. hCNT1: modulador de la progresión tumoral

La expresión de hCNT1 en tumores se caracteriza por presentar niveles bajos o indetectables, como en el caso de adenocarcinoma pancreático, tumores ginecológicos y cáncer de mama (Gloeckner-Hofmann K *et al.*, 2006; Lane J *et al.*, 2010; Bhutia YD *et al.*, 2011). Sin embargo, en tejidos sanos hCNT1 sí se expresa significativamente.

En un trabajo de nuestro grupo publicado este mismo año se describe por primera vez un transportador de nucleósidos como transeptor (Pérez-

Torras S *et al.*, 2013). En este estudio se restablece la expresión de hCNT1 o su variante polimórfica hCNT1S546P, variante que carece de su capacidad transportadora, mediante vectores adenovirales en líneas de adenocarcinoma pancreático, NP-9 y NP-29, donde la expresión de este transportador es prácticamente nula. Curiosamente, la introducción de hCNT1 en estas células provoca alteraciones tanto en la morfología celular como en el ciclo celular de manera dependiente de dosis. La sobreexpresión de hCNT1 en estas células provoca un acúmulo de las células en fase S, correlacionando a su vez con un aumento en la expresión de la ciclina E, proteína que presenta un pico de expresión al inicio de la fase S participando en la transición G₁-S. También se observó una hiperactivación de la polimerasa poli-ADP-ribosa (PARP) y una inducción de la muerte celular, así como una disminución en la migración celular. Todos estos cambios se corresponden con una pronta fosforilación de Akt tanto en la Ser473 como en T308, seguida de la activación de la vía Erk. Además, lo más sorprendente fue la inducción de los mismos efectos por parte de la variante polimórfica sin actividad transportadora, poniendo de manifiesto sus funciones transceptoras. Asimismo, la expresión constitutiva de hCNT1 en células tumorales pancreáticas induce una disminución en su capacidad proliferativa (Bhutia YD *et al.*, 2011) y su restitución en tumores subcutáneos inhibe de forma significativa el crecimiento tumoral (Pérez-Torras S *et al.*, 2013).

2.2. hCNT2: metabolismo celular

La primera evidencia sobre la implicación de CNT2 en el metabolismo energético se basa en los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Aymerich y colaboradores (2006). La quinasa dependiente de AMP (AMPK) es un complejo heterotrimérico que sensa el estado energético intracelular y ejerce una regulación rápida en función de la demanda y del consumo de energía de las vías metabólicas. A pesar de que las alteraciones en el *pool* de nucleótidos de adenosina intracelulares suponen tradicionalmente cambios en el metabolismo energético, en este estudio se evaluó si la adenosina extracelular podía

contribuir a la regulación de la AMPK. En la línea de celular IEC-6, células epiteliales de intestino de rata, se observó que la adenosina extracelular además de aumentar rápidamente las concentraciones intracelulares de AMP, promovía la fosforilación de la AMPK, activándola, así como también la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), una de las dianas más conocidas de la AMPK. El efecto de la adenosina sobre la señalización de AMPK se bloquea completamente con la inhibición del transporte de adenosina a través de CNT2 incubando las células con formicina B, un análogo no metabolizable de la adenosina. Este mismo efecto también se observó en un modelo de células de parénquima de hígado. En resumen, este estudio muestra que la adenosina, cuando se añade a concentraciones fisiológicas, activa la AMPK y promueve la fosforilación de ACC. Sin embargo, la adenosina debe ser transportada a través de CNT2 para ejercer su acción.

Estudios más recientes, también en nuestro laboratorio, utilizando sólo el dominio N-terminal de CNT2 identificaron la aldolasa B y GRP58 (*Glucose-regulated proteína 58*) como proteínas de interacción con CNT2 (Huber-Ruano I *et al.*, 2010) mediante las técnicas de doble híbrido y *GST-pull down*, respectivamente. Se demostró por inmunocitoquímica que ambas proteínas colocalizan con CNT2. La interacción de CNT2 con GRP58 fue validada mediante experimentos de co-inmunoprecipitación, mientras que para la aldolasa B se utilizó la técnica de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) en células HeLa, observando un aumento en la eficiencia tras la adición de fructosa, en consonancia con una interacción transitoria entre aldolasa B y el transportador. Ensayos de carácter más funcional demostraron que GRP58 parecía ser un efector negativo en la función transportadora de CNT2, mientras estímulos glucolíticos directos sobre la aldolasa B aumentaban la actividad de CNT2, incrementando la afinidad de este transportador por sus sustratos (Huber-Ruano I *et al.*, 2010). Aunque hasta el momento no se han detectado directamente funciones transeptoras de hCNT2, la descripción de estas proteínas de interacción relacionadas con el metabolismo energético

refuerza el probable papel de este transportador en la regulación del metabolismo energético.

3. Metabolismo tumoral

La investigación sobre el cáncer ha estado basada durante mucho tiempo en la detección de aquellos genes implicados en la transformación tumorogénica. Pero en los últimos tiempos se han hecho numerosos avances en la comprensión de cómo el metabolismo de las células cancerosas les permite mantener un fenotipo maligno, hasta el punto de llegar a ser designado recientemente como una de las nuevas señas de identidad del cáncer (Hanahan D y Weinberg RA, 2011). La mayoría de los tejidos utilizan la respiración mitocondrial para producir energía a partir de nutrientes. Sin embargo, en 1924, el que fuera posteriormente premio Nobel, Otto Warburg, observó que las células tumorales hacían algo distinto de lo que hacían los tejidos adyacentes.

En células de mamíferos la respuesta metabólica requiere una coordinación permanente de la actividad celular, incluyendo la proliferación celular con la disponibilidad de nutrientes, la señalización hormonal, estrés y la regulación de la homeostasis energética. La disponibilidad de nutrientes permite la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos para promover el crecimiento y la proliferación celular, asociado con el aumento de flujo glucolítico y la disminución del metabolismo oxidativo (Jezek P *et al.*, 2010). Por el contrario, la privación de nutrientes implica un cambio en el metabolismo celular activando las vías de producción de energía, tales como la fosforilación oxidativa que restringen la proliferación celular. Las células tumorales usan mucha más glucosa, pero consumen mucho menos oxígeno. Esto llevó a Otto Warburg en los años 50 a proponer que las células tumorales podían tener el sistema respiratorio dañado, y que el cambio del metabolismo respiratorio al metabolismo fermentativo era causal en la tumorogénesis (Warburg O, 1956). Cuando una célula se ve forzada a crecer y multiplicarse, tiene forzosamente que readaptar su metabolismo. La producción de ATP pasa a ser menos

relevante que el uso de nutrientes para generar ácidos nucleicos, proteínas y ácidos grasos (figura 9). Esto conlleva un aumento de la tasa glucolítica, que lleva asociada una mayor producción de ácido láctico. De hecho, la acidosis láctica es una complicación típica en los enfermos de cáncer (Dhup S *et al.*, 2012). Según el tipo celular y el tipo de oncogenes, también se produce un aumento de la ruta de las pentosas fosfato y la síntesis de nucleótidos de novo, de la síntesis de proteínas y ribosomas, y de la síntesis de ácidos grasos y esteroides. Las células tumorales también aumentan el uso y el transporte de glucosa y de aminoácidos. En cambio, la respiración mitocondrial disminuye (Willers IM y Cuezva JM, 2011). Recientemente, también se ha observado, en estudios metabolómicos en diferentes células tumorales, un aumento en el consumo de glicina y de la expresión de la ruta biosintética mitocondrial de glicina, fuertemente correlacionadas con las tasas de proliferación de las diferentes las células cancerosas (Jain M *et al.*, 2012).

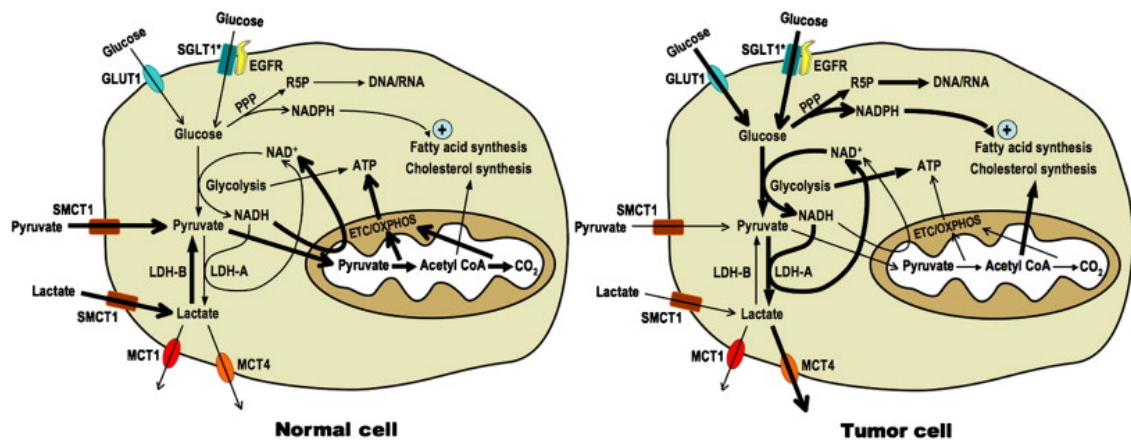


Figura 9. Transporte y metabolismo de la glucosa en células normales VS células tumorales. Figura extraída de Ganapathy V *et al.*, 2009.

3.1. Metabolismo glucídico tumoral

p53 es uno de los supresores tumorales más conocidos. Desempeña papeles importantes en el crecimiento y desarrollo celular, incluyendo la

inducción de la apoptosis, la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, y el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Su mutación o baja expresión se asocia con la mayoría de tipos de cáncer (Vousden KH *et al.*, 2009). p53 ejerce su papel a través de una red compleja. Las funciones celulares que son reguladas por p53 implican ROS (especies reactivas de oxígeno), daño y reparación del DNA, ciclo celular, autofagia y, más recientemente, el metabolismo. Los niveles intracelulares de ROS, el estrés metabólico, hipoxia, y el daño en el DNA pueden activar p53 (Bensaad K *et al.*, 2009). Las células liberan continuamente ROS durante el metabolismo y otros procesos celulares. Las células responden a diferentes niveles de ROS, y suelen dar lugar a resultados diferentes. Bajo condiciones de un producción baja de ROS, p53 dirige a las células a la proliferación, y bajo condiciones altas de ROS, p53 activa los genes que conducen a la apoptosis de las células (Polyak K *et al.*, 1997). El aumento de evidencias han demostrado que p53 juega un papel importante en la regulación tanto de la glucólisis como de la fosforilación oxidativa, lo que implica una función de coordinación de p53 entre estas dos vías metabólicas y lo convierte en un regulador clave del conocido como efecto Warburg. Las enzimas metabólicas, incluyendo los transportadores de glucosa, enzimas glucolíticas y enzimas del ciclo TCA son objetivos intermedios de p53. Existen elementos de respuesta a p53 en los promotores de los genes PGM55 y hexoquinasa II, lo que sugiere que p53 puede regular por lo menos algunos pasos de la glucólisis. p53 puede inhibir la expresión de los transportadores de glucosa, especialmente GLUT1 y GLUT4 (Schwartzenberg-Bar-Yoseph F *et al.*, 2004), lo que se asocia con una reducción de la captación de la glucosa y un aumento en los niveles de TIGAR (*Tumor Protein 53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*) (Bensaad K *et al.*, 2006). TIGAR tiene función fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa) (Vousden KH *et al.*, 2009). La FBPasa puede promover la degradación de la fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-BP). La disminución de F-2,6-BP contribuye a la acumulación de la fructosa-6-fosfato y hexosas-fosfato en general, favoreciendo la vía de las pentosas fosfato. De esta manera las células tumorales sobreviven al estrés.

La disminución del flujo glucolítico también se logra por la activación transcripcional dependiente de p53 de la SCO2 (síntesis de citocromo C oxidativo 2), lo que resulta en una mayor respiración mitocondrial (Matoba S *et al.*, 2006).

Dentro de la misma ruta glucolítica podemos encontrar otras alteraciones. Cabe destacar la existencia en la célula tumoral de una isoenzima de la piruvato quinasa (PK), la PK-M2. Esta isoforma es menos activa que la PK, y su expresión permite que los fosfometabolitos anteriores al fosfoenolpiruvato (PEP), puedan acumularse y ser utilizados en la síntesis de compuestos necesarios para mantener la proliferación celular, como lo son aminoácidos, ácidos nucleicos y lípidos (Mazurek *et al.*, 2005; Kroemer G y Pouyssegur J, 2008).

El factor de transcripción HIF-1 (*Hypoxia inducible factor-1*) adquiere cada vez más importancia en procesos relacionados con el cáncer. HIF-1 es un heterodímero compuesto por una subunidad beta que se expresa constitutivamente y una subunidad alfa que se sintetiza y se degrada en condiciones normóxicas. Es esta subunidad la que adquiere un papel relevante en cáncer. Aunque HIF-1 es fundamental en el proceso de angiogénesis, cuando el tumor se encuentra en condiciones de hipoxia la regulación de su síntesis y eliminación parece provocar también cambios metabólicos. Para su degradación, HIF-1 es marcado secuencialmente por la enzima prolil hidroxilasa y una ubiquitina ligasa para su posterior procesamiento por el proteosoma 26S. Sin embargo, mutaciones asociadas con el desarrollo tumoral en determinadas enzimas del ciclo de los ácidos carboxílicos (TCA), en concreto las enzimas succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarato hidratasa (FH), promueven la acumulación de los metabolitos succinato o fumarato, los cuales inhiben competitivamente la prolil hidroxilasa encargada de regular la degradación de HIF-1 α , lo que permite que esta molécula pueda dimerizar con HIF-1 β (Gottlieb E y Tomlinson IP, 2005). Esto permite que HIF-1 transactive la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), enzima que fosforila a la piruvato deshidrogenasa y la inactiva, impidiendo que se genere acetyl-CoA, de forma

que este no puede entrar en el TCA y generar equivalentes reductores, comprometiendo la fosforilación oxidativa (Kroemer G y Pouyssegur J, 2008).

3.2. Metabolismo lipídico tumoral

Otra de las alteraciones importantes de las células tumorales afecta el metabolismo lipídico. La enzima de síntesis de ácidos grasos (FAS) se encuentra sobreexpresada, lo que permite mantener una elevada lipogénesis (Medes G *et al.*, 1953; Sabine JR *et al.*, 1967), esencial para la formación de membranas celulares, sustentando de esta forma la proliferación tumoral (Wang HQ *et al.*, 2005). Ésta síntesis de ácidos grasos es también dependiente de la disponibilidad de poder reductor en forma de NADPH, cuyo origen se halla en la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (PPP), estableciéndose una relación entre la PK-M2 y la FAS en el metabolismo tumoral (Kroemer G y Pouyssegur J, 2008; Menéndez JA y Lupu R, 2007). Esta generación de NADPH también se ve favorecida por la inhibición de TIGAR. En condiciones normales TIGAR ayuda a mantener bajos los niveles de ROS y aumentar los de NADPH, reduciendo el flujo glucolítico. Aunque, en un principio esto pudiera no parecer tener sentido, durante el proceso tumoral se produce un aumento de la glucólisis, por lo que la inhibición de TIGAR es fundamental. Además, la expresión de PK-M2 ayuda a que dicho aumento de glucólisis permita que se deriven parte de los metabolitos a la ruta de las PPP y así generar NADPH en grandes cantidades con el objetivo de mantener la proliferación celular (Young CD y Anderson SM, 2008).

3.3. Efecto del eje cdk4-E2F1-pRB sobre el metabolismo

Como es lógico la progresión del ciclo celular es un proceso altamente regulado. Existen muchas proteínas que se encargan de esta regulación coordinada: la familia de supresores tumorales las proteína *pocket* (pRb, p107,

p130), las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) y los factores de transcripción E2F (E2F1-8).

Una de las características más invariable en el cáncer humano es el crecimiento celular descontrolado. Por eso no es de extrañar que exista una vía común de regulación entre la proliferación celular y el metabolismo para asegurar una respuesta celular coordinada. En este ámbito está tomando un gran importancia la vía cdk4-E2F1-pRB, ya que cada vez hay más pruebas de su participación en la regulación del metabolismo celular.

Estudios recientes demuestran la relación entre pRB en el control del metabolismo oxidativo en tejido adiposo (Dali-Youcef N *et al.*, 2007). Anteriormente, también se demostró que los reguladores del ciclo celular participan en el control del metabolismo de lípidos. Los factores de transcripción E2Fs regulan la adipogénesis mediante la modulación de la expresión del receptor nuclear PPAR γ , que es uno de los principales reguladores de la adipogénesis (Fajas L *et al.*, 2002). También se ha ido demostrando el papel de ciclina D3, cdk4 y cdk9 sobre la adipogénesis a través de la regulación positiva de la actividad de PPAR γ (Sarrúf DA *et al.*, 2005; Abella A *et al.*, 2005; Iankova I *et al.*, 2006). Otro dato interesante también es que la actividad de PPAR y la diferenciación de los adipocitos se encuentran reprimidas por RB (Fajas L *et al.*, 2002). Aunque, la primera evidencia del papel de E2F1 en la regulación de la homeostasis de la glucosa se produjo mucho antes, ya que en estudios con ratones defectivos de E2F1 *-/-* (Field SJ *et al.*, 1996; Yamasaki L *et al.*, 1996), se vió que estos ratones presentaban defectos en el crecimiento posnatal del páncreas además de disfunción en las células β , hechos acompañados por una deficiente secreción de insulina e intolerancia a la glucosa (Fajas L *et al.*, 2004). Otros datos sugieren, además, que E2F1 está implicado en el control de otras vías metabólicas. En estudios genómicos fue identificada una cohorte de genes relacionados con la función mitocondrial, indicando un papel potencial de los E2Fs en la relación del estado metabólico de la célula y del ciclo celular (Cam H *et al.*, 2004). E2F1 activa también transcripcionalmente la piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (PDK4), enzima que

está altamente expresada en diabetes y obesidad, disminuyendo la oxidación de la glucosa en mioblastos. Además, la inactivación de Rb, el represor de la transcripción dependiente de E2F, provocaba un gran aumento en la transcripción de PDK4, de hecho se detectaron dos sitios de unión de E2F (Hsieh MC *et al.*, 2008).

Objetivos



Las proteínas hCNT y hENT tienen un papel importante en la fisiología celular debido a su función como transportadores de nucleósidos naturales. Curiosamente, estas proteínas se expresan en muchos tipos celulares, exhibiendo una aparente redundancia funcional. En el caso de los hCNTs, su expresión es altamente dependiente de diferenciación, siendo baja o indetectable en tejidos indiferenciados o tumores. Asimismo, éstas se encuentran ampliamente regulados por distintos estímulos que van desde la adenosina, a través de receptores purinérgicos de tipo P1, hormonas y factores de crecimiento, hasta control nutricional, hipoxia o progresión del ciclo celular.

Hallazgos recientes en distintos miembros de la familia SLC han puesto de manifiesto la implicación de algunas de estas proteínas en funciones cruciales de la fisiología celular que van más allá de su papel como meros mediadores de la bioasequibilidad de sus sustratos. Concretamente, hCNT1 tiene un papel como modulador del crecimiento tumoral, y es un transductor de señales independientemente de su capacidad como transportador de nucleósidos. Asimismo, la reciente identificación de proteínas vinculadas al metabolismo celular capaces de interactuar con hCNT2 y de modular su función anticipa un posible papel de este transportador en la regulación del metabolismo energético.

En base a estos antecedentes, nos planteamos como objetivo general de este estudio:

Estudiar y caracterizar nuevas funciones de los transportadores concentrativos de nucleósidos CNT1 y CNT2

Para alcanzar este objetivo, nos propusimos desarrollar los siguientes objetivos concretos:

1. Validar la interacción de hCNT1 con sus posibles proteínas *partner* previamente identificadas como candidatas.

2. Estudiar la regulación de rCNT2 por efectores purinérgicos e hipoxia en un modelo neuronal de rata.

3. Estudiar la posible implicación de hCNT2 en la regulación del metabolismo energético celular en hígado usando como modelo hepatocitos inmortalizados y células tumorales derivadas de hepatocarcinoma.

Materiales y Métodos



1. Cultivo Celular

El cultivo celular consiste en el mantenimiento de células eucariotas *ex vivo*, en un entorno artificial *in vitro* sobre el cual es posible ejercer un control variable con el fin de preservar al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas originales. Esto nos permite trabajar con una amplia variedad de tipos celulares y a su vez desarrollar multitud de estudios, por lo que áreas de investigación como ingeniería de proteínas, diagnóstico, inmunología, farmacología y citotoxicidad entre otras, dependen de forma importante de las técnicas de cultivo celular.

Los cultivos celulares procedentes de células disgregadas a partir de un tejido original reciben el nombre de **cultivo primario**. Por el contrario, hablamos de **líneas celulares** cuando este cultivo es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación. Las líneas celulares aportan la ventaja de una mejor conservación y permiten la realización de experimentos a más largo plazo que el cultivo primario. No obstante, al haber perdido el control de proliferación, pierden también algunas características fenotípicas dando lugar a células menos diferenciadas que el tejido de origen.

Según su capacidad de adhesión a los soportes utilizados en su cultivo, las células pueden crecer dando lugar a una monocapa o bien crecer en suspensión. En el primer caso las células son dependientes de anclaje y no inician la proliferación hasta haberse adherido al sustrato. De forma general, las células provenientes de órganos crecen en monocapa, mientras que las células de origen sanguíneo suelen crecer en suspensión. No obstante, ciertas líneas celulares pueden crecer formando varias capas superpuestas o tener la facultad de crecer tanto en monocapa como en suspensión.

El crecimiento y el mantenimiento de los cultivos implican toda una serie de medidas con el fin de garantizar al máximo las condiciones de esterilidad y evitar de esta forma el crecimiento de organismos no deseados. Para ello es necesario trabajar en una cabina de flujo laminar vertical, previamente

esterilizada con radiaciones ultravioletas. Todas las superficies de trabajo, incluyendo la cabina y las propias manos del operador, se desinfectan con etanol al 70% antes de iniciar el trabajo con el cultivo celular. Asimismo, todos los medios de cultivo, soluciones y materiales deberán ser estériles. El material necesario para el cultivo incluye:

- Campana de flujo laminar vertical con sistema de esterilización por ultravioleta y sistema de aspiración
- Incubador de células con atmósfera controlada a 37°C y 5% de CO₂ con una humedad relativa del 95%
- Equipamiento criogénico: congeladores a -80°C, tanque de nitrógeno líquido y un contenedor con isopropanol para la congelación gradual de las células
- Baño termostaticado, para atemperar y/o descongelar medios a 37°C
- Autoclave, para esterilizar material diverso para su uso en el cultivo celular o material usado que estuvo en contacto con células
- Pipeteador automático
- Material de plástico desechable, especial para cultivos: pipetas (2-25 mL), placas y frascos de poliestireno, tubos de centrifuga (15-50 mL), tubos de criogenia, tubos *ependorf* (0.5-2 mL), puntas
- Material de vidrio autoclavado, pipetas Pasteur
- *CountessTM automated cell counter* (Invitrogen) o cámara de *Neubauer*
- Microscopio óptico invertido

1.1. Cultivo de líneas celulares

El mantenimiento rutinario de las líneas celulares implica el uso de medios de cultivo que contienen los nutrientes necesarios para la supervivencia celular. Además, con el objetivo de compensar la falta de factores circulantes, estos medios se suelen suplementar rutinariamente con suero.

El trabajo con células adherentes, creciendo en monocapa, implica el replaqueo o pase de una parte de un cultivo de cierta densidad (80-90%) a un nuevo frasco o placa con medio fresco con el fin de garantizar su viabilidad, ya que casi todas las células crecen hasta ocupar toda la superficie de la placa o frasco (confluencia) y esto lleva consigo diferentes acontecimientos no deseados como lo pueden ser la depleción de nutrientes en el medio, acumulación de células apoptóticas o necróticas, arresto celular o diferenciación celular.

A pesar de que en principio las células podrían dividirse casi indefinidamente, este proceso de replaqueo, puede provocar la acumulación de mutaciones y la consiguiente senescencia de las mismas, por lo que de cara a su mantenimiento en el laboratorio se procede a la amplificación y congelación de alícuotas de células de pase bajo.

1.1.1. Tripsinización y replaqueo

Prácticamente todas las líneas celulares utilizadas en la presente memoria son dependientes de anclaje. Con el objetivo de separar las células de su soporte de crecimiento para llevar a cabo el replaqueo se utilizan sustancias como la tripsina o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La tripsina es una enzima proteolítica del grupo de las serina proteasas que permite la rotura de las uniones intercelulares, mientras que el EDTA quela el Ca^{2+} del que depende la adhesión célula-célula. Cada vez que las células entran en contacto con el agente disgregante, en este caso la tripsina, se realiza lo que denominamos un pase. Es conveniente, en el caso de cada cultivo celular, contabilizarlos, ya que es posible que algunas características fenotípicas varíen con el número de pases.

Procedimiento

1. Aspirar el medio de cultivo con una pipeta Pasteur estéril.
2. Lavar las células con 10 mL de PBS1X estéril (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.4 mM y Na_2HPO_4 4.3 mM, pH 7.4), para eliminar restos de suero.

3. Añadir 1 mL de tripsina (0.05% Trypsin-EDTA (1X), Gibco) asegurándose de que toda la monocapa celular ha quedado perfectamente bañada. El frasco se incuba a 37°C hasta que las células empiezan a desengancharse de éste.
4. A partir de este punto, las células se resuspenden en 10 mL de medio de cultivo, inhibiendo de esta manera cualquier acción enzimática posterior, y se procede a la disgregación mecánica utilizando una pipeta de plástico. Si lo que se pretende es mantener la línea celular, se subcultivarán haciendo diluciones desde 1/3 hasta 1/10 en función de la línea celular y del tiempo de duplicación de ésta.

1.1.2. Congelación y descongelación

Tal como ya se ha indicado, el trabajo con líneas celulares debe minimizar el número de pases para evitar la acumulación de mutaciones que pudieran provocar cambios fenotípicos a las células del cultivo alterando de esta forma los resultados. El proceso de congelación pretende, pues, contribuir a la conservación en el laboratorio de alícuotas de cada línea celular para mantener las características fenotípicas de origen.

La congelación de células implica el uso de agentes crioprotectores como el glicerol o el dimetil sulfóxido (DMSO) que ayudan a mantener la viabilidad celular. La composición del medio de congelación puede variar, pero un mayor porcentaje de suero contribuye positivamente a la viabilidad.

Conviene tener en cuenta que los agentes crioprotectores a temperatura ambiente usados en concentración superior al 2% son citotóxicos. Por ello es de máxima importancia minimizar el tiempo de contacto con estos agentes a temperatura ambiente y se debe proceder con rapidez tanto en el procedimiento de congelación como en la descongelación.

Congelación

1. Una vez tripsinizadas las células se centrifugan a 1200 rpm durante 4 minutos en un tubo de 15 mL.
2. A continuación se aspira el medio, se resuspenden las células en 1 mL de medio de congelación (suero con 10% de DMSO) y se alicuotan en crioviales.
3. Rápidamente se introducen los viales en el contenedor de células con isopropanol, el cual permite una congelación gradual de las mismas, favoreciendo la conservación. El contenedor se guarda a -80°C un mínimo de 4h y un máximo de 1 mes y luego se almacenan los crioviales a -196°C en un tanque de nitrógeno líquido.

Descongelación

1. Descongelación rápida del criovial en un baño a 37°C durante el tiempo mínimo necesario para recoger la alícuota en un tubo de 15 mL que contenga unos 10 mL de medio fresco.
2. A continuación se centrifuga el tubo de forma análoga al protocolo de congelación y se aspira el medio, el cual contiene aún el DMSO procedente de la congelación.
3. Resuspender el *pellet* de células en medio fresco y plaquear según proceda.

1.2. Líneas celulares utilizadas

1.2.1. Línea celular PC-12:

Línea derivada de feocromocitoma de rata. Las células responden de manera reversible a *nerve growth factor* (NGF) hacia un fenotipo neuronal. Esto hace que las PC12 sean un muy buen modelo para diferenciación neuronal.

Condiciones de Cultivo: el medio utilizado es *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), *neonatal horse serum* (NHS) 5%, *fetal bovine serum* (FBS) 10%, glutamina 2 mM, piruvato sódico 200 mM y 1% penicilina/estreptomicina. Se recomienda el uso de soluciones de adhesión ya que se adhieren poco al plástico. Crecen formando *clusters* y se adhieren poco a las superficies de crecimiento. Se multiplican lentamente, con un tiempo de duplicación de 92 horas. Se recomienda una dilución 1:4 para subcultivar y renovar el medio cada 2-3 días.

Protocolo diferenciación PC12: debido a que estas células se adhieren poco al plástico, las placas se preincuban con poli-D-Lys 0.01 mg/mL (30 minutos a 37°C o bien 1 hora a temperatura ambiente). Las células se siembran a una densidad 10⁴ células/cm², a las 48 horas se lavan dos veces con PBS 1X, y se incuban con el medio de diferenciación durante los diferentes tiempos de incubación, este medio es igual que el medio completo pero bajo en suero, 0.5% de NHS y NGF 50 ng/mL.

1.2.2. Líneas celulares BCLCs:

Las líneas celulares BCLC-1-6 y BCLC-9 han sido cedidas por el Dr. Jordi Bruix del IDIBAPS del Hospital Clínic de Barcelona, donde fueron generadas a partir de resecciones quirúrgicas de hepatocarcinoma humano.

Condiciones de Cultivo: El medio utilizado para su crecimiento es DMEM/F-12, suplementado con 10% de FBS, glutamina 2 mM, piruvato sódico 200 mM, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, Life Technologies). Las BCLCs deben subcultivarse antes de que lleguen a confluencia (80-90 %) en una dilución 1:5-1:8.

1.2.3. Línea celular Hek293:

Las 293 son células de riñón embrionario humano (*human embryonic kidney, Hek*) y han sido utilizadas para la amplificación y titulación de adenovirus.

Condiciones de Cultivo: el medio utilizado es DMEM, FBS inactivado 5%, glutamina 2 mM, 1% penicilina/estreptomicina. Las Hek293 crecen muy rápido y para el mantenimiento deben subcultivarse antes de que lleguen a confluencia (90-100 %) en una dilución 1:10-1:12.

1.2.4. Línea celular 911:

Las 911 son células de retinoblastoma embrionario humano han sido utilizadas para la amplificación de adenovirus.

Condiciones de Cultivo: el medio utilizado es DMEM, FBS inactivado 5%, glutamina 2 mM, 1% penicilina/estreptomicina. Las 911 crecen muy rápido y para el mantenimiento deben subcultivarse antes de que lleguen a confluencia (90-100 %) en una dilución 1:10-1:12.

1.2.5. Línea celular HHL5:

La línea celular HHL5 (*Human hepatocyte line 5*) se obtuvo en el laboratorio del Dr. Arvind H. Patel en la Universidad de Glasgow. Se generó a partir de la inmortalización de hepatocitos humanos sanos mediante la infección de las oncoproteínas HPVE16 y HPVE17 vehiculizadas en el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV).

Condiciones de Cultivo: el medio utilizado es DMEM, FBS 10%, glutamina 2 mM, 1% penicilina/estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales. Las células HHL5 presentan la morfología ligeramente romboédrica. Para el mantenimiento deben subcultivarse antes de que lleguen a confluencia (90-100 %) en una dilución 1:10-1:12.

1.3 Generación de líneas celulares estables

El sistema Flp-InTM permite la integración y expresión del gen de interés en células de mamífero en un sitio específico dentro del genoma. Esto implica la introducción del FRT (*Flp Recombination Target*) dentro del genoma en la línea

celular de mamífero de elección. La expresión del gen de interés es luego integrado en el genoma gracias a la recombinación que ocurre entre los flancos FRT. Este sistema de integración asegura unos niveles de expresión elevados del gen de interés.

1. El primer paso es generar la línea celular huésped que contenga dentro de su genoma los sitios de recombinación FRT. Para ello, se transfectan las células Hek293 con el vector pFRT/lacZEO (Invitrogen). Este vector contiene un gen de fusión lacZ-Zeocina™ cuya expresión está bajo control del promotor SV40. Los sitios de recombinación FRT han sido insertados justo por debajo del codón de inicio ATG del gen de fusión lacZ-Zeocina™. Los sitios de recombinación FRT sirven como sitio unión y corte para la recombinasa Flp. Una vez transfectadas las células 293 con el plásmido pFRT/lacZeo se seleccionan los clones positivos con Zeocina. Los clones resistentes a este antibiótico significa que han integrado los sitios de recombinación FRT dentro de su genoma.
2. El inserto hCNT1 (pcDNA3.1-hCNT1) debe ser clonado en el vector pcDNA5/FRT (Invitrogen). Este vector contiene el gen de resistencia a la higromicina B con los sitios de recombinación FRT en la zona 5'. Las enzimas de restricción utilizadas fueron KpnI y EcoRV, luego se realizó la ligación entre el inserto hCNT1 y el vector pcDNA5/FRT (**detallado en apartados 9.4 y 9.6, respectivamente**).
3. Se cotransfectan las células 293 huésped (paso 1) con el vector pcDNA5/FRT-hCNT1 y el vector pOG44, este plásmido expresa constitutivamente la recombinasa Flp permitiendo la recombinación homóloga entre los flancos FRT, con una ratio 1:9 utilizando el método de transfección CaCl₂ (**detallado en el apartado 7.1.**). Como control se realiza la doble transfección con el vector pOG44 y el vector pcDNA5/FRT vacío.

- Los clones positivos se seleccionan con higromicina B (100 µg/mL), y se testan mediante ensayos de transporte (apartado 4 de materiales y métodos).

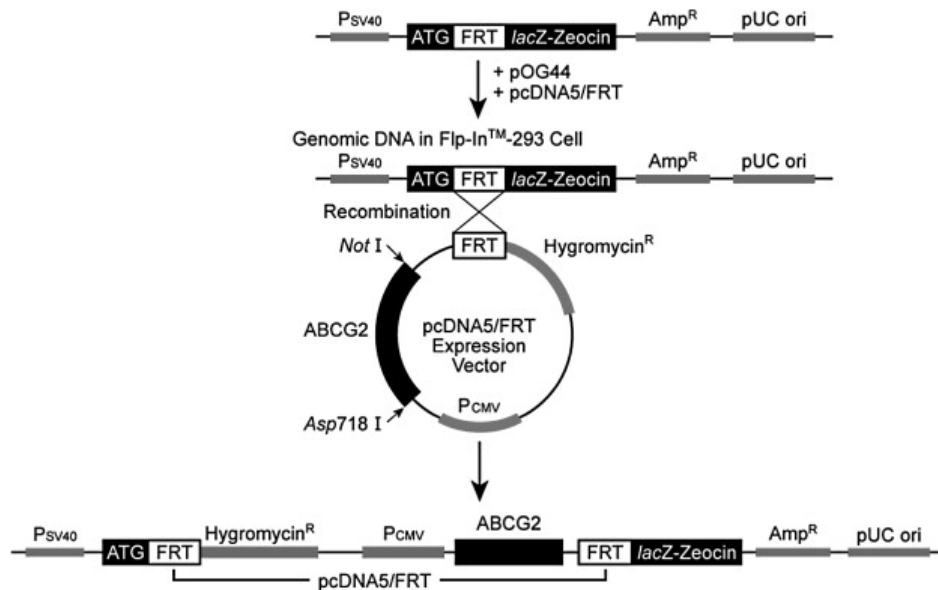


Figura 1. Resumen de todas las construcciones plásmidicas con las que se trabajan en la generación de una línea celular estable utilizando el sistema Flp-In™.

2. Tratamiento de los cultivos celulares

En la Tabla 1 se muestra la lista de compuestos utilizados en los tratamientos a los que se han sometido las líneas celulares anteriormente descritas. La lista de agentes incluye moduladores purinérgicos, inhibidores o activadores de diversas proteínas. Los tratamientos fueron realizados a los tiempos y concentraciones descritos en la tabla, y fueron escogidas de acuerdo a lo descrito en la bibliografía y a los ensayos realizados en el laboratorio.

Compuesto	Casa Comercial	Efecto	Concentración Final	Tiempo Tratamiento
CGS	Sigma	Agonista receptor A2A	50 nM	15 min
NECA	Sigma	Agonista receptores P1	50 nM	15 min
CPA	Sigma	Agonista receptor A1	50 nM	15 min
rPIA	Sigma	Agonista receptor A1	50 nM-50 μ M	<i>time course</i> (min)
DPCPX	Sigma	Antagonista receptor A1	10 nM	preincubación 30 min
ZM 241285	Sigma	Antagonista receptor A2A	10 nM	preincubación 30 min
NGF	Sigma	Diferenciador celular	50 ng/mL	5-10 días
AICAR	Sigma	activador de la AMPK	500 μ M	1 hora
Formicina B	Sigma	inhibidor en <i>cis</i> de CNT2	100 μ M	10 min
TCA	Sigma	forma parte de ácidos biliares	250 μ M	1 hora
IFN α 2b	Dr. Juan I. Esteban (Vell d'Hebron)		300 U/mL	10 min

Tabla 1. Listado de compuestos y condiciones de tratamientos en los cultivos celulares.

3. Técnica de Citometría

El citómetro de flujo es un aparato que, a partir de la inyección de células o partículas en un sistema de flujo provoca su intercepción con la luz de uno o más láseres, permitiendo el análisis de la emisión de fluorescencias y de la luz dispersada por las partículas. La técnica se caracteriza por una alta velocidad de análisis y de detección individualizada de las partículas. Además, muchos citómetros, permiten la separación física de las poblaciones de interés, con una elevada pureza, en función de uno de los parámetros cuantificables. En el momento de realizar las medidas en el citómetro de flujo, las células pueden estar vivas o fijadas, pero obligatoriamente deben estar en suspensión y en forma de célula aislada. Las células son obligadas a pasar alineadas una a una a través de un haz de láser mediante flujo continuo. Cada célula al mismo tiempo dispersa la luz y emite luz fluorescente debido a la excitación del láser a la cuál está sometida. Los parámetros que normalmente se miden de manera simultánea para cada célula son: la dispersión frontal de la luz (*forward scatter*),

que es proporcional al tamaño celular, la dispersión de la luz ortogonal (*side scatter*), proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula, y las intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Una de las más utilizadas, gracias a su rapidez y exactitud, es el análisis del contenido de DNA de un cultivo celular, que permite asignar la frecuencia de la distribución de las poblaciones en cada fase del ciclo celular. También la detección de antígenos, tanto de membrana como intracelulares, a partir de anticuerpos específicos o de otros sistemas conjugados a fluorocromos, establece un protocolo muy útil para estimar el porcentaje de células que están expresando un tipo de proteína o presentan un fenotipo concreto dentro de un tipo de cultivo.

3.1. Análisis del perfil de ciclo celular

La citometría de flujo permite determinar el ciclo celular mediante la tinción del DNA de las células. La distribución típica del DNA en una población celular en crecimiento está formada por dos picos que corresponden a las fases G_1/G_0 y G_2/M y a un valle que corresponde a la fase S. En la fase G_2/M la célula tienen el doble de DNA que en la fase G_1/G_0 . La fase S corresponde a la síntesis del DNA por lo que las células tienen cantidades variables de DNA, que se encuentran entre G_1/G_0 y G_2/M .

El método más habitual para determinar el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular es mediante la tinción con yoduro de propidio (IP), un fluorocromo que se une al DNA por intercalación entre las bases con poca o ninguna secuencia de preferencia y con una estequiometría de un colorante por 4-5 pares de bases de DNA. El IP también se une al RNA, por lo que se requiere tratamiento con nucleasas para distinguir entre el RNA y la tinción de DNA. Se excita a 538 nm, emitiendo una fluorescencia en un amplio rango alrededor de 617 nm. La energía de excitación puede ser suministrada con una lámpara de xenón o de arco de mercurio o con la línea de un láser de iones de argón 488.

Procedimiento

1. Se tripsinizan las células, cada pocillo es una muestra.
2. Se centrifugan suavemente durante 5 minutos a 1500 rpm.
3. Se hace un lavado con PBS1X.
4. A razón de $5 \cdot 10^5$ o $1 \cdot 10^6$ células, se resuspenden en 300 μ L de PBS1X y se les añade gota a gota y en agitación constante y suave 700 μ L de etanol absoluto frío (guardado a -20 °C). El etanol actúa como fijador y permeabilizador, condiciones necesarias para que el IP se intercale en el DNA.
5. Las muestras se dejan a -20 °C, un mínimo de 24 horas para analizarlas pero se pueden dejar hasta un máximo de 15 días, donde las muestras siguen siendo estables.
6. En el momento de analizar las muestras, se centrifugan y se lavan una vez con PBS1X para eliminar el etanol.
7. Se resuspenden las células en 300 μ L con IP (Sigma) 50 μ g/mL y RNasa (Roche) 10 μ g/mL, para evitar la unión del IP al RNA.

Se pasan por el citómetro de flujo un mínimo de 10.000-12.000 células para poder así analizar bien el ciclo celular. Se analizan los datos con el *software* Summit® V3.1 Build844.

4. Transporte de nucleósidos

El método utilizado para estudiar la captación de los diferentes sustratos en cultivos celulares de crecimiento en monocapa, consiste en la incubación simultánea de las células en presencia de sustrato no radiactivo (frío) y de sustrato marcado radiactivamente, a una concentración conocida, durante un tiempo determinado. La radiactividad incorporada por las células, indicativa de la cantidad de sustrato total captado por ellas, se analiza por detención del transporte, posterior lisis de las células y solubilización en líquido de centelleo.

En nuestro grupo de investigación, los ensayos de transporte en células en monocapa se realizan en placas de 24 pocillos, realizando por cuadruplicado cada punto del experimento. Para realizar los ensayos de captación se suplementan paralelamente los medios de sodio y/o colina/N-metil-D-glucosamina (NMDG) con el nucleósido de interés, de manera que la concentración final de sustrato (frío más radiactivo) sea 1 μM . Adicionalmente se añade un volumen determinado del nucleósido marcado correspondiente a 1 μCi por mililitro de medio de transporte. El número de células dependerá del tipo celular y de experimento. En el momento de diseñar las condiciones a ensayar deben tenerse en cuenta los siguientes factores:

- La concentración de sustrato total (marcado y no marcado) debe ser del orden de la K_m (concentración de sustrato para la cual la velocidad máxima es la mitad) del transportador a estudiar.
- El ensayo debe realizarse siempre en condiciones de velocidad inicial (V_0), es decir, donde la cantidad de sustrato transportado es directamente proporcional al tiempo de incubación. Evitando tiempos en los que el transportador esté saturado. Para ello se recomienda realizar previamente experimentos de *time-course*.
- La cantidad de sustrato radiactivo debe ser suficiente para permitir su detección, hecho que depende no sólo de la actividad específica (AE) del sustrato en cuestión sino también de la actividad del transportador.

4.1. Medios de transporte

- **Medio Sodio:** 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM MgSO_4 , 10 mM Hepes, 100 $\mu\text{L/L}$ Rojo fenol, y se ajusta a pH 7.4 con Tris-Base.
- **Medio Colina:** 137 mM ChoCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM MgSO_4 , 10 mM Hepes, 400 $\mu\text{L/L}$ Rojo fenol, y se ajusta a pH 7.4 con Tris-Base.

- **Medio NMDG:** 137 mM NMDG, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, 400 µL/L Rojo fenol, y se ajusta a pH 7.4 con HCl.
- **Medio Stop:** 137 mM NaCl, 10 mM Hepes, 200 µL/L Rojo fenol, y se ajusta a pH 7.4 con Tris-Base.
- **Medio radiactivo:** se prepara partiendo del cálculo de 250 µL/pocillo. Si por ejemplo tenemos una placa de 24 pocillos entera son necesarios 6 mL. Por lo tanto serán 6 mL de medio sodio, colina o NMDG, de la sal que se desee, 6 µL del nucleósido de interés del stock 1 mM y 6 µL del mismo nucleósido marcado radiactivamente 1 mCi/mL.

4.2. Ensayo de transporte de células en monocapa

1. Aspirar el medio de cultivo y lavar dos veces con medio sodio o colina/NMDG, 2 mL/pocillo. Se aspiran bien los pocillos para eliminar al máximo el medio y no diluir la concentración de nucleósido a transportar.
2. Se incuban las células con medio de transporte (230 µL/pocillo) durante el tiempo determinado.
3. Inmediatamente se hacen dos lavados rápidos con la solución de stop, 2 mL/pocillo que se ha mantenido en hielo, deteniendo el transporte por bajada brusca de la temperatura y dilución. Se aspiran bien los posibles restos de medio *stop* (en este punto se pueden congelar las placas a -20°C).
4. Añadir 100 µL/pocillo de la **solución de lisis** (Tritón X-100 al 0.5 NaOH 100 mM) y se mantiene 20-30 minutos en agitación vigorosa a temperatura ambiente. Después con la ayuda de una pipeta automática multicanal se disgrega y se homogeniza bien cada pocillo.
5. De esos 100 µL de lisado celular/pocillo se cogen 10 µL para medir la concentración de proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA) **(detallado en el apartado 5.2.1.)**. Por tanto, éste es un dato a tener en

cuenta en el momento de analizar los resultados de transporte para que puedan ser comparables entre sí. Siempre es necesario hacer una corrección de los datos de captación por concentración proteica presente en la muestra.

6. El resto (90 μ L) se recoge en unos viales provistos de 3 mL de líquido de centelleo (Ecoscint™ H, National Diagnostics) para medir la radiactividad. Este último permite convertir la energía de la partícula emitida durante el proceso de decaimiento radiactivo en luz, la cual es detectada por el contador beta.
7. A parte de los viales con las muestras radiactivas, se debe preparar por triplicado para cada medio radiactivo estándar usado, 3 mL de líquido de centelleo más 5-10 μ L de éste. De esta manera podremos obtener la AE, valor indispensable para analizar los resultados que obtendremos de nuestras muestras.

4.3. Cálculos

Las medidas realizadas en presencia de sodio son indicativas de la tasa total de transporte, incluye el transporte dependiente de sodio, transporte independiente de sodio y la difusión. Las medidas determinadas en el medio con colina o NMDG proporcionan exclusivamente las tasas de transporte independiente de sodio y la difusión. La componente dependiente de sodio se determina como la diferencia entre las dos medidas anteriores. La componente independiente de sodio sensible a NBTI (ENT1) se determina restando la tasa de transporte en medio colina o NMDG con NBTI de la tasa de transporte en medio sin el inhibidor. El resto se considera transporte independiente de sodio insensible a NBTI (ENT2), difusión pasiva y uniones inespecíficas.

El contador de radiactividad proporciona desintegraciones por minuto (dpm) de tritio y los datos de captación se muestran en picomoles de sustrato por miligramo de proteína y por minuto de transporte. Para ello primero se tiene que calcular la AE del medio de transporte radiactivo:

Actividad específica:

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

Sabiendo la actividad específica así como la concentración de proteína, el cálculo de la actividad de la muestra resulta:

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

Se debe tener en cuenta que los valores de dpm de la muestra no son directamente los que el contador genera y hay que transformarlos. Ya que de los 100 μL que se añaden de la solución de lisado, 10 μL se utilizan para determinación de proteína y 90 para determinación de radiactividad acumulada.

Para transporte en placa de 24 pocillos:

$$\text{dpm muestra} = \frac{\text{dpm contador}}{0.9}$$

5. Análisis de la expresión de proteínas

5.1. Obtención de proteína total a partir de cultivos celulares

Para la obtención de lisados celulares de proteína total, que después serán separados por una electroforesis monodimensional y analizados por Western blot, se parte de placas de cultivo de 60 ó 100 mm de diámetro sembradas con la línea celular de interés o bien mediante la homogenización de muestras de tejido. Dependiendo del tipo de anticuerpo primario utilizado, son diversos los tampones de lisis que se utilizan para optimizar el reconocimiento

del epítipo. En cualquier caso el método de extracción es el mismo, lo único en que difiere es en la composición del tampón de lisis a utilizar.

Tampones de lisis

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

Procedimiento

1. Poner la placa con el cultivo celular sobre hielo, lavar dos veces con PBS1X frío y aspirar muy bien.
2. Añadir el tampón de lisis correspondiente a razón de $1 \cdot 10^6$ células/mL de tampón (aunque esto puede variar en función de la línea celular utilizada).
3. Con la ayuda de un *scraper* de plástico, rascamos la placa con el fin de desenganchar y lisar las células. Recogemos la suspensión celular en un tubo *eppendorf*.
4. Para homogenizar bien dicha suspensión, la pasamos varias veces por una jeringa con aguja 25G.
5. Mantener las muestras en hielo (para dejar actuar el detergente) durante 15-30 minutos, agitando vigorosamente varias veces con un agitador tipo *vortex*.
6. Centrifugar a 4°C durante 15-20 minutos a 13200 rpm.

7. Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo y descartar el *pellet*.
8. Cuantificar las diferentes muestras por el método Bradford.

5.2. Valoración de la concentración proteica

Para llevar a cabo los experimentos expuestos en la presente memoria se han realizado rutinariamente dos protocolos de cuantificación de proteína. El método BCA ha sido el elegido para la cuantificación de proteína en los experimentos de captación de nucleósidos, mientras que el método Bradford ha sido utilizado para las muestras de proteína del resto de experimentos.

5.2.1. Método del ácido bicinconínico (BCA)

Se trata de un método de valoración de proteína compatible con detergentes que utiliza el BCA y el cobre. Se fundamenta en la clásica reacción de Biuret, por la cual las proteínas reducen el Cu^{2+} a Cu^{1+} en medio alcalino. La quelación de dos moléculas de BCA por cada ión Cu^{1+} da lugar a una coloración lila que se mide a 550 nm y que es lineal para un amplio rango de concentración.

Reactivos y material

- Pierce® BCA Protein Assay Kit, que incluye la solución A, con ácido bicinconínico, solución B, con CuSO_4 y ampollas de albúmina a 2 mg/mL.
- Placas de 96 pocillos aptas para lector de ELISA.
- Aparato de lectura óptica para placas de 96 pocillos TECAN®.

Procedimiento

1. Para la recta patrón se preparan diluciones de concentración conocida (125-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a partir del *stock* comercial de albúmina en el tampón Tritón-X100 - 0,5% NaOH 100 mM, utilizado para la lisis de las células. Se pipetea por duplicado 10 μL de cada dilución por pocillo.
2. Se mezclan las soluciones A y B a razón de 50:1, se agitan y se añaden 200 μL por pocillo.
3. Se agita suavemente la placa y se incuba 30 minutos a 37°C, pasados los cuales se deja enfriar la placa 10 minutos a temperatura ambiente y se realiza la medida a 550 nm en el aparato de ELISA. Los datos son analizados con el programa Magellan, compatible con TECAN®.

5.2.2. Método Bradford

Este método de valoración de proteína, descrito por Bradford en 1976 se basa en el hecho de que la unión de proteínas, en medio ácido, al azul brillante de Coomassie provoca un cambio del máximo de absorbancia de 465 a 595 nm, longitud a la cual se efectúa la medición. Esta reacción es directamente proporcional a la cantidad de proteína de la muestra, por lo que es aplicable la ley de Lambert-Beer, y mantiene la linealidad para un amplio rango de concentración.

Reactivos y material

- Solución comercial "BIO-RAD Protein Assay Kit I", compuesta de azul brillante de Coomassie, ácido fosfórico y metanol (BIO-RAD).
- Disolución acuosa al 0,1% (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de albúmina sérica bovina (BSA).
- Espectrómetro (Shimadzu UV-160A).
- Cubetas semimicro de espectrofotómetro (Afora).

Procedimiento

1. La solución comercial "BIO-RAD Protein Assay Kit I" se diluye a razón 1:4 en agua destilada.
2. Se pipetea 1 mL de la dilución obtenida en cada cubeta semimicro de plástico. Según el tipo de muestra a valorar, se pipetea entre 2 y 10 μL de muestra por duplicado.
3. Paralelamente se prepara una recta patrón con la disolución de BSA en un rango de concentraciones de entre 0 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
4. Se agitan las cubetas y pasados cinco minutos se mide la absorbancia de la recta patrón y de cada una de las muestras a 595 nm.

5.3. Electroforesis en SDS-PAGE

El sistema más clásico para la resolución de mezclas de proteínas en función de su tamaño es la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de 0,1% dodecil sulfato sódico (SDS) (Laemmli UK, 1970). El SDS es un detergente iónico que se une fácilmente a las proteínas confiriéndoles carga negativa manteniendo una relación carga/masa constante. La mezcla proteica resultante de esta unión se hace correr mediante un campo eléctrico en una matriz polimérica constituida por una combinación de acrilamida/bisacrilamida, de tal manera que la movilidad electroforética de cada componente depende de su tamaño (peso molecular).

Se preparan dos geles que se cargan de manera secuencial. El primero es el gel resolutivo (*running*), donde tiene lugar la separación de las muestras. La concentración de acrilamida de este gel puede oscilar entre el 5 y el 15%, siendo habitualmente elegidas concentraciones mayores de acrilamida cuanto menor tamaño tenga la proteína de interés. El segundo es el gel concentrador (*stacking*), ofrece poca resistencia al movimiento de las proteínas debido al tamaño del poro (5% de acrilamida) y su pH más ácido, de manera que permite el alineamiento de las proteínas a la entrada del gel resolutivo.

- **Geles de poliacrilamida:** Se preparan justo antes de su carga, aunque pueden conservarse durante aproximadamente 24 horas a 4°C, a partir de una solución comercial de acrilamida/bis-acrilamida al 30% (37,5:1) (BIO-RAD).
 - **Gel separador:** Para 10 mL; 3.3 mL, 4 mL o 4.5 mL de la mezcla de acrilamida según se quiera al 10, 12 o 15% respectivamente, 2.5 mL de Tris-Base 1.5 M pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 0.1 mL de persulfato amónico (APS) (BIO-RAD) al 10%, 4 µL de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (BIO-RAD) y agua hasta completar el volumen.
 - **Gel concentrador:** Para 4 mL; 2.7 mL de agua, 0.67 mL de la mezcla de acrilamida, 0.5 mL de Tris 1 M pH 6.8, 40 µL de SDS al 10%, 40 µL de APS al 10% y 4 µL de TEMED.
- **Aparato de PAGE:** Sistema Mini Protean 3 (BIO-RAD) y una fuente de voltaje.
- **Tampón de electroforesis:** Se prepara concentrado diez veces (10X) y está formado por Tris-Base 250 mM, Glicina 1.91 M y SDS al 1%. Se conserva a temperatura ambiente. Se ha de diluir diez veces con agua destilada en el momento de su utilización.
- **Tampón de carga:** Se prepara concentrado 5 veces (5X). Por cada 20 mL se necesitan 6.4 mL de Tris-HCl 1 M a pH 8, 2 g SDS, 10 mL de glicerol y 0.2% de azul de bromofenol. El tampón de carga es estable a temperatura ambiente. En caso en que se desee reducir los puentes disulfuro, se añadiran 100 µL de β-mercaptoetanol por mL, es decir, al 10%. Esta solución se conserva en el congelador a -20°C aproximadamente un mes.
- **Estándares de peso molecular:** El estándar utilizado es el *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* (BIO-RAD) que contiene marcadores de pesos moleculares preteñidos entre 10 y 250 kDa. Rutinariamente se han utilizado 4 µL/pocillo.

Preparación de las muestras:

Las muestras a analizar pueden diferir tanto en su origen como en el procesado previo, del mismo modo, también pueden existir variaciones en la sensibilidad de los diferentes anticuerpos primarios. Por todo ello, la cantidad de muestra necesaria tiene que ser determinada experimentalmente en cada caso. Como regla general se trabaja con 5-50 μg de proteína en un volumen final de 20-40 μL en función de la concentración proteica y el tipo de pocillo que se use. Es importante que la valoración de la muestra sea precisa para garantizar una carga homogénea entre las diferentes muestras y que nos permita realizar un análisis correcto.

Dependiendo también del anticuerpo utilizado se utilizará un tampón de carga reductor o no y se desnaturalizarán las muestras con un tratamiento térmico (hirviéndolas durante 5 minutos ó a 37°C durante 30 minutos) antes de realizar la carga, en función de la proteína a detectar.

Con el objetivo de que las muestras puedan ser cargadas y visualizadas con facilidad, se utiliza un tampón de carga (5X) que confiere densidad y color a las muestras.

Preparación del gel y electroforesis:

1. Se monta sistema de electroforesis (Mini-Protean 3 SDS-PAGE de BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Se preparan las soluciones de los geles separador y concentrador sin el TEMED, catalizador de la polimerización, el cuál se añadirá justo en el momento de introducir la solución entre los vidrios del montaje. El grosor del gel de acrilamida viene determinado por el grosor de los separadores, de manera que si éstos son de 1,5 mm la cantidad de gel separador a preparar es, aproximadamente, de 10 mL y si son de 0.75 mm solamente es necesario preparar la mitad, 5 mL.

3. Se prepara el montaje, se comprueba la hermeticidad de los vidrios en su soporte y se procede a la adición de la solución separadora. Para garantizar la formación de un gel uniformemente plano, se añade sobre el mismo unos mililitros de agua que se retiran una vez completada la polimerización.
4. A continuación se añade la solución del gel concentrador y se introduce el peine que da forma a los pocillos.
5. Una vez el gel concentrador haya polimerizado, se retira el peine, se monta el sistema, se introduce dentro de la cubeta de electroforesis y se añade el tampón.
6. A continuación se cargan las muestras, reservando un carril para el marcador de pesos moleculares (4 μ L), y se conecta la cubeta a la corriente. Rutinariamente, para los experimentos mostrados en esta memoria, se han escogido condiciones de amperaje constante, a 40 mA por gel de 1.5 mm.

Tinción de Coomassie

En aquellos casos en los que la electroforesis de proteínas no tenga por objetivo la electrotransferencia de las mismas a una membrana para la detección por anticuerpos (Western blot) y se pretenda tan sólo detectar la presencia/ausencia de las bandas proteicas se puede llevar a cabo la tinción de las proteínas en el mismo gel. Esta tinción también puede ser deseable en aquellos casos en que se pretenda el aislamiento de la banda proteica para su identificación por espectrometría de masas.

Entre los numerosos sistemas de tinción de proteínas en el gel el más común es el que utiliza el azul brillante de Coomassie R-250, el cuál se une de forma no específica a todas las proteínas. Es un método rápido y barato en el cuál todas las proteínas se tiñen con intensidad similar pero tiene la limitación de ser menos sensible que otros métodos de tinción como sería la tinción con plata.

1. Una vez finalizada la electroforesis se deja el gel en una cubeta con la solución de tinción (50 mL de agua, 50 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial y 0.1% de Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente en suave agitación.
2. Transcurrido este tiempo, retirar la solución y desteñir con una solución de metanol al 40% en agua. Al principio es necesario cambiar con frecuencia esta solución cuando ha tomado color azul. El tiempo que tardan en aparecer las manchas o bandas es variable en función del tamaño y grosor del gel. Si son geles muy grandes puede desteñirse durante toda la noche disminuyendo la concentración de metanol. Los resultados mejoran si una vez que se observan las bandas se retira la solución para desteñir y se deja en agua 1 día.

Una vez realizada la tinción, las proteínas quedan fijadas en el gel, por lo que no es posible la realización de un *Western blot* después de la tinción. Los geles teñidos pueden guardarse a 4°C dentro de una membrana plástica con agua o bien deshidratados con glicerol al 10%. La solución de tinción es reutilizable.

5.4. Western Blot

Esta técnica permite la detección de proteínas gracias a la transferencia electroforética de éstas a una membrana donde quedarán retenidas por adsorción (separadas según su peso molecular en el gel separador) y su posterior detección mediante el uso de anticuerpos específicos.

Electrotransferencia de proteínas

1. Una vez acabada la electroforesis, se desmonta y se descarta el gel concentrador. Colocamos el gel separador en una bandeja con tampón de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v))

- durante unos minutos mientras se prepara el material necesario para montar la transferencia.
2. Se corta un trozo de membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF Immobilon-P (Millipore), poro de 0.45 μm para proteínas > 10 KDa) de la misma medida que el gel (5 x 9 cm) y se sumerge durante 15 segundos en metanol con el objetivo de activarla ya que es muy hidrofóbica. Posteriormente, y siempre procediendo con guantes para evitar ensuciarla, se lava con agua destilada 2 minutos y se deja en tampón de transferencia hasta su posterior utilización.
 3. Se cortan también seis trozos de papel de filtro Whatman 3MM ligeramente más grandes que la membrana (8 x 10 cm) y se sumergen en tampón de transferencia.
 4. El montaje se realiza en una bandeja con tampón de transferencia, colocando tres papeles Whatman, el gel, la membrana y otros tres papeles Whatman entre dos esponjas, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana y asegurando una correcta transferencia.



Figura 2. Secuencia de montaje de la transferencia en la técnica de Western Blot.

5. Este sándwich se coloca en la cubeta (Sistema de transferencia Mini-Protean 3 (BIO-RAD)) llena de tampón de transferencia agitado continuamente por una barra magnética y una cubeta con hielo para evitar el calentamiento del tampón y del resto del montaje.

6. Se conecta a una fuente de voltaje y se fija el voltaje a 100 V entre 1-2 horas, en función del tamaño de la proteína.
7. Tras finalizar la transferencia de las proteínas, debe realizarse una visualización directa de éstas tiñendo de forma reversible la membrana con solución de Ponceau (0.1% de Ponceau S y un 5% de ácido acético glacial en agua destilada) para comprobar que la transferencia haya ido correctamente. Para ello, solamente es necesario sumergir la membrana unos segundos en la solución de Ponceau y lavar el exceso con agua destilada.

Inmunodetección

La detección de la proteína de interés inmovilizada en la membrana de PVDF se realiza mediante la utilización secuencial de dos anticuerpos. El primero de ellos es el que se une específicamente a la proteína en cuestión mientras que el anticuerpo secundario permite la detección del primario amplificando la señal y permitiendo la visualización gracias a la reacción de la peroxidasa de rábano (HRP) unida a la cadena pesada de éste.

Soluciones

- **TBS1X:** 20 mM Tris base, 150 mM NaCl y se ajusta a pH 7.6 con HCl
 - **Solución de lavado:** TBS con un 0.1% de Tween-20 (BIO-RAD)
 - **Solución de bloqueo:** 5% (p/v) de leche descremada en polvo disuelta en TBS-Tween 0.1%. Alternativamente, y especialmente en el caso de los anticuerpos contra las proteínas fosforiladas, es preferible utilizar una solución de albúmina sérica bovina BSA (Sigma) entre 3-5% (p/v) en TBS-Tween al 0.1% (v/v).
1. Una vez finalizada la transferencia se introduce la membrana en una bolsa de plástico sellada conteniendo 10 mL de la solución de bloqueo y

se dispone en un agitador orbital. Esta incubación con una solución rica en proteínas tiene por objetivo bloquear los lugares de unión inespecíficos de la membrana y se debe realizar un mínimo de una hora a temperatura ambiente, siendo posible también una incubación durante toda la noche a 4°C.

2. Transcurrido el tiempo de bloqueo, se saca la membrana y se introduce en una nueva bolsa conteniendo al menos 5 mL de la solución de bloqueo con el anticuerpo primario. En caso de que la solución de anticuerpo deba ser preparada en BSA 3-5% en TBS-Tween 0.1%, se debe lavar previamente la membrana con la solución de lavado durante 5 minutos. El tiempo de incubación puede variar entre anticuerpos.
3. Se lava la membrana 3 veces (10 minutos) con la solución de lavado.
4. A continuación se incuba la membrana con el anticuerpo secundario en la solución de bloqueo durante 1 hora.
5. Se lava la membrana 4 veces (5 minutos) con la solución de lavado.
6. A continuación revelamos la membrana, que no es más que la detección de la actividad peroxidasa, con el sistema ECL (*Enhanced ChemoLuminiscent Method*, Biological Industries), dando lugar a un producto quimioluminiscente. Se cubre la membrana con dos soluciones (A y B, 1:1) que contienen respectivamente H₂O₂, y luminol (sustrato de HRP) más un agente amplificador de la señal (500 µL/membrana).

Para la detección de la señal en este trabajo se han utilizado dos sistemas. El primero consiste en la detección de la luz emitida en el transcurso de la reacción mediante su impacto encima de un film fotográfico dentro de un *cassette* en una cámara oscura, que se revela con las soluciones habituales fotográficas. El segundo consiste en la detección mediante una cámara fotográfica de sensibilidad elevada que genera una imagen digital Las-3000 (Fujifilm).

Proteína	Casa Comercial	Reactividad	Dilución	Clon	Peso Molecular
AMPK	Cell signaling	humano, rata, ratón	1/1000	policlonal	62 kDa
fosfo-AMPK	Cell signaling	humano, rata, ratón	1/1000	policlonal	62 kDa
ACC	Cell signaling	humano, rata, ratón	1/1000	policlonal	280 kDa
fosfo-ACC	Cell signaling	humano, rata, ratón	1/1000	policlonal	280 kDa
tubulina	Sigma	humano, rata, ratón	1/10000	monoclonal	50 kDa
rCNT2	Propio	rata	1/1500	policlonal	65 kDa
hCNT1	Propio	humano	1/1000	monoclonal	75 kDa
RhoGDI2	Abcam (ab12427)	humano	1/1000	policlonal	28 kDa
RhoGDI2	Abcam (ab88317)	humano	1/1000	policlonal	28 kDa

Tabla 2. Resumen de las condiciones de uso de los anticuerpos utilizados en los ensayos de western blot.

Deshibridación de la membrana

Las membranas utilizadas en el ensayo de *western blot* pueden ser reutilizadas para la detección de otras proteínas a partir de otros anticuerpos, siempre y cuando los pesos moleculares de las distintas proteínas a detectar sean suficientemente distintos y que la presencia de una señal anterior no interfiera en las determinaciones subsiguientes. Así como por ejemplo para el análisis cuantitativo, donde se usa un anticuerpo contra una proteína que se exprese de forma equivalente en todas las muestras. El objetivo es poder corregir las diferencias debidas a los errores en la carga o cuantificación proteica. El procedimiento es el mismo que se ha descrito previamente, sin embargo en algunos casos es necesario eliminar de la superficie de la membrana cualquier señal previa utilizando métodos de deshibridación o *stripping*.

1. Incubar la membrana, con el volumen mínimo para cubrirla, 5-10 minutos a temperatura ambiente con el tampón de deshibridación (para 1 litro: 15 g glicina, 1 g SDS, 10 mL Tween-20, ajustar pH a 2.2 con HCl y agua hasta volumen final).
2. Descartar el tampón de deshibridación.
3. 10 minutos PBS1X
4. 10 minutos PBS1X

5. 5 minutos TBS-Tween 0.1%
6. 5 minutos TBS-Tween 0.1%
7. Volver a incubar la membrana con solución de bloqueo.

5.5. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es una técnica que permite el estudio de la localización de determinadas moléculas en la célula. Lo más habitual es la detección de dichas moléculas mediante el uso de anticuerpos específicos unidos a un fluorocromo o bien el uso secuencial de dos anticuerpos: el primario, específico contra la proteína de interés, y el secundario marcado con el fluorocromo, de esta manera es posible amplificar la señal. El uso de diferentes anticuerpos permite la localización simultánea de varias proteínas, permitiendo determinar su localización relativa en el seno de la célula.

1. Se disponen los cubreobjetos en los pocillos de una placa de 24 pocillos y se esterilizan durante 10-15 minutos con UV.
2. Se siembran las células y cuando estas están a punto para ser ensayadas se aspira el medio y se realizan dos incubaciones de 5 minutos con PBS1X.
3. A continuación se aspira el medio de lavado y las células se incuban durante 15 minutos con la solución de fijación (4% paraformaldehído en PBS1X pH 7.4).
4. Se realizan dos lavados de 10 minutos con PBS1X que permiten la eliminación del paraformaldehído sobrante. En este punto podríamos parar el procedimiento y guardar los cubres a 4°C y realizar la inmunodetección otro día.
5. En los casos en los que se pretende que un anticuerpo penetre en el interior de las células se procede entonces a la permeabilización de las células durante 10 minutos con la solución de permeabilización (PBS suplementado con 20 mM glicina, 0.1% Tritón X-100, pH 7.4). En este

caso, el agente que permite la entrada del anticuerpo es el Tritón X-100, el cual se recomienda mantener en las incubaciones posteriores. Todas las incubaciones de este procedimiento se deben realizar en suave agitación orbital.

6. Los cubreobjetos con las células permeabilizadas se incuban con la solución de bloqueo (PBS -20 mM glicina, 0.1% Tritón X-100, 1% Albúmina sérica bovina (BSA), pH 7.4) durante 45 minutos en agitación.
7. A continuación se puede proceder a la incubación con 50 μ L/cubre del anticuerpo primario a la dilución correspondiente (para este trabajo se utilizó el anticuerpo anti-MAP2 (*microtubule-associated protein 2*) a una dilución 1/500, durante 1 hora a temperatura ambiente o O/N a 4°C. Para realizar este paso se puede disponer el anticuerpo en forma de gota en un trozo de papel de parafina y colocar cuidadosamente con unas pinzas el cubreobjetos sobre la gota evitando la formación de burbujas de aire. Se recomienda poner los cubreobjetos en una cámara húmeda para evitar una excesiva evaporación.
8. Para eliminar correctamente el anticuerpo no unido se vuelven a colocar los cubreobjetos en la placa de 24 pocillos y se realizan tres lavados de 10 minutos con PBS1X.
9. Seguidamente se incuba durante 1 hora con 50 μ L/cubre de anticuerpo secundario (para este trabajo se utilizó anti-mouse Alexa Fluor® 488 a una dilución 1/500) siguiendo el mismo procedimiento que con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. En este caso además, se debe tener la precaución adicional de proteger las muestras de la luz para evitar la degradación del fluorocromo.
10. Se realizan los tres últimos lavados con PBS1X y se montan los cubreobjetos sobre el portaobjetos con una gota de medio de montaje (AquaPoly Mount, Polysciences Inc.) evitando la formación de burbujas de aire y el contacto con la luz.

11. Una vez el medio de montaje ha gelificado (mínimo una hora a temperatura ambiente, se pueden guardar a 4°C) las muestras ya están listas para su observación en el microscopio de fluorescencia.

Para el correcto análisis de la expresión de las diferentes proteínas se deben realizar una serie de controles en paralelo. Lo más habitual es un control de autofluorescencia (mismo proceso pero sin el uso de anticuerpos), un control de anticuerpo secundario (incubación únicamente con anticuerpo secundario).

5.6. CoInmunoprecipitación

La CoInmunoprecipitación (CoIP) es la técnica más sencilla para el estudio de interacciones de proteínas *in vivo*, siempre y cuando los anticuerpos contra las proteínas de interés estén disponibles. En la CoIP se utiliza un anticuerpo contra una proteína diana, acoplado a bolas de Sepharosa a través de la proteína A o G, entonces los complejos que contienen la proteína diana se inmunoprecipitan con las bolitas de Sepharosa mediante centrifugación. Los componentes proteicos de los complejos se visualizan a través de *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para las distintas proteínas de interés.

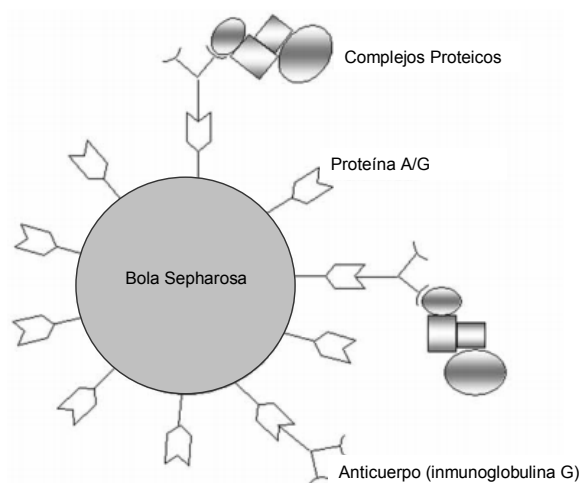


Figura 3. Esquema del funcionamiento de una CoIP.

Procedimiento

1. En hielo, en un tubo *ependorf* se pone entre 100-500 μg de extracto proteico (depende de la abundancia relativa de la proteína de interés y de la afinidad del anticuerpo por la proteína) junto con el anticuerpo primario para la proteína en cuestión (mirar recomendaciones de la casa comercial, sino como guía se debe empezar por 2-4 μg . Para el caso de RhoGDI2 utilizamos 4 μg de anticuerpo y 200 μg de extracto proteico. Todo se lleva a un volumen mínimo de 100-150 μL con tampón de lisis recién preparado (el tampón de lisis será el mismo que haya sido utilizado para la extracción de proteínas).
2. Incubar la muestra con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C en un agitador orbital.
3. Preparar la proteína A-sepharosa (anticuerpos policlonales) o proteína G-sepharosa (anticuerpos monoclonales). Pipetear 15 μL (con la punta cortada con tijeras para evitar dañar las bolas y para que se coja bien el volumen deseado).
4. Se lavan las bolas dos veces con 300 μL de tampón de lisis, centrifugando 2 minutos a 4000 rpm. En el último lavado retiramos bien el sobrenedante y añadimos 15 μL de tampón de lisis (1 resina: 1 tampón).
5. A estos 30 μL añadimos los 100-150 μL del extracto proteico más el anticuerpo primario, y lo dejamos incubar 4-5 horas a 4°C en el agitador orbital.
6. Una vez pasado el tiempo de incubación, centrifugar 2 minutos a 4000 rpm a 4°C.
7. Retirar el sobrenedante. Pero de éste se guardaran 20 μL como muestra para el western blot que se hará al final del proceso.
8. A continuación se realizarán un seguido de lavados de 300-500 μL al pellet de bolitas con tampón de lisis, en una centrífuga a 4°C. Cada centrífuga será de 2 minutos y las rpm irán bajando 4000, 3500, 3000, 2500 y 2000.

9. En el último lavado aspirar bien las bolitas, y resuspender con 30 μ L de tampón de carga 2X (10% de β -mercaptoetanol).
10. Hervir las muestras 5 minutos a 95-100°C ó 30 minutos a 37°C, en función del anticuerpo que vayamos a utilizar para realizar el western blot.
11. Centrifugar 2 minutos a 2000 rpm, y recoger el sobrenadante, que lo congelaremos a -20°C hasta el momento de realizar la electroforesis y posterior inmunodetección.

6. Análisis del metabolismo celular

6.1. Cuantificación de la respiración celular

Para realizar experimentos de respirometría en células, se ha utilizado el aparato *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience). Este aparato consta de dos sensores ópticos capaces de medir la concentración de oxígeno y de protones del medio extracelular. Este aparato puede medir el consumo de oxígeno en células adheridas en placa de 24 pocillos, permitiendo realizar réplicas en un mismo experimento. Además, mide simultáneamente la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR). La OCR permite hacer una estimación de la respiración mitocondrial. Al tratarse de un método no invasivo, permite medir la OCR en repetidas ocasiones a lo largo del tiempo, permitiendo la adición secuencial a las células de distintos compuestos, como desacopladores o inhibidores de la cadena respiratoria.

Medida de la tasa de consumo de oxígeno (OCR)

En esta tesis se ha utilizado un protocolo basado en la adición sucesiva de diferentes compuestos que permiten analizar la OCR en distintos estados respiratorios (figura 4).

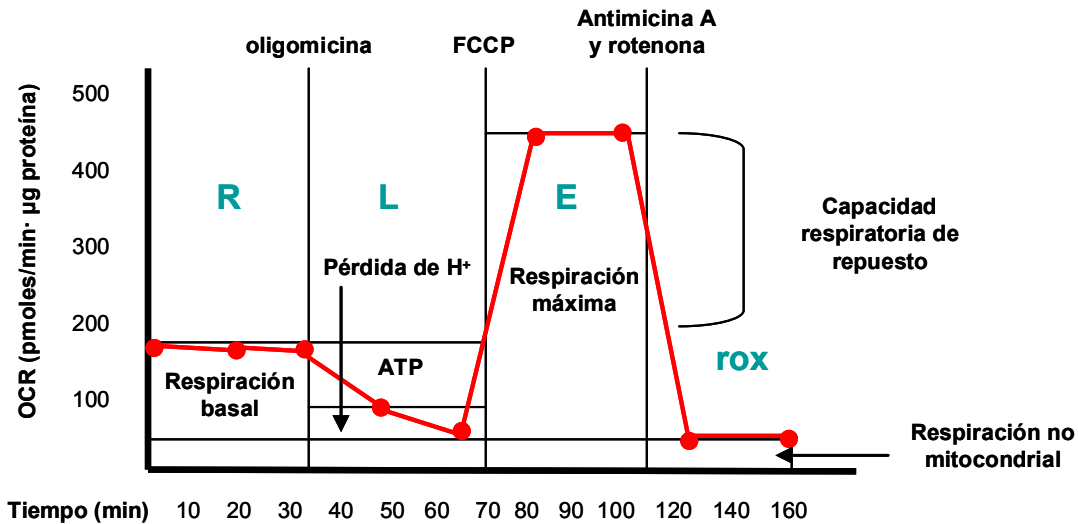


Figura 4. Ejemplo de la medida de la OCR en diferentes estados respiratorios de las células. La línea roja representa el consumo de oxígeno expresado en pmol/min. Los puntos son el número de medidas realizadas en cada estado y representan la media \pm SEM de las réplicas efectuadas. Las líneas verticales en negro indican el momento justo en el que se ha añadido cada compuesto.

- Estado R (rutina) o respiración basal: tasa de consumo de oxígeno por parte de las células a partir de los sustratos proporcionados por el propio medio de cultivo. Depende de la demanda energética celular y del grado de acoplamiento entre respiración y síntesis de ATP. Es la situación más parecida a la fisiológica, ya que no se añade ningún desacoplador ni inhibidor de la cadena respiratoria.

- Estado L (*leak*) o pérdida de protones: tasa de consumo de oxígeno celular obtenida al inhibir el complejo V de la cadena de transporte electrónico con oligomicina. Nos da información del consumo de oxígeno no acoplado a la síntesis de ATP.

-Estado E o respiración máxima: tasa de consumo de oxígeno celular en desacoplar la cadena respiratoria de la síntesis de ATP al añadir FCCP. Este estado nos indica la capacidad máxima del sistema de transporte de electrones.

-Estado rox (residual oxygen consumption): tasa de consumo de oxígeno no mitocondrial estimada, después de añadir rotenona y antimicina A, inhibidores de los complejos I y III, respectivamente. Si queremos expresar las OCR obtenidas en los diferentes estados como consumo de oxígeno mitocondrial, se resta el valor de la tasa de consumo de oxígeno en estado rox a todos los valores anteriores.

A la hora de diseñar cualquier experimento se debe tener en cuenta que sistema sólo permite añadir 4 compuestos y que éstos deben ser permeables a la membrana plasmática. El número óptimo de células, la concentración adecuada de los inhibidores y la duración de las medidas dependen del tipo célula, por lo tanto se deben determinar en experimentos previos.

Procedimiento

1. La placa es de 24 pocillos (0.3 cm² de diámetro) donde se siembran las células, 4 pocillos se utilizan como control del aparato, y 10 pocillos para medir la OCR para cada condición (AdCtrl y AdhCNT2). En nuestro caso debido a la dificultad de crecimiento de nuestras células en estas placas (el material del cuál están hechas estas placas es distinto a las placas que normalmente utilizamos para su cultivo), las células se sembraron y se infectaron en placas de 10 cm de diámetro, y a las 24 horas post-infección las células se tripsinizaron y resembraron a una densidad de 20.000 células/pocillo. El experimento siempre se realizó a las 72 horas post-infección.
2. El día anterior del experimento encender el aparato, *XF Analyzer* y programar el protocolo que se quiere utilizar, ya que tarda unas horas en alcanzar la temperatura adecuada. También se prepara la placa de calibración con 1mL/pocillo del líquido calibrador (Seahorse Bioscience). Esta placa, envuelta en parafilm, se coloca en una estufa a 37°C, donde no se regulen los niveles de CO₂, durante 16 horas.

3. El día del experimento se preparan las soluciones 10X de las compuesto a utilizar (oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A) en el medio para medir. Este medio es DMEM base (8.3g/L; Sigma) suplementado con 25 mM de glucosa. Se ajusta el pH a 7.4 y se filtra. Este medio no contiene bicarbonato ya que podría interferir en la medida de la concentración de protones.
4. Cambiar el medio de las células con 700 uL del medio especial suplementado con glucosa 25 mM e incubarlas durante 30 minutos en un incubador a 37°C sin CO₂.
5. La placa de calibración lleva incorporada un sistema de inyección del aparato, formado por 4 puertos por pocillo. En este sistema lo cargaremos con las soluciones 10X de los diferentes compuesto, teniendo en cuenta el siguiente orden de los compuestos.

D	C
B	A

Puerto A: 75 µL de la solución 10X de oligomicina, [1µg/mL]_{final}

Puerto B: 75 µL de la solución 10X de FCCP, [0.75 µM]_{final}

Puerto C: 75 µL de la solución 10X de FCCP, [1.5 µM]_{final}

Puerto D: 75 µL de la solución 10X de rotenona + antimicina A, [1 µM]_{final} (para ambos compuestos)

6. Colocar la placa de calibración en el aparato XF24 Extracellular Flux Analyzer y se calibran los sensores de oxígeno y pH del aparato. Este proceso dura unos 30 minutos.
7. Cuando se acaba el proceso de calibración, se cambia la placa de calibración por la placa con las células y se inicia el protocolo programado previamente.
8. Una vez a finalizado el experimento, mirar las células al microscopio comprobar que ninguno de los compuestos utilizados ha tenido

cualquier efecto citotóxico. Lavar la placa con PBS1X y congelarla en el congelador de -20°C , para la posterior cuantificación de la proteína (**detallado en el apartado 5.2.1.**), valor que se utiliza para normalizar los valores obtenidos en el experimento de consumo de oxígeno.

A partir de estos valores absolutos de OCR, se pueden calcular diferentes ratios que nos ofrecen información sobre el grado de acoplamiento de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (Hütter E *et al.*, 2004; Gnaiger E, 2007).

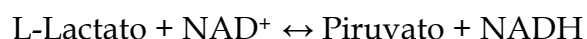
- **Uncoupling Control Ratio (UCR)**: es el cociente entre el consumo de oxígeno del estado E y el consumo de oxígeno en rutina (**E/R**), y expresa la capacidad respiratoria de reserva que tienen las células. La inversa del UCR, **R/E** o **Routine Respiratory Control Ratio**, indica el porcentaje de la capacidad máxima que utilizan las células en el estado respiratorio de rutina.

- **Respiratory Control Ratio (RCR)**: es el cociente entre la respiración en el estado E y el estado *leak* (**E/L**) y valora el grado de acoplamiento de la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. La inversa del RCR, **L/E** o **Leak Respiratory Control Ratio**, indica el consumo de oxígeno que no está ligado a la fosforilación oxidativa respecto a la capacidad máxima, y que es debido mayoritariamente al *proton leak*.

- **Phosphorylation Respiratory Control Ratio (RCR_p)**: es el cociente (**R-L**)/E e indica el porcentaje de la capacidad respiratoria máxima que utilizan las células ligado a la producción de ATP.

6.2. Determinación del lactato del medio de cultivo mediante lector de ELISA

La determinación del lactato se basa en la reacción:



La reacción la lleva a cabo la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). El método está basado en la reacción de la LDH para medir el aumento de

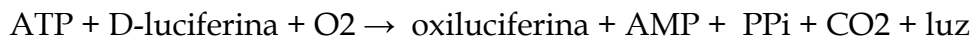
absorbancia por formación de NADH ($\lambda=340$ nm). Como el equilibrio de esta reacción está notablemente desplazado hacia la formación de Lactato, se añade hidrazina al medio de reacción de forma que al complejar el piruvato se pueda desplazar el equilibrio hacia la formación de NADH.

Procedimiento

1. Preparar un banco de diluciones de lactato (Sigma-Aldrich Co.) con las siguientes concentraciones: 0, 0.120, 0.225, 0.375, 0.6, 0.8, 1.2, 1.5, 1.8 y 2 mM, para obtener una recta patrón, sabiendo que se necesitan 18.5 μL /pocillo de cada punto y por duplicado (la valoración se realiza en una placa de 96 pocillos).
2. Recoger sobrenadante de las células (20-100 μL). En esta tesis se ha trabajado con células sembradas en placa de 24 pocillos para determinar la concentración de lactato. Se pueden guardar las muestras a -20 °C.
3. Diluir las muestras entre 1/10 y 1/20 (dependiendo del tipo celular) para que las medidas de absorbancia entren dentro de la recta patrón.
4. Para cada pocillo se añade 11.5 μL de agua, 18.5 μL de muestra o patrón y 185 μL de una mezcla 10:1 de tampón de Hidrazina 0.5 M EDTA 12 mM (pH 10) (Sigma-Aldrich Co.) con NAD^+ 30.15 nM (Sigma-Aldrich Co.).
5. Añadir a cada pocillo 5.25 μL de LDH (1100 U/mg, Roche) diluída $\frac{1}{4}$ con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.2 M (pH 6.5) e incubar durante 3 horas a 37 °C.
6. Leer la absorbancia a 340 nm (Infinite 2000, TECAN).
7. Interpolar los valores de absorbancia de las muestras a la recta patrón para obtener la concentración de las muestras.
8. Cuantificar proteína para cada pocillo, para normalizar los valores obtenidos por proteína.

6.3. Cuantificación del ATP intracelular

La concentración del ATP intracelular es una información muy valiosa para llegar a conocer el estado energético de una célula. Para determinarla hemos utilizado *ATP Bioluminescence Assay Kit HS II* (Roche), que se basa en la actividad de la enzima luciferasa de *Photinus pyralis* catalizando la siguiente reacción:



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

Procedimiento

1. Preparar un banco de diluciones de ATP (incluido en el kit) desde 10^{-12} a 10^{-5} , incluyendo un blanco de agua, para poder obtener la recta patrón, sabiendo que se necesitan 25 μL para cada pocillo y por duplicado (la valoración se realiza en una placa de 96 pocillos para luminiscencia (BIOGEN Científica, S.L.)).
2. Aspirar el sobrenadante y lavar las células con PBS1X.
3. Añadir 100 μL de *Dilution Buffer* (kit) por pocillo en la placa de 6 pocillos, y rascar con un *scraper*. Se separan 5 μL de cada muestra para valorar la concentración de proteína por Bradford.
4. Añadir a los puntos de la recta patrón y de las muestras un volumen 1:1 de *Cell Lysis Buffer* (kit) y transferir 50 μL de esta mezcla a una placa de luminiscencia opaca de color blanco.
5. Realizar la lectura de luminiscencia mediante un luminómetro con inyectores (*Glomax* de Promega) con los siguientes parámetros:
 - Adición automatizada de 50 μL /pocillo de *Luciferase Reagent* (kit).

- Intervalo de un segundo entre la adición del *Luciferase Reagent* y el inicio de la lectura.
 - Lectura integrada de 10 segundos.
6. Interpolar los valores de absorbancia de las muestras a la recta patrón, representada en forma de log-log, para poder obtener la concentración de las muestras.

7. Técnicas de expresión heteróloga o silenciamiento

7.1. Transfección con CaCl_2

El DNA recombinante se introduce dentro de las células Hek293 mediante la transfección con cloruro de calcio, pero previamente el DNA se ha purificado mediante el método extracción/purificación con fenol-cloroformo/ácido isoamílico (**detallado en el apartado 9.5.2.**).

Procedimiento

Para realizar la transfección, el día anterior se deben sembrar $1 \cdot 10^6$ células de la línea Hek293 en una placa de 6 cm de diámetro. Y debe cambiarse el medio unas 3 horas antes de realizar la transfección.

1. En un tubo eppendorf se ponen 5 μg del vector purificado en un volumen final de 50 μL . Además para cada transfección se preparan dos tubos más:

<u>Tubo 1</u>	<u>Tubo 2</u>
169 μL de agua	250 μL de HBS 2X:
5 μL de CaCl_2 2 M	50 mM Hepes
	280 mM NaCl
	1.5 mM $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

2. En el tubo 1, se añaden gota a gota los 50 μL del vector purificado, después 26 μL más de CaCl_2 2 M, y se mezcla lentamente dos veces.
3. A continuación, con la ayuda de un pipeteador automático y una pipeta Pasteur de vidrio, se burbujea el contenido del tubo 2 y al mismo tiempo se añade gota a gota los 250 μL del tubo 1. Una vez añadido todo el volumen se sigue burbujeando durante 5 segundos más y se deja reposar 1 minuto.
4. Estos 500 μL finales, son los que se añaden gota a gota a la placa de las Hek293 y se agita suavemente para facilitar su distribución.
5. A las 4 horas ya se observan los precipitados pero no es hasta las 16 horas que se elimina el medio y se lava la monocapa con mucho cuidado una vez con 1 mM de EGTA en PBS y dos veces con PBS.

7.2. Transfección con transIT-siQUEST (siRNA)

El procedimiento que se describe a continuación explica el protocolo seguido para transfectar las células con siRNA utilizando el reactivo TansIT-siQUEST (Mirus) en placa de 24 pocillos.

Procedimiento

1. Sembrar las células 18-24 horas antes de realizar la transfección a una densidad adecuada para que antes de la transfección se encuentren alrededor del 60-80% de confluencia.
2. En el momento de la transfección, atemperar el reactivo TansIT-siQUEST a temperatura ambiente y cambiar el medio de las células.
3. En un tubo *eppendorf* añadir 50 μL de medio Opti-MEM sin suero.
4. Añadir 1.5 μL del reactivo TansIT-siQUEST y mezclar.
5. Añadir 7 μL de la solución siRNA *stock* 1 μM , mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15-30 minutos, tiempo suficiente para que

se formen los complejos. Los siRNA que hemos utilizado son *Silencer*[®] *Select Pre-designed* de Ambion. Para hCNT1 (SLC28A1 ID:s194990) y RACK1 (GNB2L1 ID: 135615).

6. Añadir la mezcla de reacción a cada pocillo.

8. Técnicas relacionadas con la manipulación del RNA

8.1. Obtención de RNA total

Diferentes alternativas son usadas para la extracción de RNA a partir de cualquier tipo de muestras de partida (cultivos celulares o tejidos). En esta tesis se han utilizado kits comerciales con los que se maximiza el rendimiento y minimiza el tiempo empleado. Pero antes conviene saber de la extrema fragilidad del RNA y la presencia de RNasas endógenas y exógenas en la práctica totalidad de los objetos que entran en contacto con los seres humanos. Por tanto, es necesario tener en cuenta una serie de medidas antes y durante su manipulación con el fin de evitar la contaminación y degradación de la muestra. Se debe trabajar con guantes y utilizar material específico libre de RNasas.

El kit comercial utilizado en esta tesis es el *SV Total RNA Isolation System* (Promega), el cual requiere de cuatro pasos para la satisfactoria purificación del RNA: la disrupción de las células o tejidos, desnaturalización de los complejos de nucleoproteínas, inactivación de la actividad de las ribonucleasas endógenas y la eliminación del DNA y proteínas contaminantes. Cuando se trabaja con líneas celulares, normalmente se parte de placas de 60 ó 100 mm en las cuales después de dos lavados con PBS frío se añade el tampón de lisis. En este primer paso de lisis celular se utilizan las propiedades disruptivas y protectoras del tiocianato de guanidina (GTC) y el β -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en los extractos celulares. El GCT disgrega los complejos nucleoproteicos en asociación con el SDS, de manera que se aísla el RNA libre de proteínas. La dilución de los extractos celulares en presencia de altas concentraciones de GCT causa la selectiva precipitación de proteínas celulares, mientras que el RNA permanece en solución. A continuación el RNA

se precipita con etanol y se purifica mediante una columna de sílice a la que se une rápidamente. Además se aplica DNasa I libre de RNasas sobre la columna para eliminar la posible contaminación con DNA, ya que este podría servir como molde en la reacción en cadena de la polimerasa e inducir falsos positivos. Una vez finalizado el tratamiento con la DNasa I, se realizan una serie de lavados para eliminar las últimas impurezas que pudiera mantener el RNA y finalmente se eluye con agua libre de nucleasas.

8.2. Cuantificación del RNA por espectrofotometría

Los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm, mientras que las proteínas, posibles contaminantes, lo presentan a 280 nm. Mientras que la longitud de onda de 260 nm indica la concentración del RNA, la relación entre las dos longitudes de onda proporciona información de la integridad y calidad de los ácidos nucleicos. La relación óptima DO_{260}/DO_{280} se encuentra entre 1.8 y 2.0. Si esta relación es superior, los ácidos nucleicos podrían estar degradados, mientras que una relación inferior a 1.8 indicaría una presencia excesiva de proteínas en nuestra muestra. También se debe tener en cuenta la relación DO_{260}/DO_{230} , porque aunque menos frecuente, el RNA puede presentar contaminación por azúcares y tiocianato de guanidina.

En esta memoria se ha utilizado para cuantificar ácidos nucleicos el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000*. Este aparato es muy sensible, permitiendo mayor reproducibilidad y sobretodo minimiza el tiempo y la cantidad de muestra. Sólo son necesarios entre 1.5-2 μ L de muestra de RNA para determinar de forma automática la concentración y calidad del RNA.

8.3. Síntesis de cDNA: Retrotranscripción

Una vez aislado el RNA se procede a la síntesis del DNA complementario (cDNA) que servirá como molde en la reacción de PCR. En la

reacción de retrotranscripción se puede utilizar como RNA molde tanto RNA total como RNA mensajero. Se usa mRNA cuando se quiere aumentar la amplificación de RNAs mensajeros poco abundantes, ya que la proporción de éstos con respecto al RNA total es de 1-5%. La retrotranscripción se lleva a cabo con la transcriptasa reversa, una enzima de origen viral. Una de las más usadas es la del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV). Además de la enzima, el RNA molde y los dNTPs, la reacción necesita cierto tipo de *primers*. Esta elección dependerá de la calidad del RNA de partida, del tamaño y la especificidad del DNA que se quiera obtener.

- Oligo(dT)12-18. Es recomendable cuando el RNA es de alta calidad. Se unen a la cola de poli(A) endógena de mRNA para producir cDNA completos (*full-length*).
- Hexanucleótidos aleatorios. Este tipo de *primers* es recomendable cuando se tiene mRNA fragmentado (longitud < 500 bases). Se unen a diferentes lugares del RNA y se generan cDNA cortos. Son ideales para evitar estructuras secundarias en el molde y transcriben de forma más eficaz las regiones 5'.
- Oligonucleótidos específicos. Se unen únicamente al gen de interés y es recomendable cuando se amplifica transcritos poco abundantes.

La síntesis de cDNA se inicia partiendo de 1 µg de RNA total utilizando hexanucleótidos como *primers* en la reacción de la M-MLV. El primer paso es la desnaturalización del RNA a 65°C durante 5 minutos, tras el cual, el RNA se deposita inmediatamente en hielo y se añade una mezcla que contiene el tampón del enzima, DTT 10 mM, dNTPs 500 µM cada uno, 10 µg/mL de *random hexamer* (Promega), 0.75 U/µL de RNasin®, un inhibidor de las RNasas (Promega) y 7.2 U/µL de M-MLVRT (Gibco). La reacción se incuba 2 horas a 37°C y se acaba con la inactivación del enzima durante 10 minutos a 65°C.

8.4. *Real-Time* PCR (PCR a tiempo real)

Esta técnica a diferencia de la PCR convencional donde solamente se puede detectar el producto de amplificación en el punto final de la reacción, permite la detección del producto de PCR a medida que se acumula. De este modo, se puede tomar la fase exponencial de la reacción como punto óptimo para analizar los datos. Por tanto, la PCR a tiempo real proporciona un método más específico, sensible y reproducible para cuantificar el número de copias de un gen determinado en una muestra (cuantificación absoluta) o comparar niveles de expresión entre diferentes muestras (cuantificación relativa).

En nuestro laboratorio el sistema escogido es el sistema *Taqman* de Applied Biosystems, basado en el uso de una sonda fluorogénica. Las sondas *TaqMan* dependen de una actividad 5'-nucleasa de la Taq DNA polimerasa usada en la PCR para hidrolizar un oligonucleótido que se hibrida a la secuencia diana *downstream* de uno de los dos *primers*. La sonda es un oligonucleótido que tiene un marcador fluorescente en la posición 5' (*reporter*) y un reductor de la emisión en su extremo 3' (*quencher*). Mientras la sonda se encuentra intacta, la proximidad entre el *quencher* y el *reporter* es suficiente para que no se emita fluorescencia. Una vez comienza la PCR y la Taq DNA polimerasa empieza a degradar la sonda, el *reporter* se separa del *quencher*, incrementando de esta manera la señal fluorescente del *reporter*. En cada ciclo, se liberan progresivamente más moléculas de *reporter*, produciéndose un aumento de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón producido. Durante los primeros ciclos de la PCR prácticamente no se observan cambios de fluorescencia, hecho que nos define la línea basal (*baseline*). Un incremento de fluorescencia por encima de esta línea indica la detección del producto de PCR acumulado. Se fija un límite (*threshold*) de fluorescencia por encima de la línea basal, de esta manera se denomina C_T (Ciclo límite o *threshold*) al ciclo en que la fluorescencia supera el límite fijado.

Es posible realizar una cuantificación relativa del mensajero diana mediante la comparación de sus C_T . El control endógeno debe mantenerse

invariable en las diferentes condiciones experimentales, razón por la que se utilizan los *housekeeping genes* (18S, GAPDH, RPL01....)

La relación entre el C_T del gen diana y del control endógeno proporciona un valor de C_T normalizado (C_{TN}) de la diana, que sirve para estandarizar la cantidad de cDNA añadido a la reacción. Este valor no presenta ningún tipo de unidad y puede ser utilizado para la comparación relativa de la cantidad de gen diana entre diferentes muestras. Es necesario designar la muestra o muestras que proporciona el valor de 1 de expresión con el fin de poder comparar los resultados. Existen dos alternativas: utilizar una muestra calibrada a la que se refieren todos los resultados, o bien, dar el valor 1 a los controles de cada experimento, que es la que se ha elegido.

Para que el método de cuantificación relativa por C_T tenga validez es necesario realizar un experimento para comprobar que las eficiencias de amplificación de la diana y el control endógeno son aproximadamente iguales. Para ello se tiene que representar la diferencia entre los valores de C_T para la diana y control (ΔC_T) en función del logaritmo de la cantidad de cDNA molde. El valor absoluto de la pendiente de esta representación debe ser <0.1 . En caso negativo se tendría que trabajar con las curvas estándar.

Diseño de *primers* y sonda

Las sondas y *primers* que se han utilizado en esta memoria han sido sintetizados por Applied Biosystems (ABI). Las sondas y *primers* para amplificar los transportadores de nucleósidos fueron diseñados usando el software *Primer Express* de ABI y optimizados en nuestro grupo (Tabla 3). Sin embargo, las sondas y *primers* utilizadas para el estudio de otras proteínas así como para los controles endógenos fueron diseñados y validados por ABI (*Assay on Demand Gene Expresión*), por lo que no se dispone de la secuencia exacta (Tabla 4).

Proteína	primers	Sonda	Quencher
hENT1	Fw: GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA Rv: TTCATTGGTGGGCTGAGAGTT	FAM: CAGGCAAAGAGGAATCTGGAGTTTCAGTCTC	TAMRA
hENT2	Fw: CCCTGGATCTTGACCTGGAG Rv: GGTTTTCTGGCTTCTGGG	FAM: AGGAGCCGGAATCAGAGCCAGATGA	TAMRA
hCNT1	Fw: TGATTTCTTGAAAGCCTGGA Rv: CTGCTCTGATCTCTGCGG	FAM: AAGGCCAGCTCCCTAGGAGTGACTTGAG	TAMRA
hCNT2	Fw: AAGTAGAGCCTGAGGGAAGCAA Rv: GCCCAGTCCATCCCC	FAM: AGGACTGACGCACAAGGACACAGCC	TAMRA
hCNT3	Fw: GAGCTGTGCAAAGCAGGGA Rv: TGGAGAATCCTGCTCAACTGTG	FAM: CACACAAACACCAAACAGGATGAAGAACAGG	TAMRA
rCNT1	Fw: CGACTCCCTCACAGTCACTCAA Rv: CTTCCGCTCTGCTTTGTTGAG	FAM: CCACCTTCACCTCCGGCAGG	TAMRA
rCNT2	Fw: TTGCGGAATCTGCATGTT Rv: CTCCAGTCCACCGCACTGT	FAM: ATCCTCATCTCTTTGCCTGCTCCAAA	TAMRA

Tabla 3. Listado de todas las sondas de *Real-Time PCR* utilizadas en esta tesis, diseñadas por el software *Primer Express* de ABI y optimizadas en nuestro grupo.

Reactivos y materiales

- Aparato ABI PRISM 7500 Sequence Detection System.
- Sondas Taqman y primers (Tabla X).
- Taqman Universal Master Mix.
- ABI PRISM Optical Adhesive Cover Starter Pack.
- ABI PRISM 96-well Optical Reaction Plate.

Procedimiento

Cada reacción ($V_f = 20 \mu\text{L}$) contiene:

- TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (10 μL)
- 2 μL de cDNA
- 7 μL de H_2O
- 1 μL de sonda + primers

Para la amplificación de las diferentes isoformas de los transportadores de nucleósidos se optimizó la concentración de sonda a 200 nM y la de primers a 400 nM. En el caso de las sondas y primers diseñados por ABI (*Assay on Demand Gene Expression*), éstos se encuentran en una solución 20X en condiciones óptimas para su uso. Al igual que la secuencia de estas sondas y primers las concentraciones son desconocidas para el usuario.

Proteína/Gen	Assay ID	Especie	Sonda	Quencher
A1R	Rn00567668_m1	R norvegicus	FAM	NFQ
A2AR	Rn00583935_m1	R norvegicus	FAM	NFQ
A2BR	Rn00567697_m1	R norvegicus	FAM	NFQ
A3	Rn00563680_m1	R norvegicus	FAM	NFQ
rENT1	Rn00581622_m1	R norvegicus	FAM	NFQ
rENT2	Rn00581977_m1	R norvegicus	FAM	NFQ
rCNT3	Rn00590238_m1	R norvegicus	FAM	NFQ
18S	4310893E	H/M/R	VIC	TAMRA
RhoGDI2	Hs00929892_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
PSAP	Hs01551096_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
Rack1	Hs00272002_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
Glut2	Hs01096904_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
GCK	Hs01564555_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
PDK1	Hs01561850_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
PKLR	Hs00176075_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
DLAT	Hs00898876_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
Tigar	Hs00608644_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
MT-cyb	Hs02596867_s1	Homo sapiens	FAM	NFQ
SCO2	Hs04187024_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
PPP2R1B	Hs00988483_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
PPP1CA	Hs00267568_m1	Homo sapiens	FAM	NFQ
RPL01	Hs00705011_s1	Homo sapiens	FAM	NFQ
GUSB	431088E	Homo sapiens	VIC	TAMRA
GAPDH	4310884E	Homo sapiens	VIC	TAMRA
mENT1	Mm00452176_m1	Mus musculus	FAM	NFQ
mENT2	Mm00432817_m1	Mus musculus	FAM	NFQ
mCNT1	Mm01315368_m1	Mus musculus	FAM	NFQ
mCNT2	Mm00445488_m1	Mus musculus	FAM	NFQ
mCNT3	Mm00491586_m1	Mus musculus	FAM	NFQ
Prat	Mm00549091_m1	Mus musculus	FAM	NFQ
Cad	Mm01216319_g1	Mus musculus	FAM	NFQ

Tabla 4. Listado de todas las sondas de *Real-Time PCR* utilizadas en esta tesis, diseñadas y validadas por ABI.

Las condiciones de la *Real-Time PCR*, se muestran en la siguiente figura.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	1	50°C	2 minutos	
2	1	95°C	10 minutos	Desnaturalización
3	40	95°C	15 segundos	Desnaturalización
		60°C	60 segundos	Extensión
4	1	4-10°C	Infinito	Almacenamiento

Figura 5. Condiciones de la *Real-Time PCR*.

8.4.1. Cuantificación relativa de la expresión génica

En los siguientes puntos se detalla cómo calcular los resultados de los experimentos realizados mediante esta técnica:

1. Calcular la C_T media de cada muestra para cada una de las dianas y para el control endógeno.
2. Calcular ΔC_T , resultado de la diferencia C_T (diana)- C_T (control endógeno).
3. Calcular el error estándar (SE) de ΔC_T , que siempre que el número de réplicas de cada muestra sea el mismo se podrá calcular con la fórmula:

$$\sqrt{(SE_{\text{diana}})^2 + (SE_{\text{control}})^2}$$

4. Calcular $\Delta \Delta C_T$, resultado de la diferencia ΔC_T (muestra)- ΔC_T (control). El SE de $\Delta \Delta C_T$ es el mismo que el de ΔC_T , diana.
5. Calcular la expresión de la muestra relativa al control, que es $2^{-\Delta \Delta C_T}$. Nuevamente, el SE es el mismo.

8.4.2. Cuantificación absoluta de la expresión génica

La técnica de *Real-Time* PCR nos permite también obtener el número de copias de mensajero para un determinado gen, lo que nos permite comparar genes entre sí, a diferencia de la técnica anterior que sólo permite comparar el mismo gen en diferentes condiciones experimentales. La reacción de PCR es idéntica a la expuesta para la cuantificación relativa y lo único que varía con respecto a esta es el análisis de los resultados y la necesidad de una recta patrón.

Procedimiento

El elemento esencial es la recta patrón de cada gen que se quiera cuantificar, para ello necesitamos una construcción plasmídica de cada uno de ellos. El plásmido en el que se encuentre insertado el gen no es importante, pero sí lo es su tamaño. En nuestro caso se utilizaron rectas patrón de las construcciones hCNT1-pcDNA3.1 Zeo(+), hCNT2-pcDNA3.1 Zeo(+), hCNT3-pcDNA3.1 Zeo(+), hENT1-pcDNA3.1 Zeo(+), y hENT2-pcDNA3.1 Zeo(+). Se mide la absorbancia a 260 nm y después sabiendo el tamaño de la construcción y usando la relación pares de bases/ng se puede calcular el número de copias de plásmido/ μ L. El siguiente paso consiste en diluir los plásmidos para hacer la curva (10^7 ; 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 y 1 copias de plásmido), la *Real-Time* PCR se carga con 2 μ L de las diferentes diluciones del plásmido. La recta patrón se obtiene de la representación gráfica del logaritmo de copias de plásmido frente a las C_T . En paralelo se realiza la *Real-Time* PCR de las muestras de interés y el valor de C_T obtenido para las diferentes muestras lo extrapolamos en la recta patrón para obtener el logaritmo del número de copias del mensajero del gen diana. Finalmente, la normalización de este valor por el volumen de muestra utilizado en la reacción y los μ g de RNA utilizados por muestra nos darán el valor de copias de mensajero del gen diana/ μ g de RNA.

9. Técnicas relacionadas con la manipulación del DNA

9.1. Aislamiento de DNA plasmídico

La transformación de bacterias permite el mantenimiento y amplificación de los plásmidos. Se selecciona una colonia transformada y se procede a su cultivo en medio líquido con el antibiótico adecuado. Según la cantidad de bacterias de partida y la consiguiente cantidad de plásmido obtenida los métodos se conocen como mini, midi o maxiprep. Rutinariamente se han utilizado los kits de Wizard® Plus SV minipreps DNA Purification System

(Promega) para miniprep y de Nucleobond® (Cultek) para midiprep. Se trata en ambos casos de un protocolo de purificación por columna de intercambio iónico y nos hemos limitado a seguir el procedimiento detallado en el kit.

Las minipreps, más rápidas, se han utilizado para la comprobación rápida de una correcta transformación, mientras que se ha recurrido a las midipreps, que permiten obtener más cantidad de DNA de mayor calidad, para su uso en transfecciones de células de mamífero o para la obtención de nuevas construcciones recombinantes. Con el objetivo de no tener que transformar bacterias cada vez que se desee disponer de un plásmido, es recomendable congelar bacterias transformadas con éste. Para obtener estos *stocks* de plásmidos se recomienda inocular 3 mL de LB con 50 µL de un cultivo O/N y dejarlo en agitación a 37°C 3-4 horas. Transcurrido este tiempo, cuando se aprecia una cierta turbidez en el cultivo, se añade un 20% de glicerol y se congela en alícuotas directamente en N2 líquido para ser posteriormente conservadas a -80°C.

9.2. Análisis de DNA en geles de agarosa

El análisis, identificación y separación de fragmentos de DNA se realiza mediante la electroforesis en geles de agarosa. El porcentaje de agarosa de los geles depende del tamaño de los fragmentos de DNA que se quieren separar o identificar. En este trabajo las concentraciones utilizadas han ido entre 0.5 y 2%. Para preparar los geles de agarosa se puede utilizar dependiendo del objetivo final de la electroforesis TBE1X (TBE10X: Tris 1 M, ácido bórico 0.9 M, y EDTA 10 mM), gel rutinario de comprobación de PCR o digestión enzimática, o TAE1X (TAE10X: Tris-acetato 400 mM y EDTA 10 mM pH 8.2-8.5), para purificar banda o separación de fragmentos > 12 Kb.

La detección del DNA se realiza mediante la tinción con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) y la visualización bajo una lámpara de luz UV. La estimación de la medida de los fragmentos de DNA analizados se hace por

comparación con un marcador de tamaño que se corre en paralelo con las muestras.

9.3. Reacción de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias definidas de DNA desarrollada por Kary Mullis a mediados de los ochenta. La región que se quiere amplificar se delimita con dos oligonucleótidos sintéticos (*primers*) cuya secuencia es complementaria al inicio y final de la región deseada (diana). Así mediante PCR se obtienen dos copias idénticas por cada molécula en cada ciclo de reacción (desnaturalización-hibridación-extensión), que a su vez pueden ser usadas como molde, generándose de esta manera una gran cantidad de DNA diana amplificado en 20-40 ciclos. La capacidad de amplificación de la PCR es muy elevada de manera que pequeñas trazas de DNA contaminante pueden ser utilizadas como molde generando falsos positivos. Con tal de evitar este tipo de contaminaciones se deben adoptar una serie de medidas: trabajar siempre con tubos indicados para PCR, libres de DNAsas y RNAsas, puntas de micropipeta con filtro y guantes. Mantener todo el material que se utiliza para PCR dentro de la cabina de flujo donde se monte la reacción o en su defecto esterilizar con luz ultravioleta el material plástico y pipetas que se utilicen en PCR. Además para asegurar que no hay ninguna contaminación es importante incluir en todas las reacciones un control negativo de amplificación.

La polimerasa utilizada debe ser de alta fidelidad para evitar la aparición de mutaciones. En las reacciones realizadas durante esta tesis se ha utilizado el Faststart High Fidelity PCR System de Roche según las indicaciones del fabricante.

Los componentes de las reacciones han sido los siguientes:

- Tampón 10X con MgCl₂ (5 µL)

- *Primer Forward* 20 μM (1 μL)
- *Primer Reverse* 20 μM (1 μL)
- dNTPs 10 mM (1 μL)
- DNA variable (20-200 ng)
- H₂O hasta los 50 μL de volumen final

El programa utilizado en todos los casos fue el siguiente:

- desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - unión: 30 segundos a 55-60°C
 - extensión: 1 minuto/1Kb inserto a 72°C
- } x 35 ciclos
- última etapa de extensión de 7 minutos a 72°C para finalizar las cadenas que hayan podido quedar sólo parcialmente sintetizadas.

9.4. Digestión de los fragmentos de DNA con endonucleasas

La digestión enzimática del DNA permite la escisión de los fragmentos de DNA necesarios para la generación de las construcciones recombinantes dando lugar a extremos de secuencia específica que facilitan la ligación posterior y la comprobación de construcciones plasmídicas (clonación). En el tubo de reacción sólo es necesario: enzima de restricción (Roche o New England), el tampón de reacción 10X, DNA y agua.

Para llevar a cabo las digestiones con enzimas de restricción se deben tener ciertas consideraciones:

- Minimizar el volumen total de la reacción, para favorecer la reacción enzimática.
- El tampón depende del enzima a utilizar, por lo que el fabricante suministra, junto con el enzima, el tampón con el cuál la actividad es óptima. En los casos en que se deba realizar una doble digestión, idealmente se debe buscar un tampón para el cuál la actividad del par de enzimas sea máxima. En caso de incompatibilidad se deberán realizar

digestiones secuenciales con una etapa intermedia de purificación que elimine las sales y el enzima de la primera digestión. A veces es posible inactivar una de las enzimas por tratamiento térmico (15 minutos a 65°C).

- La cantidad de DNA depende del objetivo, siendo en general suficiente con 200-300 ng para una digestión de comprobación (aunque depende también del tamaño de la banda esperada). Cuando con la digestión se pretende obtener DNA para ser posteriormente ligado a otro fragmento se trabaja con cantidades que suelen oscilar entre los 5-10 µg.
- En función de la cantidad de DNA a digerir la cantidad de enzima que debe utilizarse es distinta, y se debe tener en cuenta la definición de Unidad Internacional (UI) de las enzimas de restricción. UI se define como la cantidad de enzima necesario para digerir 1 µg de DNA en 1 hora.
- El volumen que se añade de enzima de restricción no debe superar el 10% del volumen de reacción, la cantidad de glicerol (proveniente del stock comercial de enzima) es excesiva y puede dificultar la reacción.
- La temperatura de incubación óptima es de 37°C, excepto para aquellos enzimas en los que se indique lo contrario. El tiempo de incubación es de al menos 1 hora, pero se puede dejar 2-3 horas o incluso durante toda la noche (16 horas) cuando la cantidad de DNA a digerir sea grande. Sin embargo, no conviene realizar incubaciones más allá de 3 horas porque se favorece, en algunos enzimas, "*star activity*" que implica la digestión inespecífica del DNA, es decir la enzima empieza a cortar aleatoriamente.

9.5. Purificación del DNA

Tras la reacción de PCR o la digestión enzimática puede ser necesaria la purificación del DNA. A lo largo de la generación de las construcciones de esta memoria se han utilizado dos métodos diferentes, según el objetivo perseguido.

9.5.1. Purificación de banda de agarosa

Este es el método elegido en aquellos casos en que la muestra contenga varios fragmentos de DNA mezclados con el de interés, pues consiste en la visualización de los fragmentos en un gel de agarosa, lo que permite la recuperación de la porción de gel donde se encuentre el DNA de interés.

Hacer un gel de agarosa del menor % posible, del 1 ó 2, en función del tamaño de la banda en TAE 1X, realizar la electroforesis a un voltaje máximo de 100 V que permita una correcta separación y visualizar al ultravioleta. Se prefiere el tampón TAE al TBE porque la tasa de recuperación es más alta. Recortar la banda deseada con ayuda de una cuchilla y proceder a su purificación en la columna de sílice según las instrucciones del kit comercial para la purificación de bandas de agarosa "Qiaquick Gel Extraction Kit" (Qiagen), sólo se puede utilizar este kit para fragmentos de DNA <10 Kb.

9.5.2. Purificación de DNA por precipitación

En aquellos casos en que se disponga de un único fragmento de DNA en la muestra se puede purificar por este método, que suele proporcionar mayor rendimiento que el anterior. Por este motivo, éste suele ser el método de elección para la purificación de plásmidos linealizados por digestión enzimática previa a la ligación. La purificación utiliza en primer lugar el fenol para eliminar las proteínas presentes en la muestra, mientras que el uso posterior del etanol pretende la eliminación de las sales.

1. Los microgramos de vector que se hayan digerido se llevan a un volumen final de 100 µL con agua.
2. Se añade un volumen de fenol/cloroformo/ácido isoamílico 25:24:1 y se agita vigorosamente durante 10 segundos.
3. Centrifugamos al máximo de rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente.

4. Se recoge la fase acuosa (superior) en un tubo nuevo, donde se añadirá 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M a pH 5.2.
5. Añadir de 2-2.5 volúmenes de etanol 100% frío, se mezcla suavemente y se deja 1 hora a -80°C.
6. Se centrifuga al máximo durante 5 minutos, y aspiramos el sobrenadante.
7. Lavamos con 1 mL de etanol al 70%, volvemos a centrifugar y aspirar el sobrenadante.
8. Dejamos secar el pellet y lo resuspendemos con unos 50 µL de agua y cuantificamos.

9.6. Ligación de fragmentos de DNA

Se lleva a cabo con la enzima DNA ligasa, la cuál cataliza la formación del puente diéster entre un grupo 5'-fosfato y un 3'-hidroxil. Esto permite la unión de dos fragmentos de DNA, ya sea con extremos cohesivos o romos, obtenidos por digestión enzimática.

Se recomienda probar en la reacción diferentes relaciones molares vector: inserto (1:0, 1:1 y 1:3), en función de si los extremos son romos o cohesivos. El cálculo que permite determinar la cantidad de DNA de la reacción es el siguiente:

$$\frac{ng\ vector \cdot kb\ inserto}{kb\ vector} \times relación\ molar\ \frac{inserto}{vector} = ng\ inserto$$

Se aconseja minimizar el volumen de reacción, por lo que es interesante que los DNA de partida estén suficientemente concentrados. En la elaboración de la presente memoria las ligaciones se han realizado partiendo de 50-100 ng de vector ajustando el volumen de reacción a 10 µL.

La mezcla de reacción contiene:

- 50-100 ng de vector
- X μ L de inserto de DNA
- 1 μ L de T4 DNA ligasa (Promega)
- 1 μ L de tampón de ligación 10X (Promega)
- El resto de agua

Se incuba toda la noche a 16°C en el termociclador y una vez transcurrida la reacción de ligación con la enzima se procede a la transformación de todo el producto de ligación en bacterias según el procedimiento detallado en el apartado 11.2.

9.7. Secuenciación

Se ha utilizado el método de secuenciación automática, basada en el método descrito por Sanger (Sanger F *et al.*, 1977). Consiste en el uso de dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos que no contienen el 3'-OH y provocan la parada de la elongación de la cadena en la reacción de PCR. De esta manera se generan fragmentos de diferentes longitudes de DNA, según el momento de entrada del dideoxinucleótido marcado. La mezcla de billones de fragmentos resultantes se separa por tamaño mediante electroforesis capilar y al alcanzar la base del capilar un láser excita el dideoxinucleótido marcado provocando la emisión de fluorescencia. El hecho de que los 4 dideoxinucleótidos (A, G, C, T) estén marcados con diferente color permite la obtención del electroferograma.

Reactivos y material

- ABIPRISM Big Dye Terminador Cycle Sequencing Ready kit version 3.1 (Applied Biosystems)

- Termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- Oligonucleótidos específicos (Sigma-aldrich)
- Etanol al 95% y 70%
- EDTA 125mM

La mezcla de reacción contiene:

- 100 ng de DNA por cada Kb del vector+inserto
- 1 μ L ready reaction mix
- 3 μ L BigDye sequencing buffer
- hasta 20 μ L de agua.

Se realiza una reacción de PCR de 96°C 10 segundos, 50°C 5 segundos, 60°C 4 minutos y se repite 25 ciclos.

Las muestras preparadas de esta forma se han secuenciado en el Servicio de Secuenciación de los Servicios Científicotécnicos de la Universidad de Barcelona.

10. Técnicas relacionadas con la manipulación de bacterias

10.1. Preparación de células competentes

La transformación de bacterias con DNA plasmídico consiste en introducir fragmentos de DNA en la bacteria donde se replicarán, aumentando así el número de copias con la intención de conseguir posteriormente su aislamiento y purificación. La transformación es un fenómeno que ocurre de forma natural en muchas bacterias, pero la eficacia del proceso varía enormemente de unas especies a otras. Para que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado *estado de competencia*, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas. En este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten la entrada de

ácidos nucleicos en la célula. Todo el proceso, material y reactivos se encuentran en todo momento bajo condiciones de esterilidad. En este trabajo se ha utilizado la cepa bacteriana *DH5α* de *E.coli* para amplificar los plásmidos generados.

1. Se crece en una placa de agar un rascado del stock de bacterias congelado con glicerol a -80°C , durante toda la noche a 37°C .
2. Se pica una colonia única y se crece en 3 ml de medio líquido (Luria-Broth (LB): triptona al 1% (p/v), extracto de levadura al 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v) y NaOH 2 mM, comprobado el pH a 7.0, autoclavado) en tubos de polipropileno. Además es conveniente utilizar un tubo más en el que solamente se añade medio, como control negativo para detectar una posible contaminación. Se dejan agitando a 37°C durante toda la noche.
3. Al día siguiente se inocula 2 mL de este crecimiento en 100 mL de LB en un matraz erlenmeyer estéril de 500 ml y se mantiene en agitación a 37°C midiendo la absorbancia a 550 nm cada 15 ó 30 minutos manteniendo siempre las condiciones de esterilidad. Cuando la densidad óptica alcanza valores entre 0.375-0.4 es el momento en el que el cultivo está en crecimiento exponencial y óptimo para hacer células competentes. Si la densidad óptica supera el valor de 0.4, las células dejan de ser aptas para hacerlas competentes. A partir de este punto todo se hará en hielo.
4. Las bacterias se centrifugan a 2500 rpm a 4°C durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende suavemente el sedimento de células con 30 mL de TfbI (30 mM KOAC, 50 mM MnCl_2 , 100 mM RbCl, 10 mM CaCl_2 a pH 5.8 y 15% de glicerol) y se deja reposar 5 minutos en hielo.
5. Se vuelve a centrifugar, se resuspende con 4 mL de TfbII (10 mM Mops a pH 7.0, 75 mM CaCl_2 , 10 mM de RbCl y 15% glicerol), se alicuotan en 50-100 μL y se guardan en el -80°C hasta el momento de ser utilizadas.

10.2. Transformación por choque térmico

Durante todo este proceso es necesario trabajar bajo la llama.

1. Poner en un tubo estéril 50 μL de la suspensión de las células competentes que se han descongelado en hielo, junto con el DNA a transformar (100-200 ng) y se incuba en hielo durante 20 minutos.
2. En este punto se realiza el choque térmico, que consiste en poner los tubos a 42°C durante 1 minuto, y rápidamente se vuelven a poner en hielo durante 4 minutos más.
3. Se añaden 300 μL de LB y se incuba durante 1 hora a 37°C en agitación.
4. Transcurrido el tiempo de incubación, se plaquea el líquido en una placa de LB con el antibiótico de selección adecuado para cada plásmido.

10.3. Transformación por electroporación

Este protocolo se ha utilizado para la doble recombinación en la generación de los adenovirus y se describe **detalladamente en el apartado 11.1.2.** de la doble transformación del vector lanzadera y el genoma adenoviral.

11. Técnicas relacionadas con la manipulación de adenovirus

11.1. Generación de adenovirus

En esta tesis se ha generado un vector adenoviral derivado de un adenovirus humano del serotipo 5 (Ad5). El adenovirus es defectivo, es decir, presenta una replicación defectuosa debido a la delección de los genes E1 y E3. El gen E1 es esencial para el ensamblaje de partículas virales infecciosas y el gen E3 codifica proteínas implicadas en la evasión de la inmunidad del huésped y es prescindible. En el vector defectivo se ha substituido la región E1A del Ad5

por el *cassette* de expresión que contiene el DNA de hCNT2 bajo el control del promotor fuerte del citomegalovirus (CMV).

El método utilizado para la generación del adenovirus se basa en el fenómeno de la recombinación homóloga que se produce entre el genoma entero del adenovirus (pAdEasy-1) y un fragmento de DNA lineal que contiene el gen de interés flanqueado por las zonas de homología. Esta recombinación tiene lugar gracias a los brazos de homología que comparten estos dos elementos y se produce después de su cotransformación en la cepa electrocompetente *recA* positiva de *E. coli* BJ5183-AD-1 (Agilent Technologies).

11.1.1. Clonación del gen de interés en un vector lanzadera

El fragmento de cDNA que se quería clonar se ha obtenido mediante la amplificación por PCR del fragmento de interés con unos *primers* que contienen la diana de las enzimas de restricción (HindIII y EcoRV) para su ligación en el vector lanzadera. El vector lanzadera utilizado ha sido el pShuttleCMV.

Los oligos diseñados para la generación de Ad-hCNT2 han sido:

HindIII:

5'-CCCAAGCTTGGGATGGAGAAAGCAAGTG-3'

EcoRV:

5'-GTCCGGATATCTTATTAGGCACAGACGGTATTG-3'

Una vez amplificado el fragmento deseado por PCR, se corre un gel y se purifica la banda que contiene nuestro cDNA para proceder a su ligación con el vector lanzadera (**detallado en el apartado 9.5 y 9.6.**).

11.1.2. Doble transformación del vector lanzadera y el genoma adenoviral

En primer lugar debe digerirse la construcción pShuttleCMV-hCNT2 con la enzima PmeI para linealizarla y facilitar el proceso de recombinación.

Procedimiento

1. Descongelar las células electrocompetentes BJ5183-AD-1, en hielo. Una vez descongeladas agitar suavemente, y pipetear 20 μ L en cada tubo y mantener hielo.
2. Añadir a cada tubo con las células entre 0.05-0.1 μ g del vector lanzadera con nuestro cDNA linealizado.
3. Traspasar esta mezcla a una cubeta de electroporación (0.2 cm de diámetro; BIO-RAD), previamente enfriada en hielo.
4. Antes de colocar la cubeta en el electroporador (BTX), comprobar que no hay ninguna burbuja de aire dentro de la cubeta. Es entonces cuando se aplica una descarga eléctrica corta de voltaje alto (Capacitancia 0, resistencia 13 Ohm y voltaje 2.5 kV).
5. Inmediatamente se añade 1 mL de LB a 37°C, se traspasa a un tubo de 15 mL y se incuba 1 hora a 37°C en agitación.
6. Por último se plaquean 100, 300 y 600 μ L en placas de LB-agar con el antibiótico de selección necesario (en este caso kanamicina) y se incuba toda la noche en la estufa a 37°C.

A continuación se hacen minipreparaciones (Wizard® Plus SV minipreps DNA Purification System, Promega) del cDNA plásmidico a partir de las colonias obtenidas y se comprueban por digestión (Pac I) los elementos introducidos al genoma del adenovirus. Después de seleccionar los clones positivos, éstos se amplifican para hacer midipreps y se vuelven a digerir (Pac I) para linealizarlos y eliminar la zona que contiene el gen de resistencia para proceder a la transfección con CaCl₂ en las células Hek293 (**detallado en el apartado 7.1.**).

A partir de este punto, las células transfectadas se dejan en la placa y aproximadamente una semana más tarde, cuando se observa un efecto citopático general en toda la placa (células redondeadas y refringentes) se recogen y se someten a tres ciclos de congelación-descongelación (-80°C/37°C,

respectivamente) para lisar las células y liberar las partículas virales. Después se centrifuga durante 5 minutos a 250 rpm, se recoge el sobrenadante, que será el primer *stock* viral y se guarda a -80°C. Este primer *stock* constituye el lisado inicial a partir del cual se procede para las rondas de amplificación sucesivas.

11.2. Amplificación de los adenovirus

En condiciones normales de propagación, el sobrenadante puede infectar 5 placas del mismo tamaño del cual proviene y el lisado celular puede infectar 20.

Para cada amplificación de los adenovirus se utilizan 20 placas de 15 cm de diámetro de células 911. Cuando las células están a una confluencia del 80% se infectan y después de 48 horas, el efecto citopático se hace evidente en el 95-100% de las células, de las cuales un 20% se encuentran desenganchadas. En este punto se recoge el sobrenadante y las células de todas las placas, centrifugándose en tubos de 50 mL durante 5 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se guarda a -80°C para posteriores infecciones. Los sedimentos de células se pueden guardar congelados hasta el momento de la purificación. Los virus que no se purifiquen se resuspenden con PBS⁺⁺- 10% glicerol (PBS con 10 mg de CaCl₂·2H₂O y 10 mg de MgCl₂·6H₂O) siguiendo la relación 1 mL por cada 10 placas, se alicuota y se guardan a -80°C hasta el momento de su uso, previa cuantificación por partículas infectivas.

11.3. Titulación de los stocks virales

Este tipo de titulación se basa en la detección de la proteína del hexon, permitiendo también la titulación de virus no purificados.

1. Se prepara un árbol de diluciones del virus utilizando DMEM con 5% de FBS.
2. Se transfiere por triplicado, 100 µL de cada dilución a una placa de 96 pocillos.

3. Se añade a cada pocillo una suspensión de células Hek293, 50.000 células por cada 100 μL de medio.
4. Después de 24-36 horas de incubación a 37°C se aspira el medio, se dejan secar las células durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se fijan 10 minutos a -20°C con 50 μL de metanol frío.
5. A continuación, se hacen tres lavados con PBS⁺⁺ + 1% BSA.
6. Se incuban con 50 μL del anticuerpo primario (α -hexon, cedido por el laboratorio del Dr. Ramon Alemany) 1-2 horas a 37°C (dilución 1/5 en PBS⁺⁺ + 1% BSA).
7. Se lavan dos veces más con PBS⁺⁺ + 1% BSA.
8. Se incuba 1 hora a 37°C protegido de la luz, con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488 (dilución 1/300 en PBS⁺⁺ + 1% BSA).
9. Por último se hacen 3 lavados más con en PBS⁺⁺ + 1% BSA, y se procede al conteo de células positivas por pocillo en el microscopio de fluorescencia.

El título viral, número de unidades de transducción/mL, se calcula con la fórmula siguiente:

$$\text{UT/mL} = (\text{media} \times \text{f. dil.} \times 1000 \mu\text{L}) / 100 \mu\text{L}$$

media: de los contajes de células

f. dil.: factor de dilución

1000 μL : para referirlas a 1 mL

100 μL : volumen de virus para cada pocillo

11.4. Transducción de células en monocapa con adenovirus

La transducción con adenovirus consiste en la introducción del material genético del virus modificado en el interior de la célula diana. Este proceso se lleva a cabo poniendo en contacto el medio que contiene el virus con las células que se desean transducir.

En este trabajo se han realizado transducciones sobre células adherentes a partir del extracto crudo no purificado. Para transducir células adherentes con adenovirus, se descongela el virus en hielo y se prepara el banco de diluciones necesarias para conseguir las dosis deseadas para infectar las células. Acto seguido, se aspira el medio de las células sembradas entre 12-24 horas antes y se añade el medio sin suero con el virus. Después de 4 horas de incubación a 37°C, se aspira y se añade medio fresco suplementado con suero.

12. Wound-healing

Este tipo de experimento se realiza para estudiar la migración celular. Consiste en hacer una herida en la monocapa de células y mediante microscopia confocal y *softwares* especializados, se calcula la velocidad a la que se mueven las células.

Procedimiento

1. Sembrar las células en placas de 6 pocillos, a una densidad elevada.
2. Al día siguiente, se hace una herida a la monocapa de células con una punta amarilla de micropipeta.
3. Se lava dos veces con medio, para eliminar las células que se han desenganchado y/o dañadas. Se dejan durante toda la noche con medio fresco a 37°C y 5% de CO₂.

Se tomaron imágenes de contraste de fase cada 15 minutos utilizando un microscopio Leica TS SP5, con lentes de un aumento 10X (Leica Microsystems). Las imágenes fueron analizadas utilizando el *software* de ImageJ (NIH).

Resultados y Discusión



1. Validar la interacción de hCNT1 con sus posibles proteínas *partner*

Como se ha descrito anteriormente, las proteínas CNT (*Concentrative Nucleoside Transporter*) tienen un papel importante en la fisiología celular debido a su función como captadores de nucleósidos naturales. Sin embargo, hallazgos recientes en distintos miembros de la familia SLC (*Solute Carrier*) han puesto de manifiesto la implicación de algunas de estas proteínas en funciones cruciales de la fisiología celular que van más allá de su papel como meros mediadores de la bioasequibilidad de sus sustratos, albergando funciones de receptor, actuando así como de transceptor. Mientras que a hCNT1 se le atribuye un papel en la modulación del crecimiento tumoral (Pérez-Torras S *et al.*, 2013), hCNT2 podría participar como regulador del metabolismo energético celular (Aymerich I *et al.*, 2006; Huber-Ruano I *et al.*, 2010).

Los CNTs en sistemas eucariotas presentan un gran dominio N-terminal citosólico siendo de 83, 80 y 101 aminoácidos para hCNT1, hCNT2 y hCNT3, respectivamente. En cambio, sus ortólogos en sistemas procariotas carecen de este dominio intracelular, así como de los tres primeros dominios transmembrana, lo que nos permite anticipar que gran parte de la proteína no sería necesaria ni para el reconocimiento ni para la translocación de sus sustratos. De hecho, la delección de los primeros 174 aminoácidos no causa pérdida de funcionalidad para el transportador CNT1 (Hamilton SR *et al.*, 2001).

Para estudiar como se regulan y como funcionan estas proteínas dentro de la célula, se llevó a cabo en nuestro laboratorio un *screening* por doble híbrido contra librerías de cDNA de riñón e hígado, usando los 83 aminoácidos del N-terminal de hCNT1. De todos los posibles *partners* que se obtuvieron mediante el análisis de secuencia, sólo 5 se volvieron a confirmar por la técnica de doble híbrido dirigido en bacterias. Entre ellos, RACK1, prosaposina y RhoGDI2 nos parecieron buenos candidatos (estos resultados se obtuvieron en el marco de la tesis del Dr. Pedro Cano Soldado).

RACK1 (*receptor for activated C-kinase 1*) es una proteína de anclaje o *scaffold* (McCahill A *et al.*, 2002) que fue descrita como proteína que interacciona

con PKC, actuando como un receptor intracelular para anclar la forma activada al citoesqueleto (Sondek J y Siderovski DP, 2001). Además, RACK1 también promueve la migración celular en diferentes tipos celulares (Buensuceso CS *et al.*, 2001; Kiely PA *et al.*, 2006).

La prosaposina (PSAP) se puede encontrar como una proteína integral de membrana o en diversos fluidos (Kishimoto Y *et al.*, 1992). Además, es el precursor de las saposinas A, B, C y D, pequeñas glicoproteínas que se obtienen cuando la proteína se dirige al lisosoma, donde es procesada. PSAP se ha encontrado involucrada en la invasividad y progresión metastática en cáncer de próstata, mama y páncreas (Hu S *et al.*, 2010; Campana WM *et al.*, 1999; Gronborg M *et al.*, 2006).

RhoGDI2 es una proteína citosólica que participa en la regulación del ciclo GTP/GDP y asociación/disociación de la membrana de las proteínas Rho/Rac. Mientras que, estudios recientes demuestran que esta proteína está implicada tanto en funciones de migración celular como de supresión tumoral (Stevens EV *et al.*, 2011), otros sugieren que puede ser utilizada como un marcador de metástasis en cáncer de mama y vejiga (Theodorescu D *et al.*, 2004; Hu LD *et al.*, 2007).

Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que hCNT1 tiene un papel en la migración celular. Así, la sobreexpresión de hCNT1 mediante un vector adenoviral, en células de adenocarcinoma pancreático, provoca una disminución significativa en el desplazamiento de las células. Cabe destacar, que este mismo efecto se observa cuando se sobreexpresa la variante polimórfica hCNT1SP (que carece de actividad de transporte), pero no se observa con el adenovirus control ni con el adenovirus que sobreexpresa el transportador equilibrativo de nucleósidos 1 (hENT1) (Pérez-Torras S *et al.*, 2013) (figura 1).

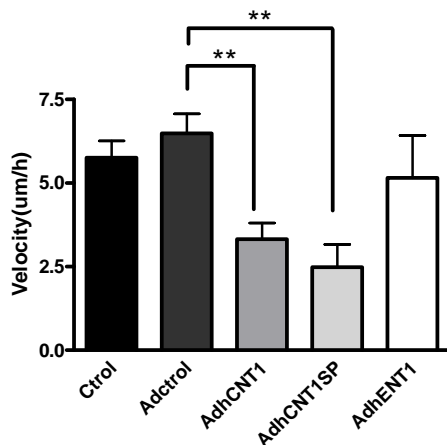


Figura 1. La sobreexpresión de hCNT1 o de la variante polimórfica sin actividad de transporte hCNT1SP disminuye la migración celular. Figura extraída del estudio realizado por Pérez-Torras S *et al.*, 2013.

El hecho de que a estas dos proteínas, RACK1 y RhoGDI2, también se les haya implicado en procesos de migración, es lo que nos motivó a plantearnos los siguientes objetivos: validar la interacción hCNT1 con RhoGDI2 y RACK1. Así como el estudio de la expresión de hCNT1 y de sus posibles proteínas *partner* en muestras de cáncer de colon (CRC).

1.1. Validación de las interacciones de hCNT1 con RhoGDI2 y RACK1

1.1.1. Análisis de la expresión de la proteína RhoGDI2 en diferentes líneas celulares

RhoGDI2 (*Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor 2*) también conocida como LyGDI o D4GDI, es una proteína reguladora de la familia de proteínas Rho GTPasas. Estas proteínas incluyendo RhoA, Rac1 y Cdc42, participan en una amplia red de señalización celular, regulando una gran variedad de procesos biológicos como son: la expresión génica, ciclo celular, diferenciación, migración, apoptosis y tráfico vesicular. Por ello sorprende que a estas proteínas se les haya atribuido un papel relevante en muchos pasos del desarrollo del cáncer, como: la iniciación, progresión, supervivencia, evasión de la apoptosis, angiogénesis, invasión tisular e incluso metástasis (Lazer G *et al.*, 2011). Es por todo esto que las Rho GTPasas y sus reguladores, como la RhoGDI2 son dianas atractivas para la terapia del cáncer.

RhoGDI2 se expresa diferencialmente en muchos cánceres humanos tanto a nivel de mRNA como de proteína en función del tipo de tumor. En cáncer de ovario su expresión está aumentada correlacionando con el estadio, al igual que en cáncer de mama donde se ha relacionado con metástasis, mientras que, en próstata disminuye su expresión y se ha relacionado con metástasis (Cho HJ *et al*; 2010; Harding MA *et al*; 2010).

Debido a la gran variabilidad que existe en la expresión de RhoGDI2 en los diferentes tipos de cáncer, con el objetivo de encontrar un buen modelo para validar la interacción entre hCNT1 y RhoGDI2 analizamos la expresión por western blot de esta proteína en varias líneas celulares derivadas de distintos tipos tumorales (figura 2). BCLC-4, BCLC-5, BCLC-6, BCLC-9, HepG2 (líneas celulares derivadas de tumores de hígado), Panc-1, NP-9, NP-29, CP15T, CP15A (páncreas), MDA-MB-468, MDA-MB-231 (mama), HT29 (colon), Jurkat (sistema inmunitario)) y EGI-1 (conducto biliar).

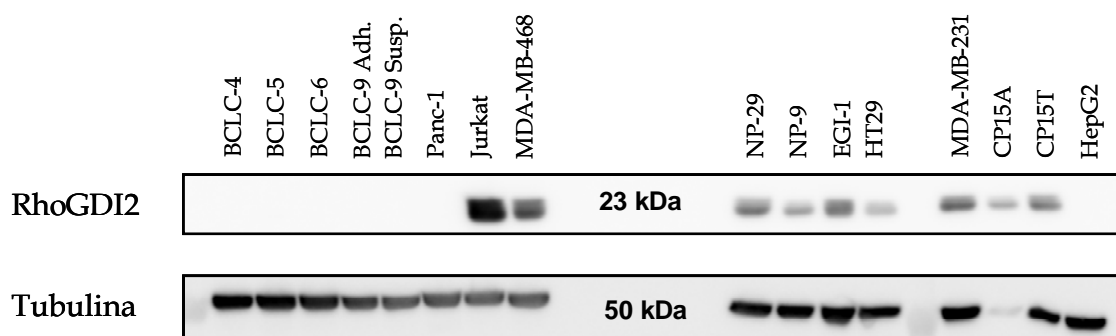


Figura 2. Análisis de la expresión de la proteína RhoGDI2 en diferentes líneas celulares. Western blot anti-RhoGDI2. Se cargaron 25 µg de proteína por pocillo y utilizamos tubulina como control de carga.

Como se muestra en la figura 2 no se pudo detectar la expresión de la proteína RhoGDI2 en ninguna de las líneas celulares de origen hepático, y tampoco en Panc-1, de origen pancreático, pero en cambio para el resto de líneas celulares sí observamos expresión, aunque variable.

Lamentablemente en ninguna de estas líneas pudimos detectar actividad de transporte de hCNT1, ni la expresión de la proteína de forma fiable, ya que

en ese momento no disponíamos de buenos anticuerpos contra la isoforma CNT1 humana. Aunque en principio no sería imprescindible que la línea celular tuviera actividad de transporte para interactuar con RhoGDI2, el hecho de no poder detectarlo a nivel proteico nos llevó a generar una línea celular que expresara hCNT1 de manera estable.

Generación del estable Hek293-hCNT1

Se escogió la línea Hek293 para restituir la función de hCNT1 mediante el sistema Flp-In™.

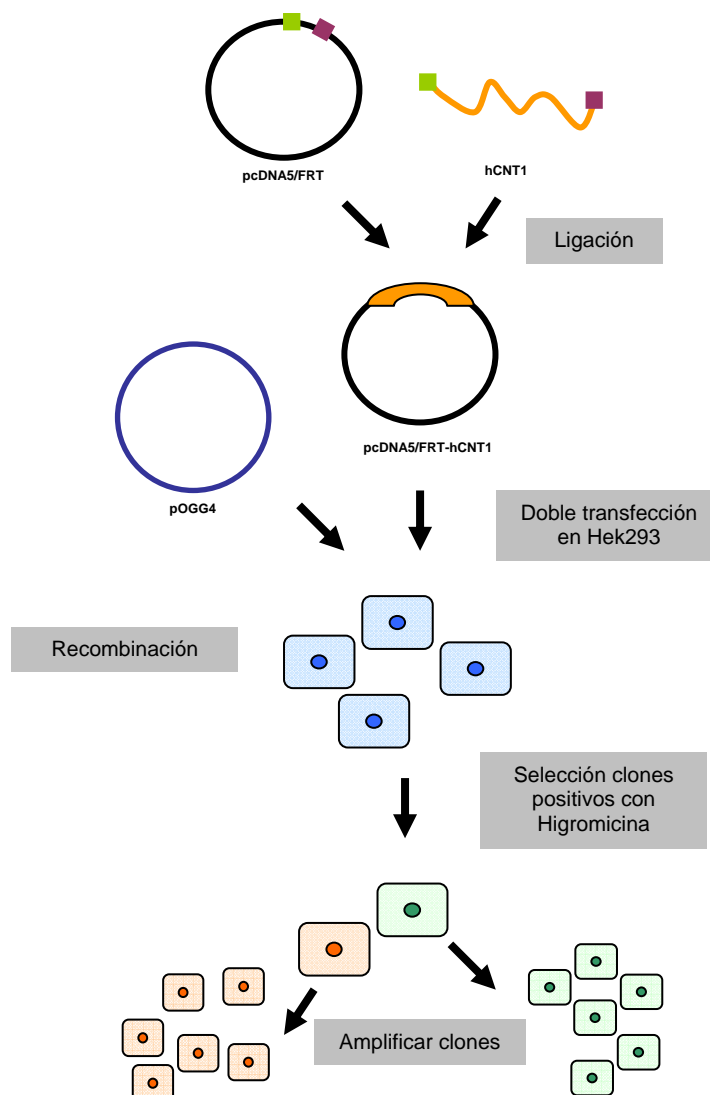


Figura 3. Generación de la línea celular estable Hek293 para hCNT1. Esquema del proceso de obtención de los diferentes clones hCNT1-Hek293.

El procedimiento que se siguió para la generación de la línea celular se encuentra detallado en el apartado de materiales y métodos de generación de líneas celulares estables (1.3). En la figura 3 se muestra a modo de esquema los pasos seguidos.

Caracterización de los diferentes clones Hek293-hCNT1

En la generación de la línea se obtuvo un gran número de clones después de la transfección y selección positiva con el antibiótico de selección, higromicina. De todos ellos, decidimos mirar los niveles de mensajero de hCNT1 por *Real Time* PCR en seis, siendo las células Hek293 transfectadas establemente con el vector vacío pcDNA5 nuestro control de referencia.

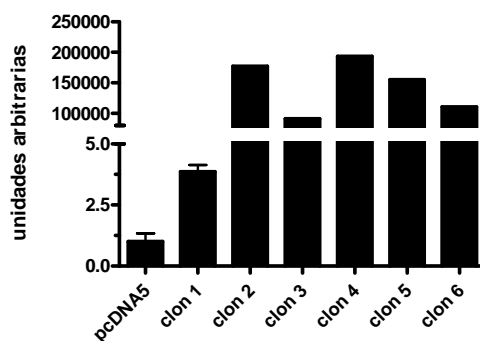


Figura 4. Determinación de los niveles de mRNA de hCNT1 en los diferentes clones seleccionados. Los valores de C_T obtenidos han sido normalizados respecto al control endógeno (GAPDH) y relativizado a los niveles de expresión en las células Hek293 establemente transfectadas con pcDNA5.

La expresión de hCNT1 fue positiva en todos los clones, presentando en la mayoría de los casos un aumento de más de 90.000 veces respecto las células transfectadas establemente con pcDNA5 (figura 4). Una vez determinado el nivel de expresión de hCNT1 en los clones positivos preseleccionados, escogimos tres de ellos para hacer una caracterización funcional. Para ello, realizamos ensayos de actividad del transporte con diferentes nucleósidos marcados radiactivamente para comprobar que el resto de actividades de transporte no se veían afectadas por la sobreexpresión de hCNT1. Se usaron

guanosina y adenosina, nucleósidos púricos que no son sustratos de CNT1, pero sí que lo son de CNT2 y CNT3, y citidina, nucleósido pirimidínico, que sí es sustrato de CNT1. Los tres clones seleccionados para la caracterización funcional, presentaban una elevada actividad de tipo hCNT1, ya que sólo transportaban citidina de manera dependiente de sodio, nucleósido pirimidínico, siendo el clon 2 el que presentaba una mayor capacidad de transporte (figura 5).

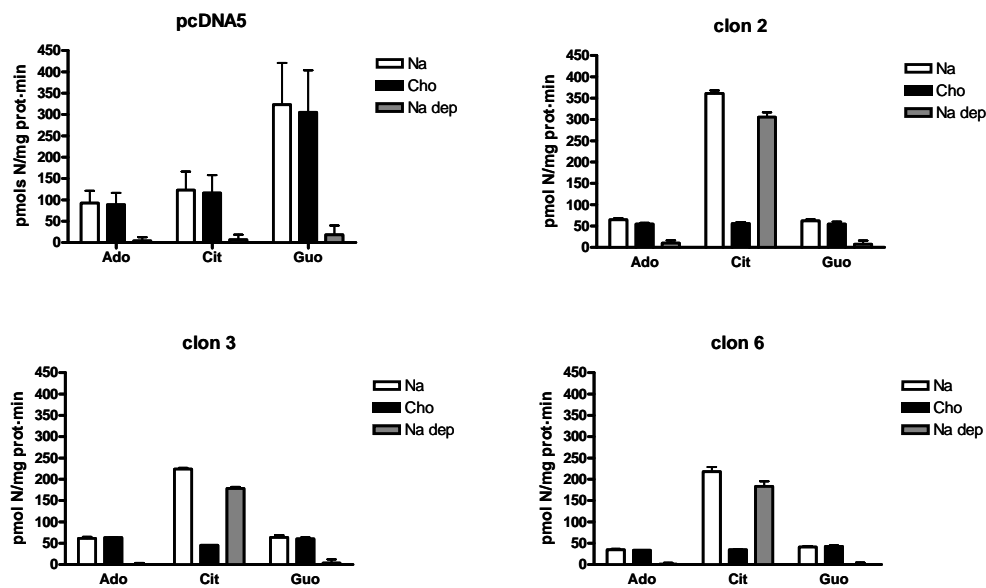


Figura 5. Determinación del transporte dependiente de sodio de tipo hCNT1 en los diferentes clones seleccionados. 48 horas después de sembrar 50.000 células por cm^2 , se midió la captación de adenosina, citidina y guanosina $1\mu\text{M}$ en presencia o ausencia de sodio. El transporte dependiente sodio se calculó como la diferencia entre la tasa de transporte en presencia de sodio y la tasa de transporte en ausencia de este (Cho). Los resultados son la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

En base a estos resultados, escogimos el clon 2 para hacer un análisis a nivel de mensajero de todos los transportadores de nucleósidos, y comprobar que no existiera ningún fenómeno compensatorio de otros transportadores al sobreexpresar hCNT1. Como se puede observar en la figura 6, no existe cambio alguno en la expresión de los otros transportadores concentrativos, ni en los transportadores equilibrativos.

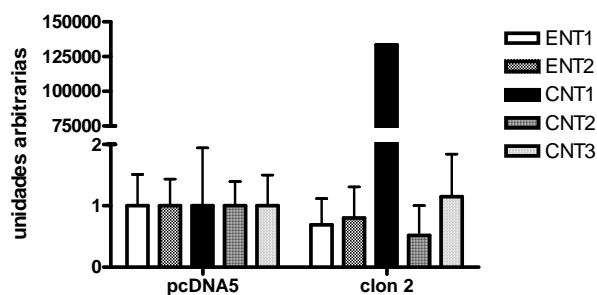


Figura 6. Determinación de los niveles de mRNA de los transportadores de nucleósidos en el clon hCNT1. Los valores de C_T obtenidos han sido normalizados respecto al control endógeno (GAPDH) y relativizado a los niveles de expresión en las células Hek293 establemente transfectadas con el vector pcDNA5 vacío.

La generación de esta línea que expresaba establemente hCNT1 nos sirvió como herramienta para caracterizar el nuevo anticuerpo monoclonal anti-hCNT1, contra un epítipo en el C-terminal de la proteína, que se generó en el transcurso de esta tesis doctoral en colaboración con el Dr. Pablo Engel perteneciente al grupo de investigación de Inmunología Molecular y Celular de la Universidad de Barcelona.

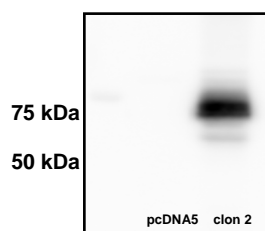


Figura 7. Detección de la proteína hCNT1 en la línea celular Hek293 transfectada establemente con hCNT1. Western blot contra la proteína hCNT1 en la línea Hek293 transfectadas establemente hCNT1 (clon 2). Como control negativo se utilizaron Hek293 transfectadas establemente con pcDNA5. Western blot representativo de tres experimentos independientes.

Después de testar distintos clones, nos quedamos con el anticuerpo que se muestra en la figura 7, que detectaba una banda clara alrededor de los 75 kDa (el peso molecular teórico para hCNT1 es de 71 kDa) que no aparece en las células transfectadas establemente con el vector pcDNA5 vacío. Además, el silenciamiento de hCNT1 en este modelo mediante la transfección de siRNA, se observa que la banda que se detecta con este anticuerpo desaparece. Estos

resultados se muestran más adelante en este bloque (figura 13A). Como se ha comentado anteriormente, la restitución de hCNT1 mediante un vector adenoviral provoca cambios en la migración celular (Pérez-Torras S *et al.*, 2013), es por eso que quisimos analizar si para nuestro modelo celular que expresa de manera estable la proteína hCNT1 ocurría lo mismo. Para ello llevamos a cabo ensayos *wound-healing*, utilizando siempre como control las células Hek293-pcDNA5. En concordancia con los resultados publicados, los experimentos mostraron una disminución significativa en la migración celular de las células que sobreexpresaban el transportador (figura 8).

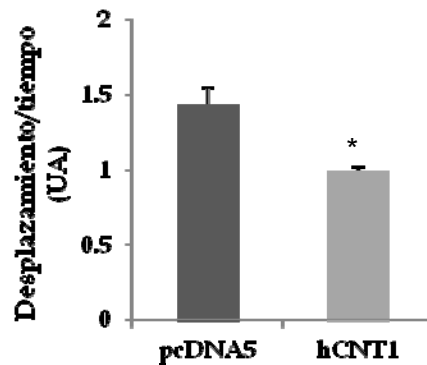


Figura 8. Ensayo de *wound-healing* en las líneas celulares Hek293-hCNT1. Se midió la velocidad de cierre de la herida en las células Hek293-hCNT1 durante 12 horas, utilizando como control las células Hek293-pcDNA5. Los resultados representados en unidades arbitrarias, son la media \pm SEM de tres experimentos independientes. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$ respecto al control.

1.1.2. Co-Immunoprecipitación de hCNT1 y RhoGDI2

Antes de comenzar con los ensayos de co-inmunoprecipitación para validar la interacción comprobamos la funcionalidad del anticuerpo dirigido contra RhoGDI2 (ab12427) para esta técnica, ya que éste no había sido probado por la casa comercial. Las pruebas de inmunoprecipitación (IP) se realizaron en dos líneas celulares diferentes, Jurkat, línea celular que presenta niveles elevados de la proteína RhoGDI2 y control positivo de expresión según la casa comercial y en NP-29 que presenta unos niveles intermedios (figura 2). Los

resultados obtenidos mostraron que únicamente cuando incubábamos el extracto proteico con el anticuerpo contra RhoGDI2 detectábamos la proteína y no, cuando utilizábamos IgGs de conejo inespecíficas (figura 9), validando de este modo el anticuerpo de RhoGDI2 para esta técnica.

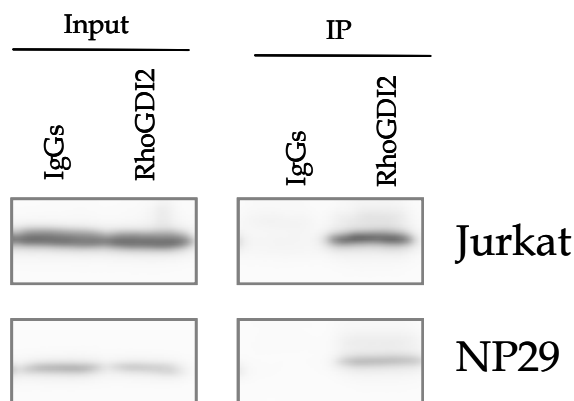


Figura 9. Inmunoprecipitación y western blot anti-RhoGDI2 en las líneas celulares Jurkat y NP29. Como control de inmunoprecipitación utilizamos IgGs de conejo no específicas.

No obstante, no fuimos capaces de detectar RhoGDI2 en la línea Hek293-hCNT1. Por esta razón decidimos clonar la proteína RhoGDI2 en el vector pcDNA3 para poder expresarla de manera exógena en nuestro modelo Hek293-hCNT1. El mRNA de RhoGDI2 se obtuvo de la línea celular NP-29, que como se muestra en la figura 2, esta línea celular expresaba la proteína, se comprobó por secuenciación la ausencia de mutaciones y se clonó tal y como se detalla en materiales y métodos.

Una vez obtenido el vector de expresión se transfectó transitoriamente la línea Hek293-hCNT1 y se pusieron a punto las condiciones de IP para RhoGDI2 con un nuevo anticuerpo (ab88317).

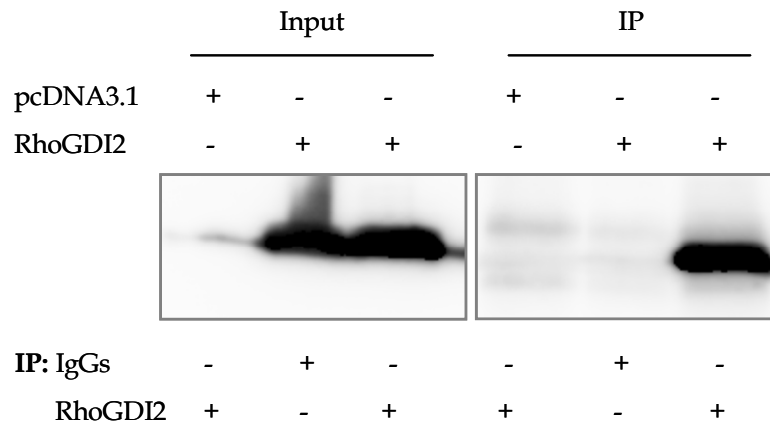


Figura 10. Inmunoprecipitación y western blot anti-RhoGDI2 en Hek293-hCNT1. Las células Hek293-hCNT1 se transfectaron transitoriamente con el vector vacío pcDNA3.1 o pcDNA3.1-RhoGDI2. Como control de IP utilizamos IgGs de conejo no específicas.

En la figura 10 se muestra la expresión de RhoGDI2 en las células transfectadas (input) así como su inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo específico. Después de realizar ensayos de co-IP con los dos anticuerpos y modificando oportunamente las condiciones de esta técnica, en ningún caso fuimos capaces de detectar la co-inmunoprecipitación de hCNT1 con RhoGDI2 (figura 11). Aunque en el revelado contra hCNT1 aparece una banda más intensa en las células Hek293-hCNT1, ésta parece ser inespecífica ya que su peso molecular no se corresponde y también la detectamos en las Hek293-pcDNA5.

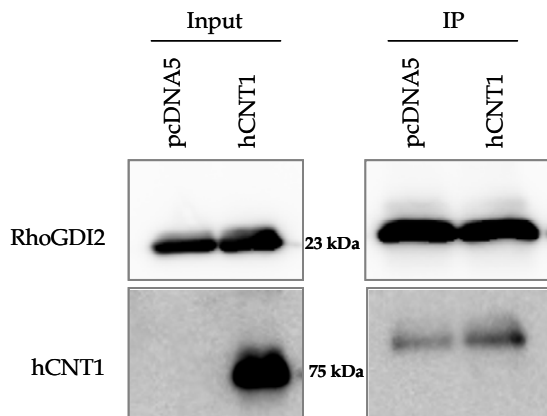


Figura 11. Co-Inmunoprecipitación de RhoGDI2. Se realizaron las co-IP contra RhoGDI2 en las células Hek293-pcDNA5 y Hek293-hCNT1 (arriba). Las dos líneas celulares se transfectaron transitoriamente con RhoGDI2. Se muestra el revelado anti RhoGDI2 y anti hCNT1 (lateral). Co-IP representativa de tres experimentos independientes.

Con las herramientas de las que disponemos hasta el momento no hemos sido capaces de validar la interacción hCNT1 con RhoGDI2 mediante la técnica de co-IP. Puede ser que el epítipo que reconocen los dos anticuerpos usados para inmunoprecipitar RhoGDI2 coincida con la zona de interacción con hCNT1, o bien que, la posible interacción de esta proteína con hCNT1 impida una buena exposición del epítipo. Si dispusiéramos de un anticuerpo contra el extremo C-terminal de hCNT1 válido para IP podríamos comprobarlo. Por todo ello no podemos descartar ni validar esta interacción.

1.1.3. Co-Inmunoprecipitación de hCNT1 y RACK1

El estudio de la interacción de hCNT1 y RACK1 se realizó en las células Hek293-hCNT1, modelo donde sí se expresa la proteína RACK1. Los ensayos de co-IP contra RACK1 se realizaron tanto en Hek293-hCNT1 como en Hek293-pcDNA5, y como se muestra en la figura 12, RACK1 co-inmunoprecipita con hCNT1, como se muestra en el revelado anti-hCNT1 (carril 2 de IP).

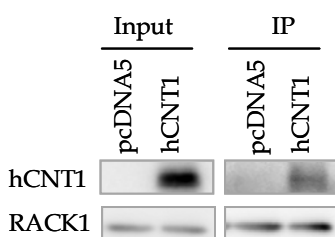


Figura 12. Co-inmunoprecipitación de RACK1. Se realizaron las co-IP contra RACK1 en las células Hek293-pcDNA5 y Hek293-hCNT1 (arriba). Se muestra el revelado anti hCNT1 y anti RACK1 (36 kDa) (lateral). IP representativa de tres experimentos independientes.

Una vez validada la interacción entre hCNT1 y RACK1 por co-IP, quisimos analizar si esta interacción podía estar afectando a la función de hCNT1 como transportador. Para ello realizamos ensayos de transporte silenciando la proteína RACK1 mediante siRNA. En la figura 13 A se muestra la expresión de CNT1 y RACK1 en condiciones basales y silenciadas en las líneas Hek293-pcDNA5 y Hek293-hCNT1. El transporte de citidina dependiente de sodio mostró una ligera tendencia a aumentar en las células donde se silenciaba RACK1, si bien esta no era significativa (figura 13B). De todos modos el

silenciamiento de la proteína de RACK1 no fue en ningún caso del 100% (figura 12A).

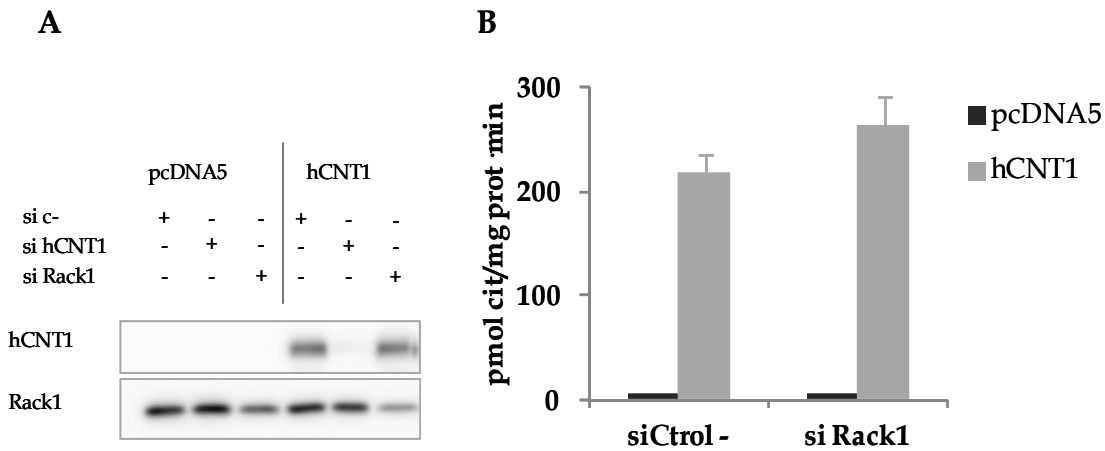


Figura 13. Caracterización funcional de la interacción hCNT1-RACK1. (A) Western blot anti hCNT1 y RACK1 en las células Hek293-hCNT1, silenciando ambas proteínas por separado. (B) Ensayo de transporte en las células Hek293-hCNT1 silenciándolas con RACK1. El ensayo se realizó 48h post-transfección si RACK1. Se muestra la actividad dependiente de sodio debida a hCNT1. Los resultados son la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Aunque los resultados son preliminares, creemos que sí demuestran la interacción de hCNT1 con RACK1. En cualquier caso, se deberá seguir ahondando en las implicaciones funcionales de esta interacción. RACK1 es una proteína adaptadora a la que hasta el momento se le han descrito interacciones con distintas proteínas pudiendo desplazarlas o anclarlas en localizaciones subcelulares específicas estabilizando así su actividad (McCahill A *et al.*, 2002; Sklan EH *et al.*, 2006). Concretamente, los efectos de RACK1 sobre migración parecen estar mediados mayoritariamente a través de la regulación del ensamblaje de las uniones focales promoviendo la activación de la proteína FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Kiely PA *et al.*, 2009; Kiely PA *et al.*, 2005; Onishi I *et al.*, 2007; Adams DR *et al.*, 2011). Resultados obtenidos en nuestro grupo por la Dra. Isabel Huber en colaboración con el Dr. Patrick Kiely de la Universidad de Cork, indican que la región de interacción de hCNT1 con RACK1 podría ser

la misma que la descrita para FAK, por lo que la unión de ambas a hCNT1 podría ser mutuamente excluyente. Así mismo, la unión de hCNT1 a RACK1 podría estar limitando sus funciones como transportador al anclarlo o secuestrarlo en zonas de la célula donde su capacidad para captar nucleósidos se vea claramente reducida, actuando así como un efector negativo para el transportador.

Por otro lado, varios autores describen que RACK1 juega un papel importante en la supervivencia celular y resistencia a la apoptosis (Mourtada-Maarabouni M *et al.*, 2005; López-Bergami P *et al.*, 2005). Recientemente, se ha descrito que RACK1 puede funcionar dentro del UPS, como E3 ubiquitin ligasa, (*Ubiquitin Proteasome System*) y mediar la ubiquitinación y degradación proteasomal de diversas proteínas pro-apoptóticas: como por ejemplo la proteína $\Delta Np63\alpha$, miembro de la familia p53 (Fomenkov A *et al.*, 2004), de HIF-1 α , y con Elongina-C (Liu YU *et al.*, 2007) y de la también proteína pro-apoptótica BimEL (*BCL2-interacting mediator of cell death*) (Zhang W *et al.*, 2008). Por todo ello no podemos descartar la posible implicación de RACK1 en la degradación del transportador.

1.2. Expresión de hCNT1 y sus posibles proteínas *partner* en muestras de cáncer de colon (CRC)

En una primera etapa de este estudio, quisimos determinar la expresión de RhoGDI2, PSAP, RACK1, hCNT1 y hENT1 en muestras tumorales con el fin de intentar detectar cambios a nivel de expresión del transportador hCNT1 así como establecer una posible correlación de ésta con las proteínas de interacción previamente identificadas. También decidimos incluir en el estudio el transportador equilibrativo hENT1, que participa en la captación de distintos fármacos análogos de nucleósidos usados como anticancerígenos. Para ello analizamos los niveles de mensajero de dichas proteínas en 104 muestras de RNA de cáncer de colon, que fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Antoni Castells. Utilizamos tres controles endógenos GUSB, 18S y GAPDH, ya que

estudios recientes han demostrado que muchos de estos genes usados de forma rutinaria como genes de referencia se ven regulados en distintas enfermedades, modelos animales o incluso bajo distintas condiciones experimentales dando lugar a resultados incorrectos o a malas interpretaciones (Fu LY *et al.*, 2009). Sin embargo, no pudimos realizar el estudio de correlación porque no detectábamos bien la expresión de hCNT1. Los niveles de expresión de hCNT1 en colon, aunque detectables, son sumamente bajos (Wojtal KA *et al.*, 2009). Además, como se ha comentado anteriormente, los CNTs están altamente regulados siendo su expresión muy baja o casi nula en tejidos desdiferenciados y en la mayoría de las líneas celulares (Young JD *et al.*, 2013), lo que podría estar dificultando este tipo de estudio. Si bien las muestras de cáncer colorectal pueden no ser las más adecuadas, la dificultad para acceder a muestras humanas limita claramente la selección de éstas.

Todo ello nos llevó a abordar en una segunda etapa, el análisis de muestras que incluyeran la comparativa de tejido sano y tumoral. El grupo del Dr. Antoni Castells nos cedió el RNA de 52 muestras apareadas de CRC que se extrajeron de biopsias de pacientes con cáncer de colon (T) y del tejido sano adyacente a éste (N). Se realizó el análisis de mRNA de los mismos genes y los valores de C_T fueron normalizados respecto a la media geométrica de dos controles endógenos, RPL01 y GAPDH.

En la figura 14, se encuentra representado el análisis de la expresión de mRNA de hENT1 y hCNT1 en las muestras apareadas de cáncer de colon. En ambos casos se observa una disminución del transportador en los tumores respecto al tejido normal adyacente. De todos los valores obtenidos se eliminaron las parejas en las que al menos uno de ellos presentaba una desviación mayor de 0.5 o una C_T mayor de 36. Así, de las 52 muestras iniciales se pudieron analizar 38 de hENT1, mientras que para hCNT1 sólo se pudieron analizar 13. En el caso de hENT1 existe una disminución significativa de los niveles de mensajero en las muestras tumorales respecto a las controles. En cambio, para hCNT1 también parece haber una disminución entre las tumorales respecto a las controles. En este caso deberíamos aumentar el número de casos,

ya que pese a observarse una tendencia a disminuir en tumores, esta no llega a ser significativa debido, seguramente, al bajo número de muestras analizadas.

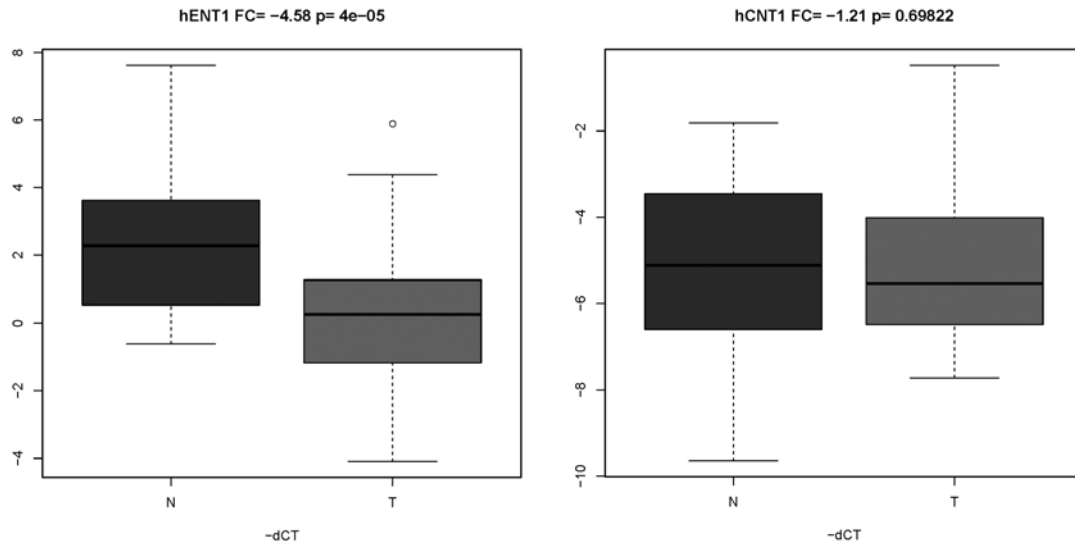


Figura 14. Análisis de la expresión de hENT1 y hCNT1 en muestras pareadas de CRC. Los valores de C_T obtenidos para cada gen han sido normalizados respecto a la media geométrica de dos controles endógenos (GAPDH, RPL0). En la figura se muestra para cada gen la media de C_T y su dispersión entre las muestras control (N) y las muestras tumorales (T). También se muestra el valor de la diferencia entre los dos tipos de muestras (N y T) y el valor de p. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto a las muestras control.

Por otro lado, el análisis de expresión de las posibles proteínas *partner* RhoGDI2, RACK1 y PSAP mostraron, en todas las muestras, unos valores de C_T más elevados que el transportador concentrativo, lo que permitió analizar los valores de expresión en 39, 43 y 41 parejas para RhoGDI2, RACK1 y PSAP, respectivamente. Los resultados mostraron una disminución significativa de RACK1 y PSAP en las muestras tumorales respecto sus controles, pero no de RhoGDI2 (figura 15).

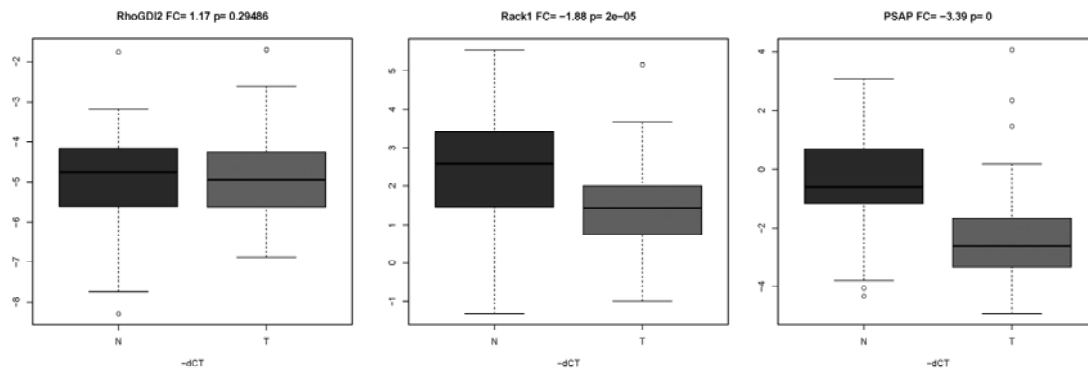


Figura 15. Análisis de la expresión de RhoGDI2, RACK1 y PSAP en muestras pareadas de CRC. Los valores de C_T obtenidos para cada gen han estado normalizados respecto a la media geométrica de dos controles endógenos (GAPDH, RPL0). En la figura se muestra para cada gen la media de C_T y su dispersión entre las muestras control (N) y las muestras tumorales (T). También se muestra el valor de la diferencia entre los dos tipos de muestras (N y T) y el valor de p. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto a las muestras control.

De hecho, estudios recientes de expresión de RNA de RhoGDI2 en cáncer de colon afirman que esta proteína puede ser un buen biomarcador, ya que el 33,3% de los pacientes con tumores con baja expresión de RhoGDI2 cursaban con metástasis en el hígado (Fujita A *et al.*, 2012). De todos modos, en este caso no se comparaba el tejido sano con el tumoral. En cambio otros trabajos, asocian la sobreexpresión de RhoGDI2 con una peor supervivencia global en pacientes con CRC, especialmente en las primeras etapas contribuyendo a la proliferación celular, motilidad e invasión, al menos en parte, mediante la activación de la vía PI3K/ Akt (Li X *et al.*, 2012).

En el caso de RACK1, los resultados publicados parecen indicar lo contrario a lo observado en nuestras muestras. Distintos autores demuestran un aumento en la expresión de RACK1 en cáncer de colon (Berns H *et al.*, 2000; Saito A *et al.*, 2002). Curiosamente, en el trabajo de Saito y colaboradores también se comparaba tejido tumoral con tejido sano adyacente, aunque sus resultados indican lo contrario que nuestros resultados. Cabe destacar que en este caso la expresión se determinó por hibridación *in situ* en una población japonesa. Otros artículos, describen que RACK1 regula a la baja los niveles de la

proteína Fem1b (proteína pro-apoptótica en células de cáncer de colon) en cánceres metastáticos y resistentes a la apoptosis, promoviendo la resistencia a la apoptosis de estas células durante la progresión del cáncer de colon (Subauste MC *et al.*, 2009).

1.3. Análisis de la expresión de la proteína de hCNT1 en tumores de endometrio

Tal y como ya se ha comentado, en nuestro laboratorio se realizaron estudios de expresión de los transportadores de nucleósidos en distintos cánceres ginecológicos (90 de ovario, 80 de endometrio y 118 carcinomas de cuello de útero) con anticuerpos policlonales contra hCNT1, hENT1 y hENT2 (Farré X *et al.*, 2004). En este trabajo se observó que hCNT1 era el transportador de nucleósidos cuya expresión se perdía en los diferentes tumores, además su pérdida estaba altamente correlacionada con los subtipos histológicos de peor pronóstico.

En esta línea, en colaboración con la Dra. Mireia Martin Satué del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental en el Hospital de Bellvitge, se analizó la expresión de hCNT1 en 20 muestras de adenocarcinoma de endometrio (de los tipos endometrioides y seroso), comparándose con su correspondiente tejido endometrial no patológico. Las muestras fueron obtenidas en el Servicio de Ginecología del Hospital de Bellvitge ajustándose a los principios de la Declaración de Helsinki y siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de Bellvitge. Su diagnóstico patológico se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Bellvitge. En este caso, se determinó la expresión en una cohorte de tumores de endometrio humano pareados con sus respectivos tejidos sanos adyacentes. Asimismo, estas muestras se caracterizaban por presentar distintos grados de diferenciación.

Las muestras de tejido fresco fueron cortadas, englobadas en la solución de congelación O.C.T. (*Optimal Cryostat Temperature*) y congeladas rápidamente en el aparato de congelación ultrarápida Shandon Histobath™ 2.

Para los estudios de inmunomarcaje, se obtuvieron los cortes histológicos de 10 μm de grosor con el criostato (Jung Frigcut 2800E, Leica) siguiendo los protocolos estándar (Aliagas E *et al.*, 2013). Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas utilizando una solución de suero de cabra al 20% de y 0,1% de gelatina en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. La incubación con el anticuerpo primario (policlonal anti-hCNT1) se realizó durante toda la noche a 4 °C en la misma solución con el 1% de suero y diluido 1:500. Seguidamente, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente diluido 1:500 con el anticuerpo secundario anti-conejo *Alexa Fluor 488* (Invitrogen), y tras teñir los núcleos durante 7 minutos a temperatura ambiente con ToPro3 (Invitrogen) diluido 1:1000, las muestras se montaron con medio de montaje acuoso Fluoromount (Sigma-Aldrich).

Los resultados fueron analizados y fotografiados con el microscopio confocal Leica TCS-SL (*Centres Científics i Tecnològics*, Campus de Bellvitge, UB).

En la figura 16 se muestra la detección de hCNT1 por inmunofluorescencia de un adenocarcinoma de endometrio de tipo seroso de grado 3 en el que se observa la pérdida de expresión de hCNT1 (en verde), los núcleos aparecen en azul.

En la mayoría de los casos estudiados (tanto en tumores de tipo endometriode como en serosos) la expresión de CNT1 en el tumor disminuye de manera significativa al compararlo con el tejido no tumoral. Se puede concluir que la pérdida aumenta con el grado del tumor y así los tumores de Grado 3 presentan una mayor pérdida de expresión de CNT1 que los de Grado 1 (80% frente al 50%).

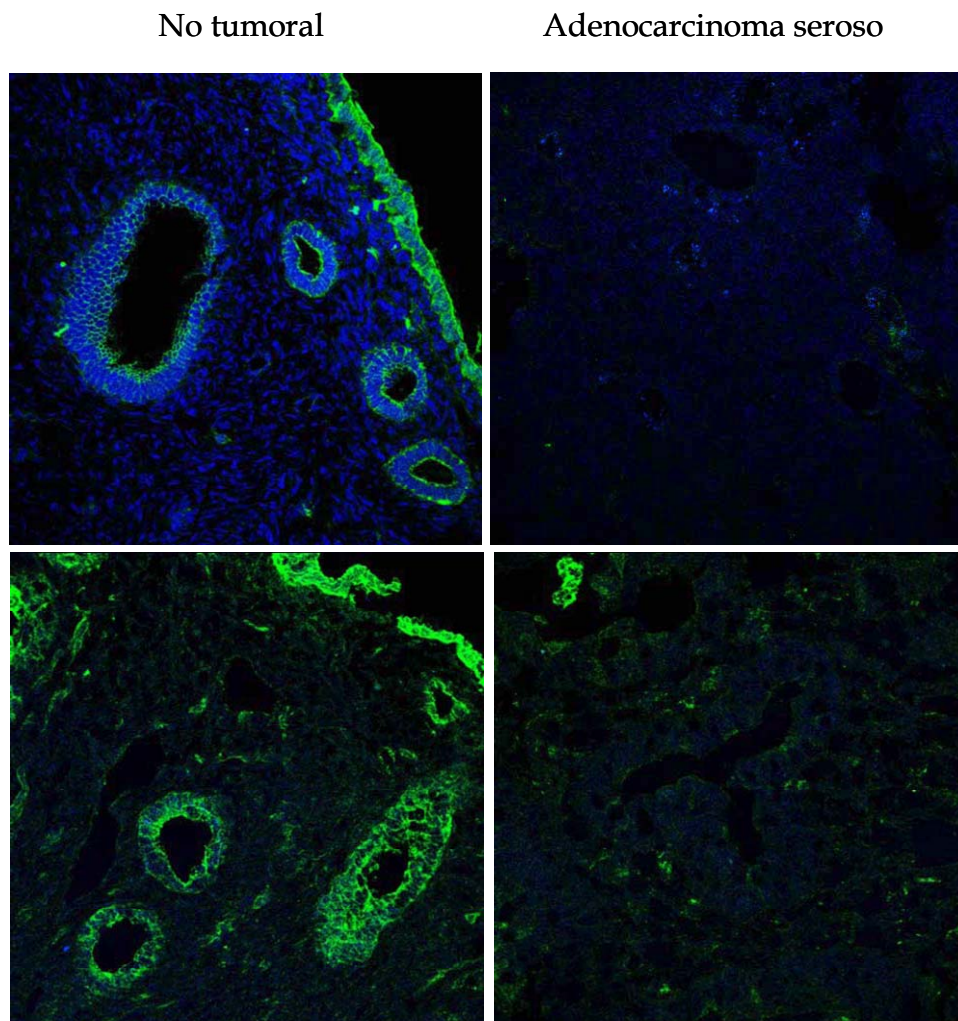


Figura 16. Detección de la expresión de hCNT1 en tumores de endometrio humano. Inmunofluorescencia realizada con el anticuerpo policlonal de hCNT1 (en verde) en dos de las muestras apareadas de adenocarcinoma de endometrio de tipo seroso de grado 3. En azul se muestra la tinción de núcleo.

El análisis de los tumores de endometrio confirma la correlación previamente observada por nuestro grupo entre la expresión de hCNT1 y la agresividad del tumor (Farré X *et al.*, 2004), además, al poder comparar con el tejido sano, pone de manifiesto la pérdida de expresión de este transportador de nucleósidos en la progresión tumoral en este tipo de tumores.

2. Expresión y regulación del transportador concentrativo de nucleósidos CNT2 en un modelo neuronal

Hasta la fecha, la distribución de los transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENT1 y ENT2) en cerebro y su papel en la regulación de la adenosina extracelular son relativamente bien conocidos. Aunque en la mayoría de tejidos ENT1 es el transportador que parece desempeñar un papel más importante en la captación de nucleósidos (Cabrita MA *et al.*, 2002), ENT2 ha sido propuesto como el principal transportador de nucleósidos en cerebro de rata (Anderson CM *et al.*, 1999a).

Para los transportadores de nucleósidos concentrativos (CNTs), se ha detectado la expresión de mRNA de CNT1, CNT2 (Anderson CM *et al.*, 1996) y CNT3 (Ritzel MW *et al.*, 2001a, Ritzel MW *et al.*, 2001b), siendo CNT2, el transportador concentrativo más ampliamente expresado en cerebro. De hecho, estudios en nuestro laboratorio han analizado la distribución de CNT2 por hibridación *in situ*, detectándose los niveles de mRNA en todas las regiones de cerebro de rata, aunque con una expresión mayoritaria en amígdala, hipocampo, regiones neocorticales y cerebelo (Guillén-Gómez E *et al.*, 2004).

La amplia distribución de CNT2 en cerebro y la alta afinidad que presenta por la adenosina sugieren que puede jugar un papel importante en la regulación de los niveles extracelulares de este nucleósido. Se ha demostrado que el transporte de adenosina a través de la barrera hematoencefálica *in vivo* está mediado por CNT2 (Li JY *et al.*, 2001). También se ha demostrado la presencia de CNT2 en membrana y en vesículas asiladas de cuerpo estriado de rata, resultado que está a favor de la teoría de que la adenosina es transportada en vesículas y liberada extracelularmente bajo ciertas condiciones fisiológicas (Melani A *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta ahora no se ha detectado actividad dependiente de sodio. De hecho, en nuestro laboratorio se ha trabajado con cultivo primario de cerebro anterior fetal y cultivo primario de cerebelo de rata hallándose actividad de tipo dependiente de sodio, pero eran resultados muy difíciles de reproducir debido seguramente a la rápida desdiferenciación que

sufren estos cultivos primarios. En la literatura se ha descrito que los transportadores concentrativos se expresan mayoritariamente en tejidos diferenciados (Govindarajan R *et al.*, 2007). De hecho, el tratamiento con estímulos diferenciadores incrementa la expresión de los CNTs en intestino de rata (Aymerich I *et al.*, 2004). Por este motivo en esta tesis se escogió una línea celular de feocromocitoma de rata, PC12, diferenciándola con NGF (*nerve growth factor*) hacia un modelo neuronal con el fin de detectar la actividad concentrativa de tipo CNT2.

2.1. Diferenciación de la línea celular PC12

Las células PC12, clonadas de feocromocitoma de rata han sido ampliamente usadas para el estudio de mecanismos moleculares en la diferenciación neuronal. Éstas se diferencian hacia un modelo neuronal en respuesta a NGF, provocando el arresto del ciclo celular, la extensión de neuritas y la excitabilidad eléctrica (Lee KH *et al.*, 2005).

Las neurotrofinas como el NGF están implicadas en múltiples efectos a través de muchas cascadas de señalización producidas por la activación de la familia de receptores Trk (receptor de tirosina kinasa), regulando diversas respuestas biológicas como la supervivencia celular, proliferación y diferenciación. En concreto el NGF actúa sobre el receptor TrkA que las células PC12 expresan de manera constitutiva. Es por ello que no hace falta preincubar las células con ácido retinoico, un método clásicamente utilizado para la activación de la expresión de los Trks (Cañón E *et al.*, 2004).

En base a lo expuesto, las células PC12 se diferenciaron, tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos, observándose la extensión de neuritas a partir del 5º día de tratamiento con la neurotrofina (figura 1). Las fotografías muestran que las células sin diferenciar tienen un fenotipo fibroblástico (A), mientras que a día 5 (B) ya se observa el crecimiento de neuritas que se mantienen a día 10 de cultivo (C).

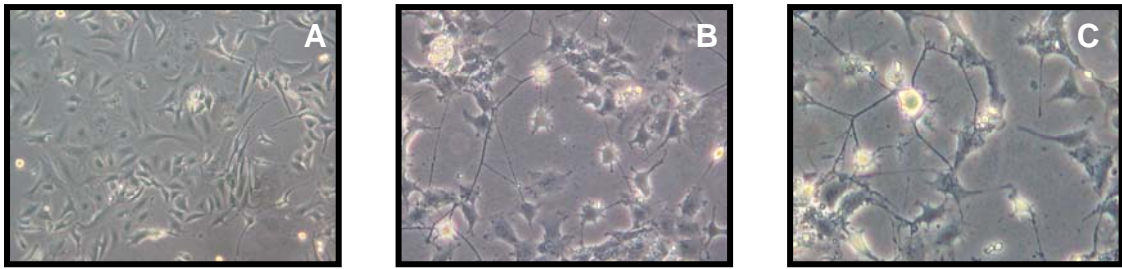


Figura 1. Diferenciación de las células PC12. Células PC12 sin diferenciar (A), células PC12 diferenciadas después de 5 y 10 días de incubación con NGF 50 ng/mL en medio DMEM bajo en suero 0.5% NHS (*neonate horse serum*) (B) y (C) respectivamente.

Para comprobar que el proceso de diferenciación se había producido correctamente, se realizó una inmunocitoquímica con el marcador de diferenciación MAP2 (*microtubule-associated protein 2*). MAP2 es un marcador de citoesqueleto que nos permite comprobar la reorganización de éste provocada por el estímulo diferenciador (figura 2).

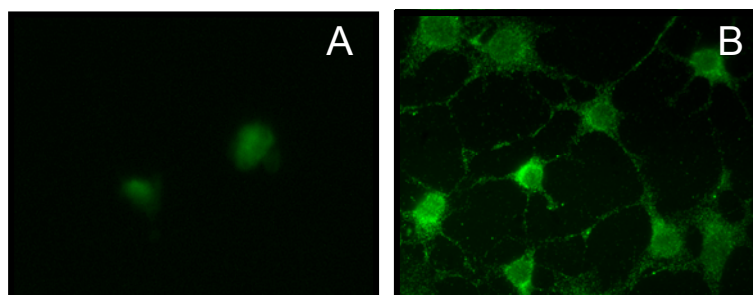


Figura 2. Comprobación del proceso de diferenciación de las células PC12. Inmunocitoquímica de las células PC12 con el anticuerpo anti-MAP2 (marcador de diferenciación). Células sin diferenciar (A), células diferenciadas a día 10 (B) con NGF 50 ng/mL.

2.1.1. Caracterización de la expresión de los transportadores de nucleósidos en línea celular PC12

Con el fin de determinar el patrón de expresión de los transportadores de nucleósidos en esta línea celular, realizamos una RT-PCR cualitativa para los transportadores en las tres condiciones experimentales, células sin diferenciar

(d0), a mitad del proceso de la diferenciación (d5) y al final de dicho proceso (d10) (figura 3).

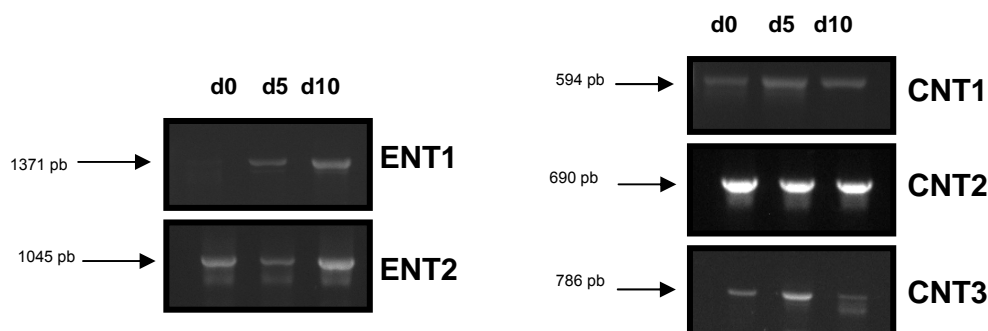


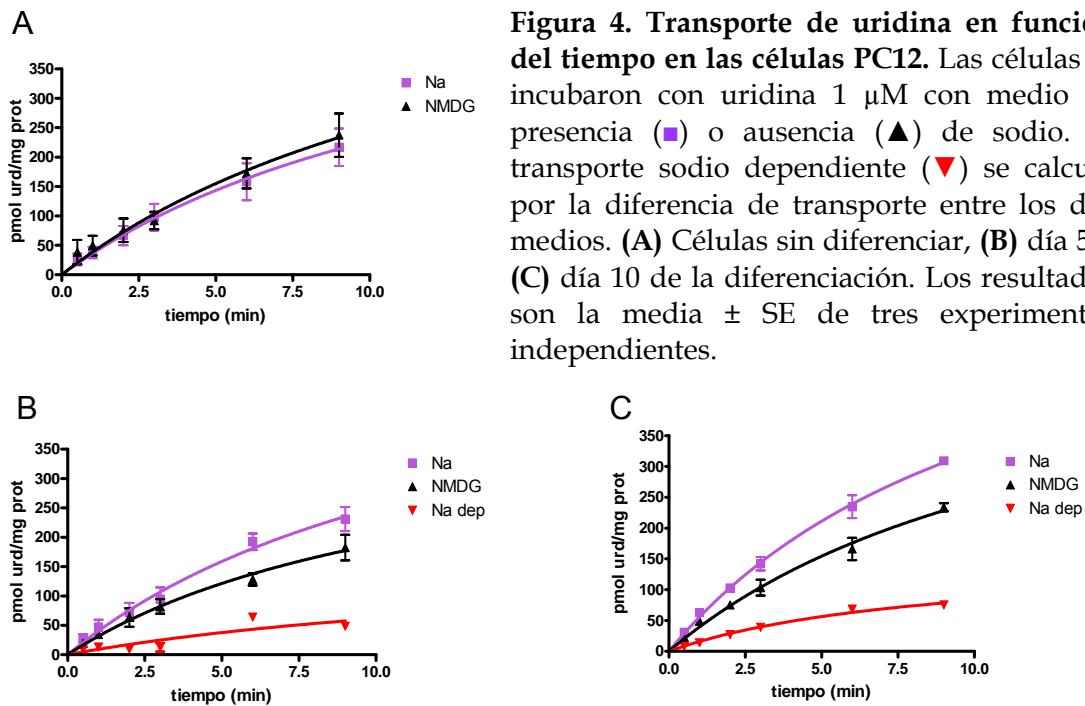
Figura 3. Detección de los transcritos de los transportadores de nucleósidos en la línea celular PC12. RT-PCR de los transportadores de nucleósidos en las tres condiciones experimentales. d0, células sin diferenciar, d5 y d10, células diferenciadas después de 5 y 10 días de incubación con NGF 50 ng/mL, respectivamente. A la izquierda los transportadores equilibrativos y a la derecha los transportadores concentrativos.

Los resultados de la figura anterior muestran que las células PC12 expresan todos los transportadores de nucleósidos incluso antes de ser diferenciadas.

En concreto, para el caso de los CNTs, se observa que los niveles del transportador CNT2 eran los más elevados ya desde el inicio del experimento. Aunque, esta afirmación debe ponderarse dado el carácter cualitativo del ensayo.

2.1.2. Actividad de los transportadores de nucleósidos

Una vez determinada la expresión de los transportadores concentrativos en las células sin diferenciar y diferenciadas, se decidió realizar ensayos de actividad de transporte con el objetivo de determinar si existía alguna actividad dependiente de sodio. Para ello se empezó determinando la captación de uridina dependiente del tiempo (*time-course*) (figura 4), ya que este nucleósido es sustrato de todos los transportadores de nucleósidos.



Podemos observar que las células PC12 sin diferenciar no muestran actividad dependiente de sodio aunque habíamos detectado la expresión de los mRNA de todos los CNTs. El proceso de diferenciación induce la aparición de la actividad dependiente de sodio.

Como se ha comentado previamente, la uridina es sustrato de los tres transportadores concentrativos. Para discriminar qué tipo de transportador era responsable de esta actividad, realizamos ensayos de *time-course* con citidina (sustrato de CNT1 y CNT3) y con guanosina (sustrato de CNT2 y CNT3). En la figura 5 se muestran los *time-courses* de citidina, no observando en ninguna de las tres condiciones experimentales actividad concentrativa. Descartamos así la posible contribución de los transportadores CNT1 y CNT3 a la actividad de transporte de uridina detectada.

Los experimentos de *time-course* con guanosina (figura 6), siguieron un patrón similar a los realizados con uridina, es decir, presencia de actividad dependiente de sodio únicamente en las células diferenciadas. El hecho de que se detecte una actividad de transporte concentrativa con guanosina y no con

citidina, demuestra que la actividad dependiente de sodio que se detecta en las células diferenciadas es de tipo CNT2.

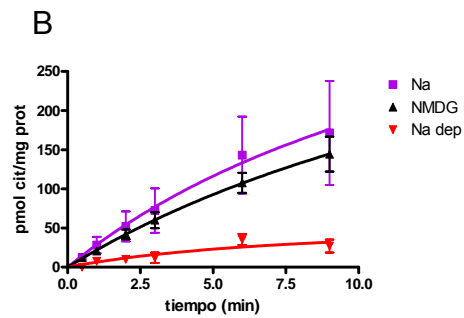
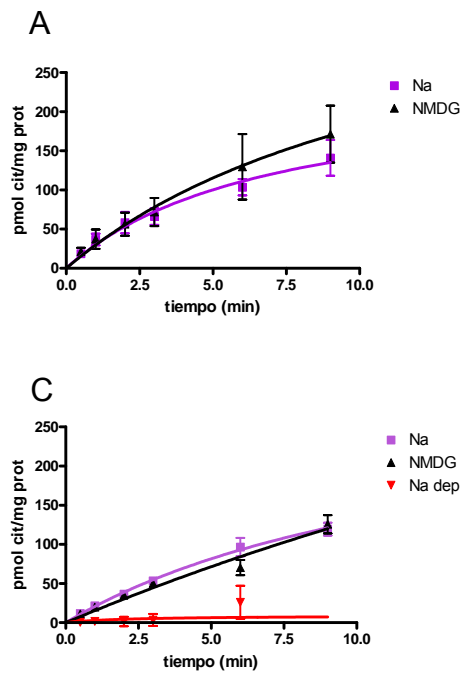


Figura 5. Transporte de citidina en función del tiempo en las células PC12. Las células se incubaron con citidina 1 μ M con medio en presencia (\blacksquare) o ausencia (\blacktriangle) de sodio. El transporte sodio dependiente (\blacktriangledown) se calculó por la diferencia de transporte entre los dos medios. (A) Células sin diferenciar, (B) día 5 y (C) día 10 de la diferenciación. Los resultados son la media \pm SE de tres experimentos independientes.

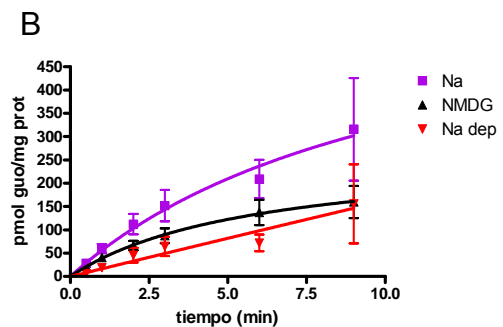
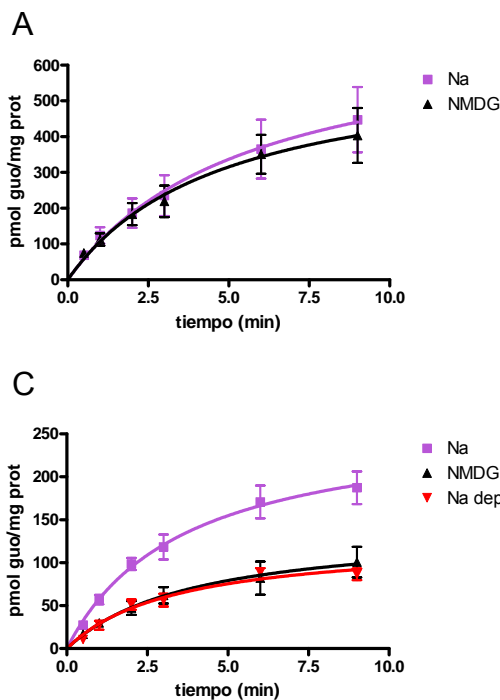


Figura 6. Transporte de guanosina en función del tiempo en las células PC12. Las células se incubaron con guanosina 1 μ M con medio en presencia (\blacksquare) o ausencia (\blacktriangle) de sodio. El transporte sodio dependiente (\blacktriangledown) se calculó por la diferencia de transporte entre los dos medios. (A) Células sin diferenciar, (B) día 5 y (C) día 10 de la diferenciación. Los resultados son la media \pm SE de cinco experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que el estado de diferenciación celular también puede influir en la regulación de los transportadores de nucleósidos equilibrativos, quisimos determinar cual era el transportador equilibrativo mayoritario en nuestra línea celular y si éste sufría algún tipo de regulación durante la diferenciación. Para ello se realizaron ensayos de transporte con uridina, ya que presentan valores de K_m para este sustrato muy similares, durante 3 minutos, en ausencia de sodio. Para discriminar entre los dos transportadores se inhibió la actividad de ENT1 utilizando NBTI (1 μ M).

En la siguiente figura se muestran las diferentes contribuciones de los dos transportadores equilibrativos en el transporte de uridina en las células sin diferenciar (d0) y en diferentes tiempos de diferenciación. Las células sin diferenciar presentan un transporte equilibrativo mayoritariamente de tipo ENT2, aunque a medida que avanza el estado de diferenciación se produce una disminución de la actividad de tipo ENT2 mientras que la asociada a ENT1 se mantiene constante. De hecho, a día 10 de diferenciación parece que los dos transportadores contribuyen por igual al transporte equilibrativo de uridina.

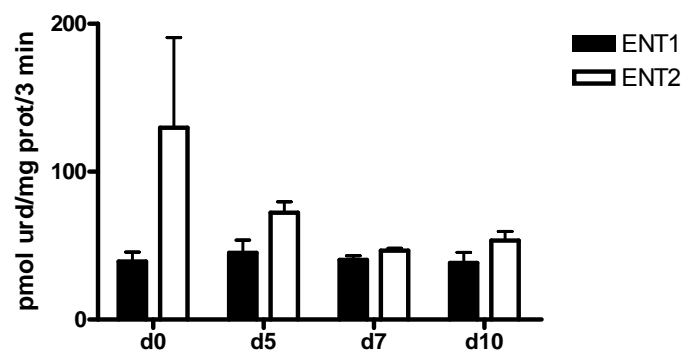


Figura 7. Componente equilibrativa del transporte de uridina en las células PC12 durante el proceso de diferenciación. Las células se incubaron con uridina 1 μ M durante 3 minutos. Las componentes equilibrativas se discriminaron mediante NBTI 1 μ M, inhibidor de ENT1. Los resultados son la media \pm SE de tres experimentos independientes.

Una vez teníamos caracterizada la actividad de las células PC12 sin diferenciar y diferenciadas, el siguiente paso fue realizar ensayos de *Real Time*

PCR de los diferentes transportadores, utilizando como control endógeno la subunidad de rRNA 18S. Con la intención de determinar si la aparición de la actividad dependiente de sodio de tipo CNT2 se debía a la activación transcripcional del gen que codifica para este transportador (figura 8).

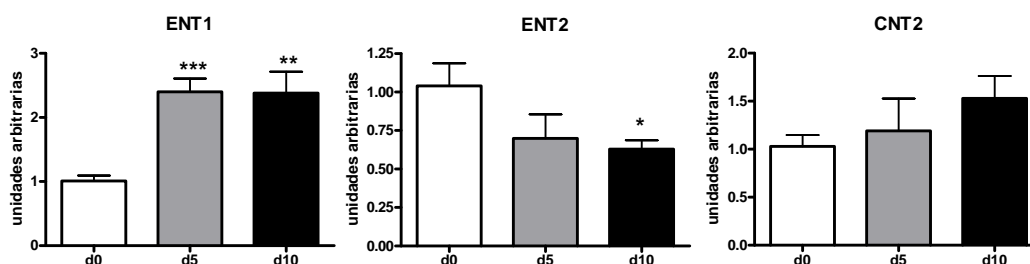


Figura 8. Patrón de expresión de los transportadores de nucleósidos en la línea celular PC12 sin diferenciar y diferenciadas por *Real-Time* PCR. Los valores de C_T obtenidos para cada transportador fueron normalizados respecto al control endógeno (18S). Los niveles de expresión se muestran en unidades arbitrarias, utilizando el punto d0 (células sin diferenciar) como control de referencia. Los resultados son la media \pm SE de cinco experimentos independientes. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

Los resultados demuestran que no hay cambios estadísticamente significativos en los niveles de mRNA para CNT2 durante la diferenciación. En el caso de los transportadores equilibrativos observamos que el proceso de diferenciación provoca un aumento del mRNA de ENT1 y una disminución de los niveles de mRNA de ENT2, resultados que puedan correlacionarse a nivel funcional en los cambios de actividad de tipo ENT2, pero no con los de ENT1.

Viendo que no había cambios significativos en los niveles de mRNA de CNT2, quisimos analizar qué ocurría en los niveles de proteína. En la siguiente figura se muestra un *western blot* representativo usando el anticuerpo contra rCNT2 generado y caracterizado en nuestro laboratorio. Observamos que los niveles de proteína para el transportador CNT2 aumentan con el proceso de diferenciación, siendo máximo sus niveles de expresión al 5º día del proceso.



Figura 9. Análisis por *western blot* de rCNT2 en la línea celular PC12. *Time course* de la expresión de la proteína rCNT2 durante el proceso de diferenciación. Como control de carga se utilizó tubulina. En la figura se muestra un *western* representativo de tres experimentos independientes.

2.2. Regulación purinérgica de CNT2

La adenosina es un reconocido neuromodulador inhibitor y un agente neuroprotector del Sistema Nervioso Central, que actúa mediante la unión a cuatro receptores de membrana A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , denominados genéricamente P1. Los dos primeros se caracterizan por su alta afinidad por el agonista y los dos últimos por su baja afinidad (Fredholm BB *et al.*, 2011).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que el transportador de nucleósidos CNT2 se expresa en cerebro de rata y su presencia se localiza principalmente en poblaciones neuronales. Además, la distribución de CNT2 y ENT1 mediante la técnica de hibridación *in situ* concuerda con regiones ricas en el receptor de adenosina A_1 (Guillén-Gómez E *et al.*, 2004).

Con estos precedentes y debido a la gran importancia de la adenosina en los tejidos neuronales, quisimos ver si el proceso de diferenciación de las PC12 estaba asociado a cambios en la expresión de los receptores de adenosina. Para ello se realizó una *Real Time* PCR para todos los receptores de adenosina en las tres condiciones experimentales de diferenciación ya comentadas.

Como se observa en la figura 10, las células PC12 sin diferenciar contienen el mRNA de todos los receptores de adenosina caracterizados hasta la fecha. Con el proceso de diferenciación observamos una disminución de los niveles de mRNA para los receptores A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Sin embargo, para el caso del receptor de adenosina A_1 lo que observamos fue un incremento gradual en la cantidad de mensajero a medida que avanzaba el estado de diferenciación de las células, siendo máxima su expresión a día 10.

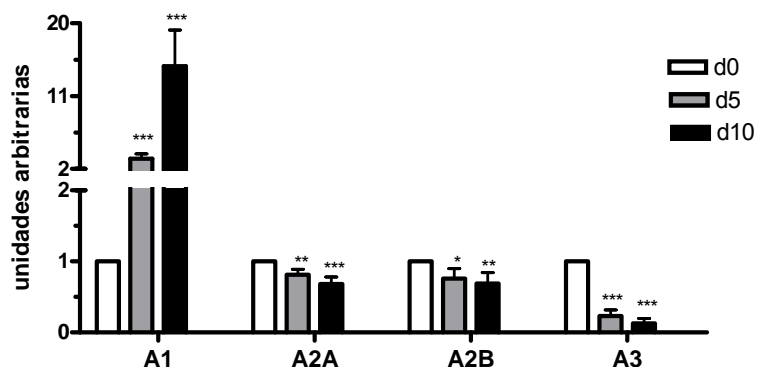


Figura 10. Niveles de mRNA de los receptores de adenosina en la línea celular PC12 en los distintos estados de diferenciación. Analizamos los niveles de mensajero de los receptores de adenosina por *Real-Time* PCR. Los valores de C_T obtenidos para cada receptor han estado normalizados respecto al control endógeno (18S). Los niveles de expresión se muestran en unidades arbitrarias, utilizando el punto d0 (células sin diferenciar) como control de referencia. Los resultados son la media \pm SE de cinco experimentos independientes. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

Teniendo en cuenta que, estudios previos de nuestro laboratorio demostraban que rPIA, agonista del receptor de adenosina A_1 , es capaz de regular la actividad del transportador CNT2 en células hepáticas (Duflo S *et al.*, 2004) y que en las células PC12 parece ser que el receptor de adenosina A_1 es el más abundante, decidimos incubar las células PC12 diferenciadas, a día 5, con rPIA 50 nM y medir la actividad de transporte vía CNT2 a distintos tiempos tras la adición del agonista. Observamos que la activación del receptor A_1 por el agonista rPIA provocaba un aumento de dos veces en la actividad del transportador CNT2 a los 15 minutos (figura 11).

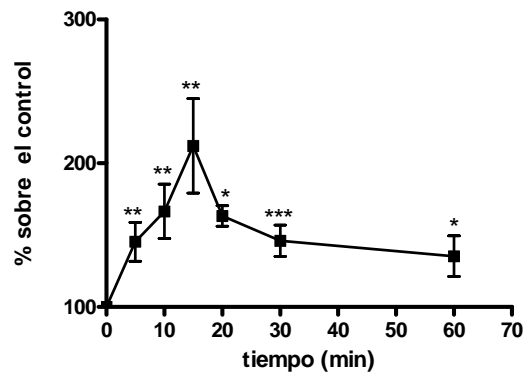


Figura 11. Activación purinérgica de CNT2 en las células PC12 diferenciadas con rPIA 50 nM. Se incubaron las células PC12 diferenciadas a día 5 con rPIA 50 nM (agonista de A_1) a diferentes tiempos y se realizaron ensayos de transporte a 2 minutos con guanosina para cada tiempo. Los resultados son la media \pm SE de siete experimentos independientes. Los valores representan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

Cuando realizamos un ensayo dosis-respuesta a los 15 minutos con el mismo agonista rPIA, observamos una curva bimodal (figura 12). Esta curva alcanza un primer *plateau* cuando rPIA fue administrado en el rango nM, observándose un segundo incremento en la actividad de CNT2 en el rango μ M.

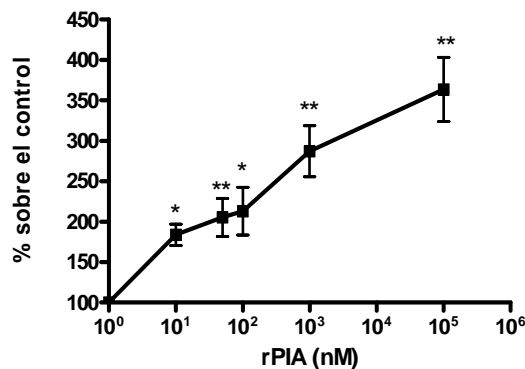


Figura 12. Activación purinérgica de CNT2 a los 15 minutos. Se realizó ensayos de transporte con guanosina durante dos minutos en una dosis-respuesta de rPIA de 15 minutos en las células PC12 diferenciadas a día 5. Los resultados son la media \pm SE de cinco experimentos independientes. Los valores representan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

Este resultado nos hizo pensar en la posibilidad de que más de un receptor de adenosina pudiera activar CNT2. Este patrón en la activación de CNT2 por acción de rPIA es consistente con una activación bimodal de dos receptores con distinta afinidad para la adenosina. Es por ello que incubamos las células PC12 diferenciadas con una batería de agonistas y antagonistas de receptores P1 con el fin de caracterizar mejor cuáles eran los receptores de adenosina implicados en la activación del transportador de tipo CNT2 en las células PC12 diferenciadas. Como se muestra en la figura 13 tanto los agonistas preferentes para A₁ como para A_{2A} eran capaces de activar la función de CNT2 en las células PC12 diferenciadas. El antagonista del receptor de adenosina A₁ DPCPX y el antagonista de A_{2A} ZM241385, fueron capaces de bloquear la activación de CNT2 provocada por el agonista rPIA y CGS, respectivamente.

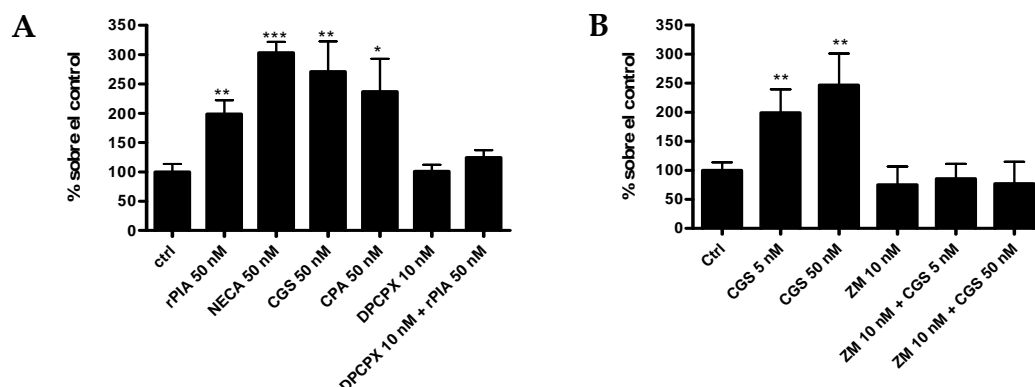


Figura 13. Efecto sobre la actividad CNT2 en las células PC12 diferenciadas con una batería de agonistas y antagonistas de los receptores de adenosina. (A) Se midió la actividad de CNT2 después de incubar las células durante 15 minutos con una amplia batería de agonistas de los receptores de adenosina a 50 nM (rPIA, NECA, CGS y CPA). La activación de CNT2 por rPIA fue revertida cuando se preincubaron las células durante 30 minutos con el antagonista de A₁ a 10 nM. (B) Efecto de la activación de A_{2A} sobre la actividad de CNT2, con o sin previa incubación de 30 minutos con su antagonista ZM 241385 10 nM. Los resultados son la media ± SE de tres experimentos independientes. Los valores representan, en porcentaje, la actividad de transporte dependiente de sodio calculada después de las incubaciones, respecto a la actividad basal control. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

Agonistas: rPIA 50nM: A₁>A₃>A_{2A}>A_{2B}, CPA 50nM: A₁>A₃>A_{2A}>A_{2B}, NECA 50nM: A₁,A_{2A},A₃> A_{2B}, CGS 50 nM: A_{2A}>A₃>A₁>A_{2B}.

Antagonistas: DPCPX 10 nM: A₁, ZM241385 10 nM: A_{2A}

Aunque generalmente A_1 y A_{2A} desencadenan respuestas antagónicas, estos resultados sugieren, que la estimulación de ambos receptores aumenta de manera transitoria la actividad de tipo CNT2 en este modelo celular.

2.3. Activación de la AMPK

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es una enzima heterotrimérica compuesta de una subunidad- α catalítica (serina/treonina quinasa) y de las subunidades no catalíticas β y γ , clave en la regulación de la homeostasis celular. AMPK activa en situaciones de depleción de ATP o, lo que es equivalente, de aumento de AMP, activando vías metabólicas productoras de energía en detrimento de las que requieren ATP (Hardie DG y Carling D, 1997; Ferré P *et al.*, 2003). En estas situaciones la AMPK activada provoca el bloqueo de la síntesis de glucógeno, inhibe la gluconeogénesis y activa la glucólisis. Además, la AMPK parece estar implicada en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana celular en el músculo esquelético durante el ejercicio físico (Hayashi T *et al.*, 1997) así como en la disminución de la translocación de GLUT4 en condiciones de hipoxia (Winder WW *et al.*, 1999; Mu J *et al.*, 2001). En el hígado, la activación de la AMPK provoca una disminución en la liberación de glucosa (Zhou G *et al.*, 2001), y una disminución en los niveles de HNF4 α que resultan en una disminución de los niveles del mRNA de HNF-1 α , GLUT2, piruvato quinasa, aldolasa B, apolipoproteína B y apoCIII (Leclerc I *et al.*, 2001). Por otro lado, son muchas las funciones que se le atribuyen a esta proteína quinasa en el sistema nervioso central, neuroprotectoras (Ronnett GV *et al.*, 2009) entre otras, aunque también se ha demostrado su implicación en patologías como la enfermedad de Alzheimer (Cai Z *et al.*, 2012). Por todo ello conocer sus mecanismos de regulación es importante.

En nuestro laboratorio ya habíamos demostrado que en tejidos periféricos la adenosina extracelular podía activar la AMPK (Aymerich I *et al.*,

2006), y como se ha descrito en la introducción, CNT2 es uno de los mejores candidatos para mediar el transporte de adenosina. Por estas razones quisimos analizar si la presencia de actividad CNT2 en las células PC12 diferenciadas podía tener algún efecto sobre el metabolismo energético celular. Para ello se añadió adenosina 10 μM al medio de cultivo de las células PC12 diferenciadas a día 5, y se determinó el estado de fosforilación de la AMPK (forma activada) a diferentes tiempos, mediante la técnica de *western blot*, utilizando anticuerpos que reconocen la forma fosforilada (Thr172) de la proteína. Se escogió esta concentración de adenosina ya que se encuentra en los rangos cercanos en los que se encuentra la adenosina en los fluidos corporales. Varios autores han descrito que la concentración de adenosina en sangre es de entre 0.3-1 μM aunque esta puede aumentar en condiciones de hipoxia o isquemia (Lasley RD *et al.*, 1998; Pasini FL *et al.*, 1996; Saadjian AY *et al.*, 2002). Como control positivo de activación de la AMPK, utilizamos células incubadas con 5-aminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido (AICAR), potenciador de la fosforilación de la AMPK de manera específica en la isoforma $\alpha 1$ (fosforilación de la Thr172) (Gadalla AE *et al.*, 2004), a 500 μM durante una hora, condiciones en las que se produce su efecto máximo. Cabe destacar que las células se han de lisar rápidamente, ya que el simple hecho de aspirar el medio de cultivo puede provocar cierta activación de esta proteína quinasa, es por esa razón que se utilizó N_2 líquido para parar todas las incubaciones realizadas.

Como se observa en la figura 14A, la adenosina extracelular incrementaba el estado de fosforilación de la AMPK, al menos dos veces. Además, este efecto parecía ser relativamente rápido, siendo máximo a los 5 minutos (figura 14A y 14E).

Posteriormente quisimos comprobar si la adenosina extracelular transportada hacia el interior de la célula a través de CNT2, era la responsable de la activación de la AMPK. Para ello se preincubaron las células durante 10 minutos con formicina B 100 μM , un inhibidor competitivo de CNT2, y observamos que es la adenosina extracelular transportada hacia el interior

celular a través de este transportador era la responsable de la activación de la AMPK (figura 14B y 14E).

En condiciones de inhibición de la actividad CNT2, AICAR todavía inducía la fosforilación de la AMPK, aunque la magnitud del efecto era menor que cuando incubábamos las células en ausencia de formicina B (figura 14B). Esto puede ser explicado por el hecho, de que a concentraciones tan elevadas, como las que se utilizaron para estos experimentos, otros transportadores pueden ser responsables de la entrada de AICAR al interior celular. Aunque no hay pruebas directas de que AICAR sea transportado por ENT1, se demostró que su efecto citotóxico en células primarias de leucemia linfática crónica (CLL) disminuía cuando la actividad de ENT1 se inhibía farmacológicamente (Campás C *et al.*, 2003). También se demostró que el grado de activación de la AMPK por AICAR se veía atenuado por inhibidores de los ENTs en cerebro de rata (Gadalla AE *et al.*, 2004).

El siguiente paso a realizar fue determinar si el efecto de la adenosina sobre la AMPK se acababa traduciendo en la modulación de alguna de sus dianas. Así pues, analizamos el estado de fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), una de las dianas de la AMPK mejor caracterizadas. Para ello, se llevó a cabo el mismo tipo de experimentos que los realizados para analizar el estado de fosforilación de la AMPK. Tanto la adenosina añadida extracelularmente como AICAR aumentaban el estado de fosforilación de la ACC (figura 14C y 14F). En este caso, el estado de fosforilación es indicativo de la inhibición de la actividad ACC. Este efecto se prevenía cuando las células se preincubaban con formicina B 100 μ M (figura 14D y 14F).

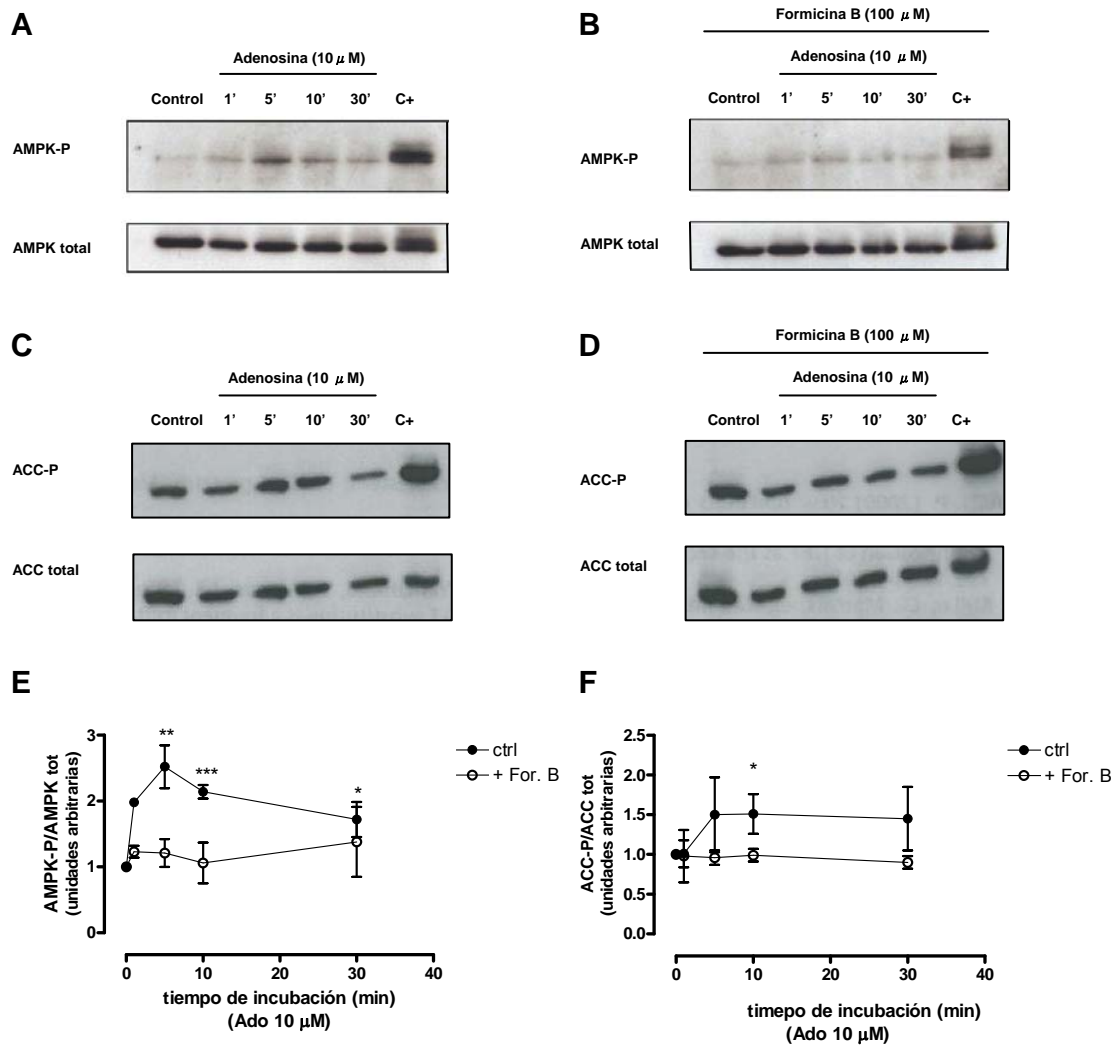


Figura 14. *Time course* del efecto de la adenosina sobre la fosforilación AMPK y ACC. Se incubaron las células PC12 diferenciadas a día 5, en presencia de adenosina 10 μ M a diferentes tiempos. (A y C) Se monitorizaron los niveles de AMPK-P y ACC-P por *western blot*. Como control positivo se incubaron las células con AICAR 500 μ M durante 1 hora (un activador alostérico de la AMPK). (B y D) Se realizaron los mismos ensayos de adenosina sobre las células PC12 diferenciadas con previa incubación de Formicina B 100 μ M durante 10 minutos (un inhibidor competitivo de CNT2). (E y F) La magnitud de la inducción se cuantificó densitométricamente. Los resultados son la media \pm SE de tres experimentos independientes. Se muestra el *western blot* representativo y se representan como unidades arbitrarias normalizadas a los valores obtenidos con las células control (no tratadas). AMPK y ACC total fueron usados como control de carga. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

2.4. Regulación de CNT2 por hipoxia

La adenosina tiene un papel muy importante en el cerebro como neuroprotector. Sus niveles se incrementan drásticamente en condiciones de isquemia y juegan un papel crítico en la progresión del daño cerebral, ejerciendo su efecto neuroprotector sobre la activación de los diferentes receptores de adenosina. Cualquier modificación en estos receptores determinaría la acción de la adenosina durante la isquemia y otras situaciones de estrés, sin olvidar que la principal vía para eliminar la adenosina del espacio extracelular a través de la membrana celular es a través de sus transportadores (Gu JG *et al.*, 1995). Basándonos en nuestra hipótesis de trabajo inicial en la que la actividad del transportador CNT2 puede modular la concentración de adenosina extracelular, y los resultados obtenidos, donde se demuestra que CNT2 está bajo control purinérgico en nuestro modelo de PC12 diferenciada, quisimos determinar si CNT2 estaba regulado por hipoxia.

Para ello decidimos incubar nuestra línea celular PC12 diferenciada a día 5 durante 24 y 48 horas en condiciones de hipoxia aguda (1% O₂). Realizamos ensayos de actividad de transporte de tipo CNT2 a 0h (control), 24h y 48h después de la inducción de la hipoxia. Utilizamos como sustratos guanosina, para determinar la actividad de tipo CNT2, y uridina, en presencia o ausencia de NBTI, un inhibidor de ENT1, para caracterizar los transportadores de nucleósidos equilibrativos (figura 15).

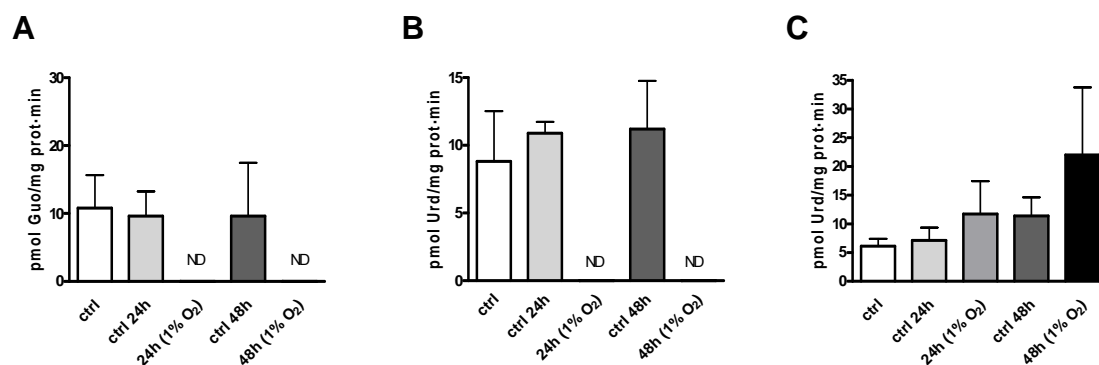


Figura 15. Caracterización del transporte de nucleósidos en las células PC12 diferenciadas en condiciones de hipoxia al 1% de O₂. (A) Comportamiento de la actividad de tipo CNT2 durante distintas condiciones experimentales. Los ensayos de transporte se realizaron con guanosina 1 μ M. La componente concentrativa, CNT2, se determinó como la diferencia entre el transporte en medio sodio y en medio sin sodio. (B) Comportamiento de la actividad de los transportadores equilibrativos durante las distintas condiciones experimentales. (C) Comportamiento de la actividad mediada por ENT1. La contribución de la actividad equilibrativa se midió utilizando 1 μ M de NBTI para discriminar entre ENT1, componente sensible a NBTI, y ENT2, componente insensible. Los resultados son la media \pm SE de tres experimentos independientes. Ctrl: son células PC12 diferenciadas a día 5. ND: no detectable. Esto significa que la diferencia entre el transporte en presencia y en ausencia de sodio (NMDG) era nula.

Los resultados obtenidos (figura 15) sugieren que el transporte de adenosina mediado por, CNT2 el transportador de mayor afinidad por adenosina, está regulado en condiciones de hipoxia, disminuyendo su actividad en dichas condiciones.

2.5. Expresión de los transportadores de nucleósidos y receptores de adenosina en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral de rata

Con el objetivo de determinar si estos efectos podían eventualmente también cursar *in vivo*, realizamos experimentos en animales a los que se les inducía una isquemia cerebral transitoria en un único hemisferio cerebral. Analizamos los niveles de expresión de los transportadores de nucleósidos y de los receptores de adenosina mediante *Real Time* PCR en cerebros de animales no intervenidos, así como también en los dos lóbulos cerebrales de ratas a las cuales se les había inducido, en uno de los lóbulos, una isquemia transitoria (90 minutos). Esto nos permitió utilizar el lóbulo previsiblemente no afectado como control directo de la acción de la isquemia. Los tejidos se extrajeron 8 horas

después de la isquemia. Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Anna Planas (CSIC-IDIBAPS), experta en estos modelos animales. Observamos que los transportadores de nucleósidos que se conocen como mejores candidatos para transportar adenosina (ENT1, CNT2 y CNT3) presentaban una caída estadísticamente significativa en sus niveles de expresión. En las mismas condiciones, las cantidades de mRNA de ENT2 y CNT1 no se veían afectadas (figura 16). En cuanto a los receptores de adenosina, observamos que sólo el receptor A₃ presentaba una disminución respecto al lóbulo no afectado, mientras que el mRNA de los otros receptores no se veía alterado.

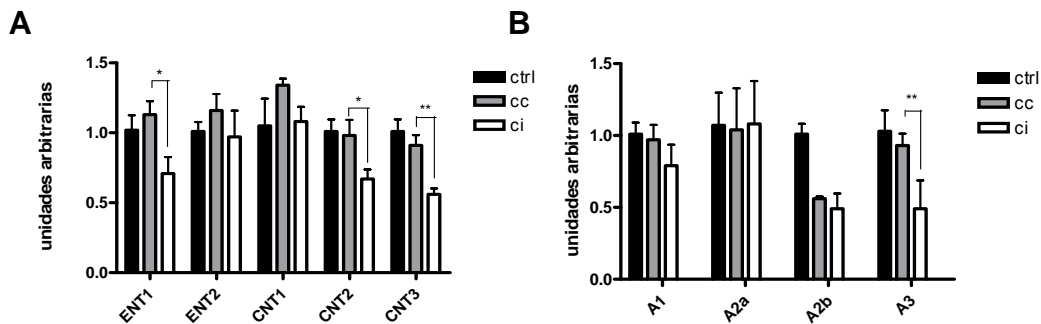


Figura 16. Perfil de expresión de los transportadores de nucleósidos y receptores de adenosina en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral de rata. El análisis de mRNA por *Real Time* PCR se determinó a partir de extractos de RNA de ratas macho adultas Sprague-Dawley que habían sufrido isquemia cerebral transitoria, producida por oclusión intraluminal (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*) de 90 minutos y 8 horas de reperusión. Los valores de C_T obtenidos para cada gen han sido normalizados respecto al control endógeno (18S). Los niveles de expresión se muestran en unidades arbitrarias. Ctrl: ratas *sham* operadas, CC: córtex contralateral, CI: córtex ipsilateral (infartado). Los resultados son la media ± SE de cinco animales. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

Además de su papel en el reciclaje de nucleósidos y la biosíntesis de nucleótidos, la adenosina es un nucleósido implicado en la señalización celular. El papel de la adenosina como un inhibidor del metabolismo tanto en los tejidos periféricos como en el cerebro es ampliamente reconocido (Fredholm BB *et al.*, 2011; Porkka-Heiskanen T *et al.*, 2011; Dunwiddie TV y Masino SA, 2001), por lo tanto, la dinámica de la adenosina puede influir en el estado metabólico de, entre otras, células de tejido neural.

Aunque sólo los tejidos altamente especializados expresan las proteínas de tipo CNT funcionales (Govindarajan R *et al.*, 2007), en estudios previos en tejidos neuronales se detectó la expresión a nivel proteico de los ENTs, a pesar de la presencia de transcritos de CNT en el cerebro (Li JY *et al.*, 2001; Guillén-Gómez E *et al.*, 2004; Anderson CM *et al.*, 1999). ENT1 es la única proteína de entre todos los transportadores de nucleósidos que ha sido ampliamente estudiada y trazada gracias, entre otras razones, a la existencia de ligandos de alta afinidad para esta isoforma en particular (Zhu Z y Buolamwini JK, 2008; Governo RJ *et al.*, 2005). Además, el modelo de ratón *knockout* para ENT1 es el único disponible hasta la fecha de entre todos los transportadores de nucleósidos, mostrando un fenotipo neuronal, caracterizado por la disminución a las respuestas hipnóticas, ataxia en respuesta al etanol, además de un mayor consumo de alcohol, una característica que puede ser revertida de alguna manera por antagonistas del receptor A₁ (Choi DS *et al.*, 2004). De forma complementaria, la expresión transgénica de la proteína ENT1 humana en cerebro de ratón, muestra respuestas conductuales alteradas debido a los medicamentos que se sabe que afectan la señalización de adenosina, tales como la cafeína y el etanol (Parkinson FE *et al.*, 2009). Por otro lado, cuando se usaron cortes de hipocampo de estos ratones transgénicos, se demostró que la inhibición de la neurotransmisión excitatoria después de la hipoxia transitoria o privación de oxígeno-glucosa se redujo en comparación con los ratones *wild type* (Zhang D *et al.*, 2011), lo que sugiere que los transportadores de nucleósidos pueden ser dianas farmacológicas adecuadas para el tratamiento de la isquemia cerebral. En cualquier caso, el fenotipo aparentemente leve de los ratones

knockout para ENT1, está a favor de que la concentración de adenosina en cerebro también puede ser regulada por otras proteínas transportadoras, tales como CNT2. Disponemos del mapa de distribución del mRNA de CNT2 en cerebro (Guillén-Gómez E *et al.*, 2004), y la proteína CNT2 ha sido recientemente identificada en membrana plasmática y en preparaciones de membrana de vesículas de cuerpo estriado de rata, lo que sugiere que CNT2 está contribuyendo a la señalización de la adenosina en cerebro (Melani A *et al.*, 2012).

3. Estudiar la implicación de hCNT2 en la regulación del metabolismo energético

La reciente identificación de la aldolasa B como proteína de interacción con CNT2 en hepatocitos, junto con la evidencia de que cambios en el flujo glucolítico parecen también modular la actividad del transportador (Huber-Ruano I *et al.*, 2010), nos animaron a re-evaluar el papel que esta proteína juega en la biología del hepatocito. Además, como ya se ha comentado anteriormente en el primer bloque de resultados, estudios previos en nuestro grupo de investigación habían demostrado que la expresión de CNT2 se pierde en modelos animales de hepatocarcinogénesis inducida (Dragan Y *et al.*, 2000). Todo ello nos indujo a hipotetizar que la función CNT2 puede contribuir a la regulación fina del flujo glucolítico y que su pérdida en tumores puede también contribuir a explicar los cambios que acontecen en el metabolismo energético durante la transformación neoplásica.

El proceso de desarrollo tumoral así como su proliferación se caracteriza por alteraciones en el metabolismo celular. Las células tumorales son altamente glucolíticas, de un modo similar a lo que ocurre en condiciones fisiológicas donde existe una elevada demanda de energía. Muchos tipos tumorales se caracterizan por presentar elevadas tasas de glucólisis, producción de lactato, y biosíntesis de macromoléculas y lípidos (Kroemer G y Pouyssegur J, 2008; Vander Heiden MG *et al.*, 2009). Durante la glucólisis anaeróbica, la glucosa es convertida a piruvato, y el producto final de esta reacción es el lactato, que se exporta fuera de la célula. De hecho, la acidosis láctica es una complicación típica de los pacientes de cáncer (Dhup S *et al.*, 2012).

Los mecanismos moleculares que subyacen el cambio metabólico que se observa en las células cancerosas son poco conocidos. Recientemente, se ha descrito el nuevo papel que ejercen en el control del metabolismo los reguladores del ciclo celular (Fajas L, 2013). Los reguladores del ciclo celular, concretamente el eje cdk4-pRB-E2F1, formado por las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas (cdk), los factores de transcripción E2F y la proteína del retinoblastoma (pRB) son factores clave en el control de la proliferación

celular y unos buenos candidatos como sensores de señales externos que requieren una respuesta metabólica específica. Estos factores son esenciales para la regulación de los procesos anabólicos biosintéticos, bloqueando las vías oxidativas y catabólicas. La vía cdk4-pRB-E2F1 también ejerce una regulación negativa en el gasto energético a través de la represión del metabolismo oxidativo mitocondrial (Blanchet E *et al.*, 2011). Además, E2F1 estimula el flujo glucolítico regulando la expresión de la fosfofructoquinasa 2 (PFK2) (Darville MI *et al.*, 1995).

Por todo esto, el objetivo de este bloque fue estudiar la posible implicación de hCNT2 en el metabolismo energético, concretamente en el hígado, ya que este órgano es el responsable del mantenimiento de numerosos procesos metabólicos así como de la síntesis de compuestos esenciales. Para ello se escogieron como modelo hepatocitos inmortalizados y células tumorales derivadas de hepatocarcinoma humano.

3.1. Análisis de la actividad de tipo CNT2 en la línea celular no transformada HHL5

Esta línea celular fue generada en el laboratorio del Dr. Arvind H. Patel, de la Universidad de Glasgow, a partir de hepatocitos humanos sanos mediante la inmortalización con virus de leucemia de Moloney y cedida amablemente a nuestro grupo de investigación. Esta línea celular mantiene la expresión de marcadores característicos de hepatocito diferenciado como la albúmina y el citocromo p450, y una baja expresión de marcadores de hepatocito fetal como la AFP (alfa fetoproteína).

Para analizar la actividad de tipo CNT2 de estas células, se llevaron a cabo ensayos de transporte a dos confluencias diferentes y con dos sustratos radiactivos, ya que estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el tipo de actividad de transporte concentrativo de nucleósidos en diferentes líneas celulares puede estar comprometida por la confluencia celular (García-Manteiga J *et al.*, 2003). Por esta razón, sembramos las células a dos densidades

distintas (30.000 y 60.000 células por cm^2) y a las 24 horas post-siembra medimos la actividad de transporte de éstas. Para ello, utilizamos guanosina (sustrato de CNT2 y CNT3) y citidina (sustrato de CNT1 y CNT3), más las inhibiciones cruzadas, que consisten en hacer el ensayo de transporte en presencia del otro nucleósido no marcado radiactivamente a una concentración de 100 μM (figura 1).

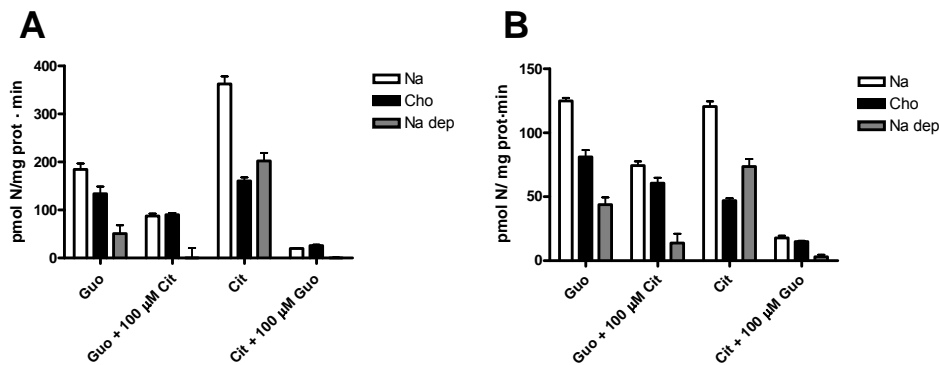


Figura 1. Determinación de la actividad de transporte dependiente de sodio en la línea celular HHL5. A las 24 horas post-siembra se midió la captación de guanosina 1 μM y citidina 1 μM . Las inhibiciones cruzadas se realizaron añadiendo al medio de transporte 100 μM de citidina o guanosina no marcada radiactivamente, en presencia o ausencia de sodio, y el transporte dependiente de sodio se calculó por diferencia de estas dos medidas. **(A)** 30.000 células/ cm^2 y **(B)** 60.000 células/ cm^2 . Los resultados son la media \pm SE de dos experimentos independientes.

De estos resultados se desprende que estas células tienen una actividad dependiente de sodio diferente y de distinta magnitud en función de la confluencia celular. Cuando se sembraron 30.000 células por cm^2 , la actividad que presentaban era de tipo CNT3, ya que observábamos transporte dependiente de sodio tanto de guanosina como de citidina, ambos sustratos de CNT3, y esta actividad dependiente de sodio desaparecía completamente con las inhibiciones cruzadas. En cambio, cuando se sembraron 60.000 células por cm^2 detectábamos actividad dependiente de sodio combinada, de tipo CNT2 y CNT3, ya que cuando inhibíamos el transporte de guanosina con citidina 100 μM quedaba un remanente de actividad dependiente de sodio, debido al transporte mediado por CNT2, ya que este transportador no transporta citidina.

3.2. Análisis de la expresión y actividad de CNT2 en una batería de líneas tumorales (BCLC) derivadas de hepatocarcinoma humano

Las líneas tumorales BCLC fueron establecidas a partir de hepatocarcinomas humanos y gentilmente cedidas por el Dr. Jordi Bruix y la Dra. Loreto Boix, del grupo perteneciente al programa de Oncología Hepática y Gastrointestinal del CIBERehd, del Hospital Clínic-IDIBAPS.

Las 6 líneas tumorales usadas (BCLC1-6), derivan de carcinoma hepatocelular, todas los pacientes presentaban cirrosis hepática y hepatitis C, excepto la línea BCLC-6, que provenía de un paciente con cirrosis por alcoholismo. Todas las líneas expresan las citoqueratinas asociadas a linaje hepatobiliar (CK8+18, CK7 y CK19), así como los antígenos asociadas a células progenitoras (CD133, Oct3/4, Sox2 y Nanog). Todas ellas presentan una morfología epitelial, crecen adheridas al sustrato, aunque son capaces de crecer en suspensión.

En una primera fase se determinó el patrón de expresión de los transportadores de nucleósidos de la familia génica SLC28 y SLC29 para cada una de las 6 líneas tumorales (BCLC). Estas células fueron (figura 2).

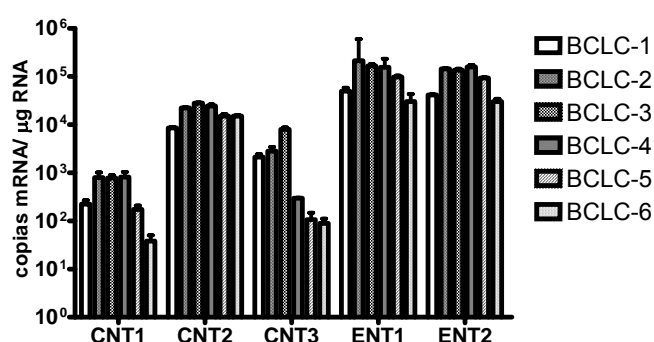


Figura 2. Determinación por *Real time* PCR del número de copias totales de los transportadores de nucleósidos concentrativos (hCNT1, hCNT2 y hCNT3) y equilibrativos (hENT1 y hENT2) para cada una de las 6 líneas de hepatocarcinoma humano BCLCs. Los valores corresponden al promedio de los resultados de la determinación por duplicado \pm SE.

En las 6 líneas celulares se pudo detectar el mRNA de los 5 transportadores de nucleósidos, observándose que presentaban perfiles de expresión distintos entre ellas, siendo CNT2 el transportador de tipo concentrativo más expresado en todas ellas. En cambio para los transportadores equilibrativos la expresión era similar en cada línea.

Una vez establecido el perfil de expresión de los transportadores para cada línea quisimos determinar la actividad basal que presentaban estas células mediante ensayos de transporte. Los ensayos se realizaron utilizando varios sustratos específicos marcados radiactivamente e inhibidores. También se ensayaron a diferentes confluencias y tiempos post-siembra, ya que, como se ha comentado anteriormente, y tal como sucede en la línea celular HHL5 la actividad de transporte puede estar comprometida por la confluencia celular (García- Manteiga J *et al.*, 2003)

Las condiciones escogidas para determinar la actividad de transporte basal de las diferentes líneas celulares fueron: densidades de 20.000, 40.000 y 60.000 células por cm², 24h o 72h post-siembra, tiempo del ensayo de 1 ó 3 minutos de captación y los sustratos fueron guanósina (sustrato de CNT2, CNT3 y ENTs) y uridina (sustrato de todos los transportadores de nucleósidos). Como se observa en la figura 3 ninguna de las líneas celulares presentaba actividad de tipo concentrativo dependiente de sodio en ninguna de las condiciones analizadas. Pese a retener la expresión a nivel de mRNA de todos los transportadores, estas células sólo presentaban un transporte basal de nucleósidos de tipo equilibrativo en cualquiera de las condiciones, ya que no había diferencia en la tasa de transporte en presencia o ausencia de sodio.

La actividad de los transportadores concentrativos parece estar altamente regulada. De hecho, el tratamiento con ácidos biliares, como por ejemplo el ácido taurocólico (TCA), es capaz de aumentar la actividad CNT2 en modelos de hígado de rata enviando la proteína a membrana (Fernández-Veledo *et al.*, 2006). Así mismo, otros estudios realizados también en nuestro laboratorio (datos no publicados) muestran que el tratamiento con IFN α ejerce una regulación a corto plazo sobre la actividad de tipo CNT2 en modelos

celulares derivados de hepatocito humano. Por todo ello, decidimos tratar las distintas líneas de hepatocarcinoma con las mismas condiciones experimentales que se usaron en los modelos de rata y evaluar así, si estas células retenían la proteína hCNT2 en el interior celular, para ver si con estos tratamientos éramos capaces de redistribuirla a membrana.

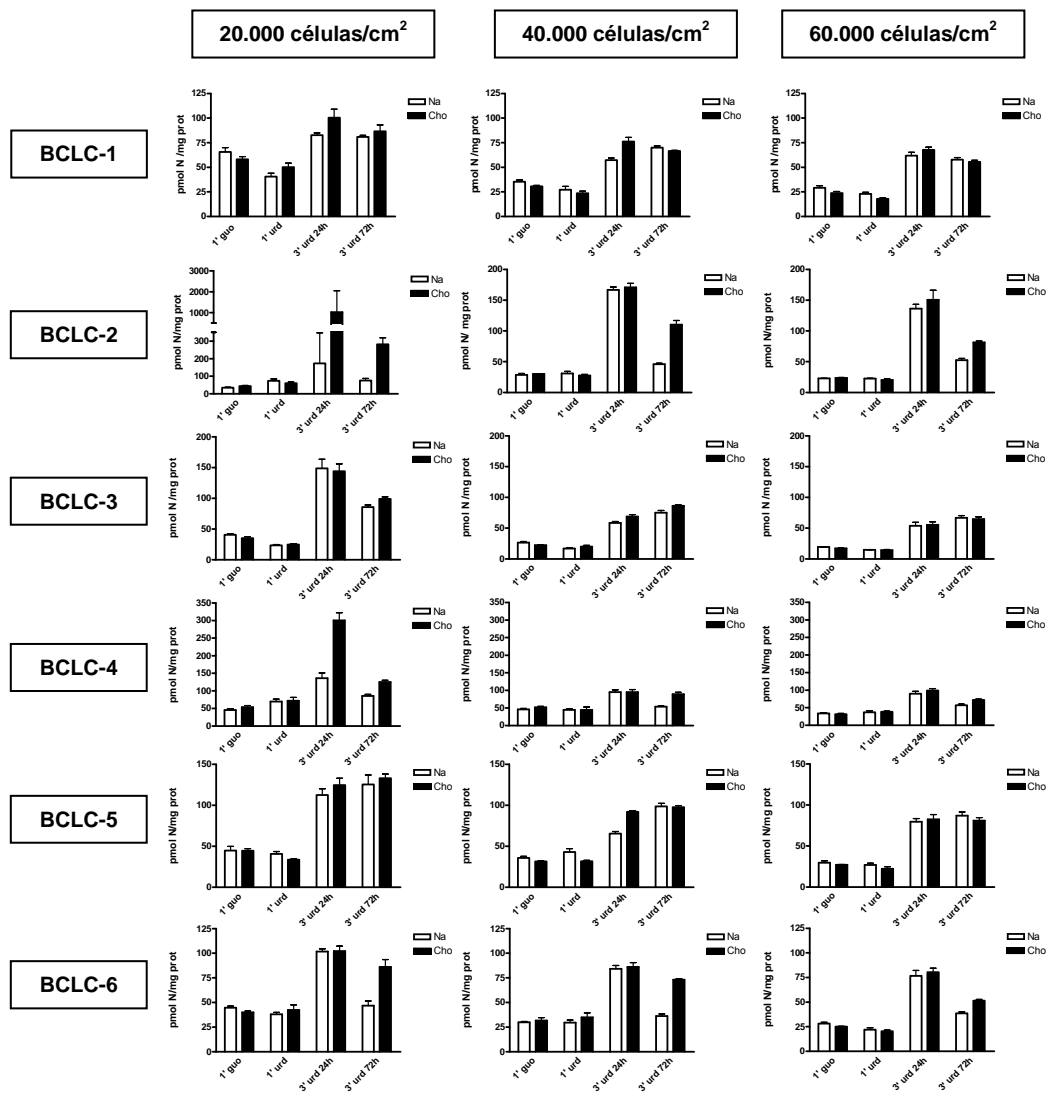


Figura 3. Determinación de la actividad de transporte basal en las diferentes líneas celulares de hepatocarcinoma humano, BCLCs. Se realizaron ensayos de transporte (a 1 y a 3 minutos) a diferentes tiempos post-siembra (24h o 72h post-siembra) y distintas confluencias (siembra de 20.000, 40.000 y 60.000 células/cm²) para cada línea. Se utilizó guanosina 1 μ M (guo, sustrato para ENTs, hCNT2 y hCNT3) y uridina 1 μ M (urd, sustrato para todos los transportadores de nucleósidos) marcados radiactivamente en presencia de sodio (barras blancas) o en ausencia (barras negras). Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SE de dos experimentos independientes.

Para llevar a cabo estos ensayos de transporte, se escogió una única condición experimental ya que no vimos grandes diferencias entre todas ellas en la determinación de la actividad basal. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por cm^2 , se usó uridina $1 \mu\text{M}$ como sustrato radiactivo y se ensayó a 1 minuto de captación.

El tratamiento con ácido taurocólico fue de 1 hora a $250 \mu\text{M}$, previa privación de suero de 2 horas y el tratamiento con IFN α fue de 10 minutos a 300 U/mL en medio completo a las 24 horas post-siembra. Estas condiciones se escogieron en base a la bibliografía (Férrandez-Veledo S *et al.*, 2006) y ensayos previamente realizados en nuestro laboratorio.

Con el fin de estudiar también si el transporte equilibrativo se encontraba regulado por estos tratamientos, los ensayos de transporte además de realizarlos en presencia o ausencia de sodio, se hicieron también, incubando las células con NBTI, inhibidor específico de ENT1 y dipiridamol, inhibidor tanto de ENT1 como de ENT2 (figura 4).

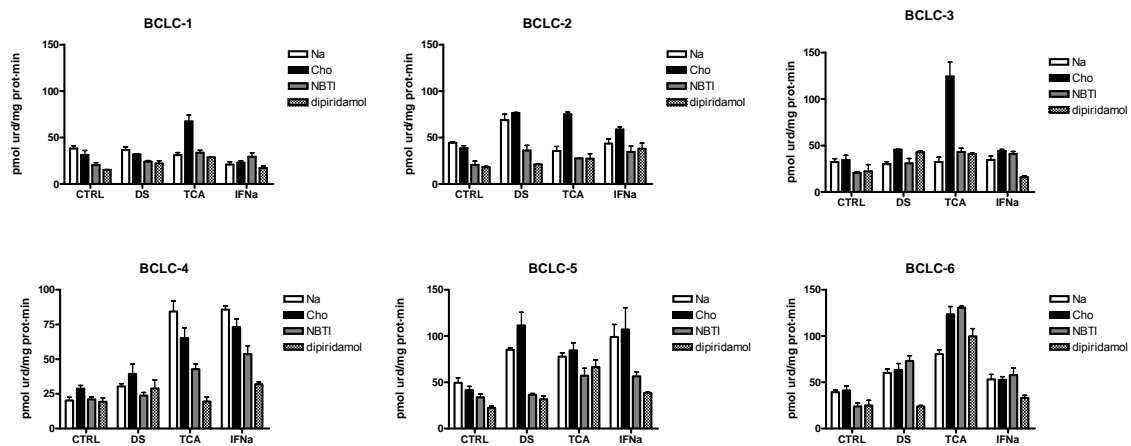


Figura 4. Efecto del ácido taurocólico (TCA) e IFN α sobre la actividad de transporte en las diferentes líneas de hepatocarcinoma humano celulares, BCLCs. Se realizaron ensayos de transporte a un minuto con uridina $1 \mu\text{M}$. Las 6 líneas fueron tratadas 24h post-siembra con TCA durante 1 hora a $250 \mu\text{M}$, previa privación de suero de 2 h, e IFN α durante 10 minutos a 300 U/mL en medio completo. Los ensayos de transporte se hicieron en presencia (barras blancas) o en ausencia de sodio (barras negras), en presencia de NBTI ($1 \mu\text{M}$), inhibidor específico de ENT1 (barras grises), o en presencia de dipiridamol ($10 \mu\text{M}$), inhibidor de ENT1 y ENT2 (barras con cuadrados). Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SE de dos experimentos independientes.

Los resultados mostraron que ninguna de estas líneas celulares de hepatocarcinoma humano presentaba actividad de tipo CNT2 en condiciones basales y tampoco fuimos capaces de inducirla con ninguno de estos dos tratamientos, al igual que sucedió con el resto de transportadores concentrativos (figura 4). Debido a la no disponibilidad de un anticuerpo contra la proteína CNT2 humana no podemos asegurar la ausencia de dicha proteína en estas líneas celulares puesto que todas ellas siguen reteniendo la expresión de su mRNA.

Cabe destacar que sólo conseguimos detectar actividad de transporte concentrativo en la línea HHL5, derivada de hepatocito humano, mientras que en las líneas derivadas de hepatocarcinoma (BCLCs) no fuimos capaces de detectar actividad de tipo CNT. Estos resultados irían en la línea de los observados previamente en los modelos de hepatocarcinogénesis de rata (Dragan Y *et al.*, 2000).

3.3. Restitución de la función CNT2 en aquellas líneas celulares que no lo expresan

La pérdida de expresión y actividad de los transportadores concentrativos y, concretamente de hCNT2, dificulta el estudio de las funciones de este transportador. Con el fin de estudiar su regulación, decidimos generar un vector adenoviral para expresar hCNT2 y poder analizar de este modo los cambios que pudiera provocar en el metabolismo celular.

3.3.1. Generación del adenovirus hCNT2

El proceso seguido para la generación del adenovirus se explica ampliamente en la correspondiente sección de materiales y métodos. En la siguiente figura se muestran, de manera esquemática, los diferentes pasos realizados.

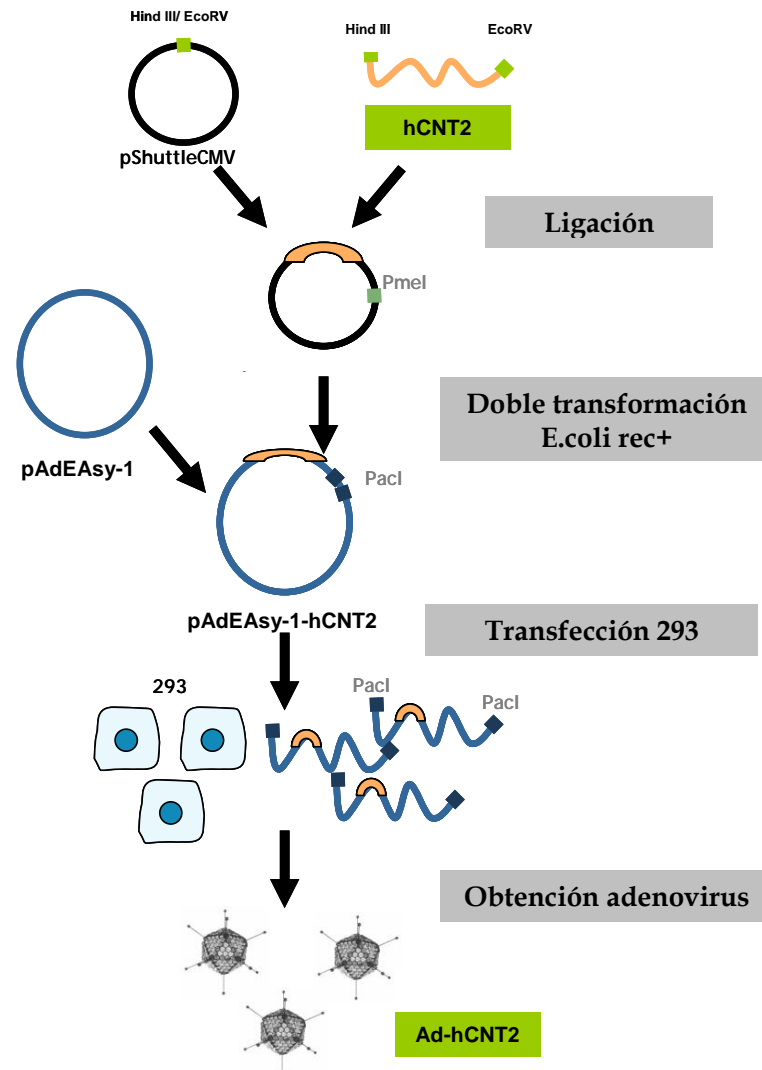


Figura 5. Generación del AdhCNT2. Esquema del proceso de obtención del vector adenoviral.

3.3.2. Efectividad de la infección con AdhCNT2

Una vez generado el adenovirus, lo primero que determinamos fue la funcionalidad del AdhCNT2 mediante el análisis del transporte dependiente de sodio en algunas de las líneas de hepatocarcinoma humano (figura 6). Se escogieron tres de las seis líneas de hepatocarcinoma en base a sus características basales, y que además, presentaran niveles de mRNA diferenciales para los transportadores de nucleósidos. Las líneas celulares escogidas fueron infectadas con diferentes dosis de virus y se determinó la

captación de guanosina (sustrato de CNT2) a un minuto, a las 48 y 72 horas post-infección.

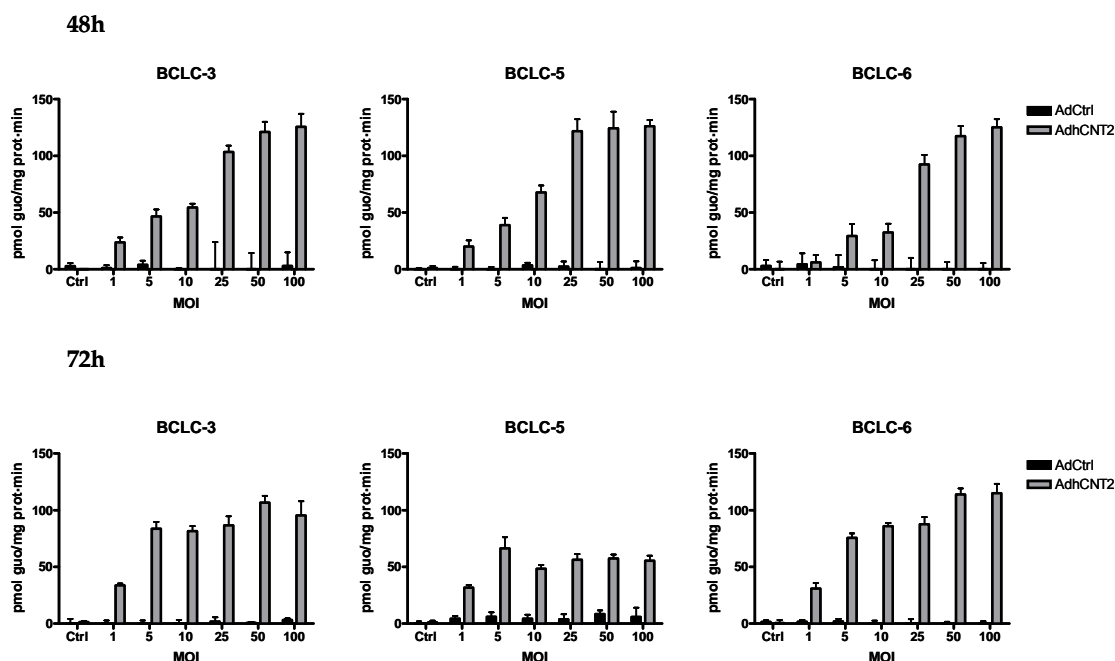


Figura 6. Determinación de la actividad de transporte dependiente de sodio en las líneas infectadas con AdhCNT2. La captación de guanosina 1 μ M se midió en presencia o ausencia de sodio, 48 y 72 horas post-infección con diferentes MOI. El transporte dependiente de sodio se calculó por diferencia de estas dos medidas. AdCtrl (negro) y AdhCNT2 (gris). Los resultados son la media \pm SE de dos experimentos independientes.

Los resultados mostraron un aumento en el transporte dependiente de sodio en todas las líneas analizadas a las 48 horas post-infección, manteniéndose aún a las 72 horas (figura 6). Además, este aumento se correspondía con las dosis del virus utilizadas.

Una vez determinada la capacidad del adenovirus para aumentar el transporte dependiente de sodio de tipo CNT2, analizamos los niveles de mRNA de hCNT2 en estas mismas líneas celulares transducidas con dosis crecientes de virus a las 48 horas post-infección.

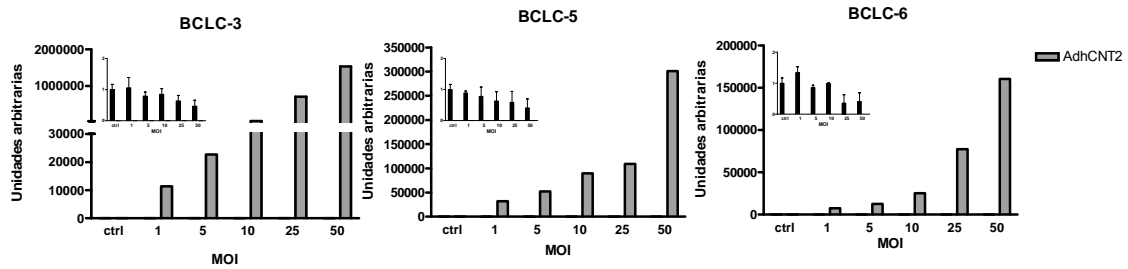


Figura 7. Determinación de los niveles de mRNA de hCNT2 en la líneas celulares infectadas con AdhCNT2 por Real-Time PCR. La extracción de RNA se realizó 48 horas después de la infección con AdhCNT2 (gris) a diferentes MOI. Los valores de C_T obtenidos fueron normalizados respecto al control endógeno (GAPDH). Los niveles de expresión se muestran en unidades arbitrarias, utilizando las líneas celulares sin infectar como control de referencia.

Del mismo modo que en los ensayos de transporte, observamos un aumento del mRNA de hCNT2 dependiente de la dosis del adenovirus usada en las células infectadas con AdhCNT2, mientras que los niveles del transportador no variaron en las células transducidas con el AdCtrl (figura 7).

3.3.3. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 sobre el ciclo celular

En nuestro laboratorio ya se habían generado y caracterizado los vectores adenovirales para expresar los transportadores hENT1 y hCNT1, observándose en ambos casos que la sobreexpresión de dichos transportadores de nucleósidos provocaba cambios en el perfil del ciclo celular de las células infectadas con éstos. La sobreexpresión de hENT1 provoca de manera clara una disminución en la fase G_1 y un incremento concomitante de las células en la fase G_2 , de manera dependiente de dosis en las células NP-9 y NP-29 (Pérez-Torras S *et al.*, 2008). En cambio, el AdhCNT1 provoca, también de manera dependiente de dosis, un aumento de las células en la fase S en las mismas líneas celulares, NP-9 y NP-29 (Pérez-Torras S *et al.*, 2013). Por esta razón decidimos estudiar el perfil de ciclo celular que presentaban las células al restituir la función de hCNT2 mediante el vector adenoviral. Para ello, infectamos las tres líneas

celulares escogidas a 10 MOI, y a las 48 horas post-infección se realizó el marcaje con yoduro de propidio.

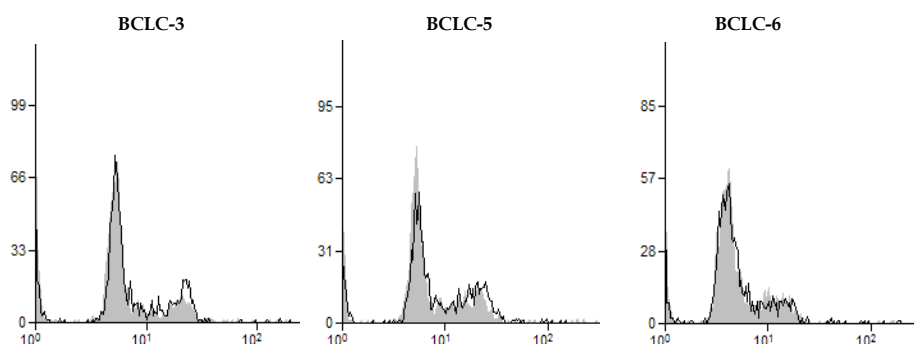


Figura 8. Análisis del perfil del ciclo celular de las líneas celulares infectadas con AdhCNT2. Las células de hepatocarcinoma humano se infectaron con 10 MOI del AdhCNT2 y a las 48 horas post-infección se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo. Resaltado en negro se muestra el perfil de las células infectadas con AdCtrl y en gris con AdhCNT2. Se muestra un perfil de ciclo celular representativo de dos experimentos independientes.

Como se observa en la figura 8, a diferencia de los efectos observados con los vectores adenovirales para hENT1 y hCNT1, la sobreexpresión de hCNT2 no provocaba ningún cambio en el perfil del ciclo celular de estas células.

3.4. Efecto de la inhibición de la ciclina Cdk4 con el inhibidor PD0332991 sobre los transportadores de nucleósidos en un modelo *in vivo*

Como se ha comentado en la introducción, recientemente se ha descrito el nuevo papel que ejercen en el control del metabolismo los reguladores del ciclo celular, del eje Cdk4-pRB-E2F1. Se ha visto que estos reguladores del ciclo celular pueden ser buenos candidatos como sensores de señales externos que requieren una respuesta metabólica específica (Fajas L, 2013). La fina regulación del ciclo celular es de suma importancia, ya que la pérdida de control puede desencadenar enfermedades como la obesidad, diabetes y cáncer. La progresión de G₁ a S es un punto clave en el control de la protección de la célula ante la replicación anormal. La regulación de esta transición la llevan a cabo un

conjunto de quinasas dependientes de ciclina (Cdks) y ciclinas. Las Cdks son un subgrupo de serina/treonina quinasas que juegan un papel clave en la regulación de la progresión del ciclo celular mediante la asociación a ciclinas. Así, la hiperfosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb), producto del gen RB1, ocurre en la fase temprana de G₁ por Cdk4 y Cdk6 interactuando con la ciclina D1, lo que provoca la liberación de factores de transcripción E2F que permiten la progresión del ciclo celular a la fase S. El inhibidor PD0332991 es específico de Cdk4 y Cdk6 e impide la fosforilación de la proteína de retinoblastoma y por consiguiente la transición a fase S (Finn RS *et al.*, 2009).

Dado que en nuestro laboratorio habíamos descrito la existencia de una relación entre el ciclo celular y la expresión de los transportadores de nucleósidos (Ruiz-Montasell B *et al.*, 1993; Felipe A *et al.*, 1997; Valdés R *et al.*, 2002; Pérez-Torras S *et al.*, 2008; Pérez-Torras S *et al.*, 2013), nos pareció de sumo interés estudiar los niveles de mRNA de los transportadores de nucleósidos y de dos enzimas del metabolismo de nucleótidos, en un modelo *in vivo* de ratones tratados con PD0332991, un inhibidor específico de la Cdk4. Como primera aproximación, realizamos la determinación en unas muestras de distintos tejidos obtenidas en el laboratorio del Dr. Lluís Fajas del Departamento de Fisiología de la Universidad de Lausanne.

Para determinar si los transportadores de nucleósidos están bajo control del eje Cdk4-pRB-E2F1, se realizó el estudio en ratones de 9 semanas que habían sido tratados durante 3 días con el inhibidor PD0332991 a dosis de 20 mg/kg ó 50 mg/kg, con previo ayuno de 24 horas o realimentados durante 8 horas y sacrificados al cuarto día. Se escogieron estas dos condiciones experimentales (ayuno y realimentación) para descartar un efecto provocado por la insulina ya que se ha demostrado que E2F1 está involucrado en el control de su secreción (Fajas L *et al.*, 2010).

Se analizó en hígado, tejido adiposo marrón y gastrocnemio por *Real Time* PCR los niveles de mRNA de los transportadores de nucleósidos y dos enzimas del metabolismo de nucleótidos, PRAT (amidofosforibosiltransferasa) y CAD (carbamil-aspartato-dihidroorotasa), involucradas en la síntesis *de novo*

de purinas y pirimidinas, respectivamente. Aunque no se muestre en la figura también se analizó la expresión de CNT3, pero no se representa en las gráficas porque sus valores de C_T eran muy elevados y poco precisos en todas las condiciones experimentales en el hígado, y no se detectó su expresión ni en tejido adiposo marrón ni en gastrocnemio.

Los resultados, aunque preliminares, muestran una disminución de los niveles de mensajero de CNT2 y ENT1 en todos los tejidos y condiciones analizadas, si bien estos no son significativos. También se observa una disminución de ENT2 y CNT1, esta vez sí significativa, en hígado de animales realimentados tratados con el inhibidor a 20 y 50 mg/kg, respectivamente (figura 9B y 9C). No obstante, aunque no se observa una compensación clara en las enzimas de síntesis *de novo* de nucleótidos, sí que parece haber una ligera tendencia a aumentar PRAT, involucrada en síntesis de purinas en aquellos tejidos donde disminuye CNT2. De todos modos, aunque esperanzadores, estos resultados deberían ser confirmados aumentando el número de animales y hacer ensayos a nivel funcional para ver si esta modulación se traduce en cambios en la actividad de los transportadores. Los factores de transcripción E2F son reguladores versátiles que participan en la modulación de distintas funciones biológicas. El análisis del promotor de hCNT2 podría ser de gran ayuda para determinar si existen elementos de respuesta a los factores de transcripción E2F, pudiendo responder directamente a los cambios producidos.

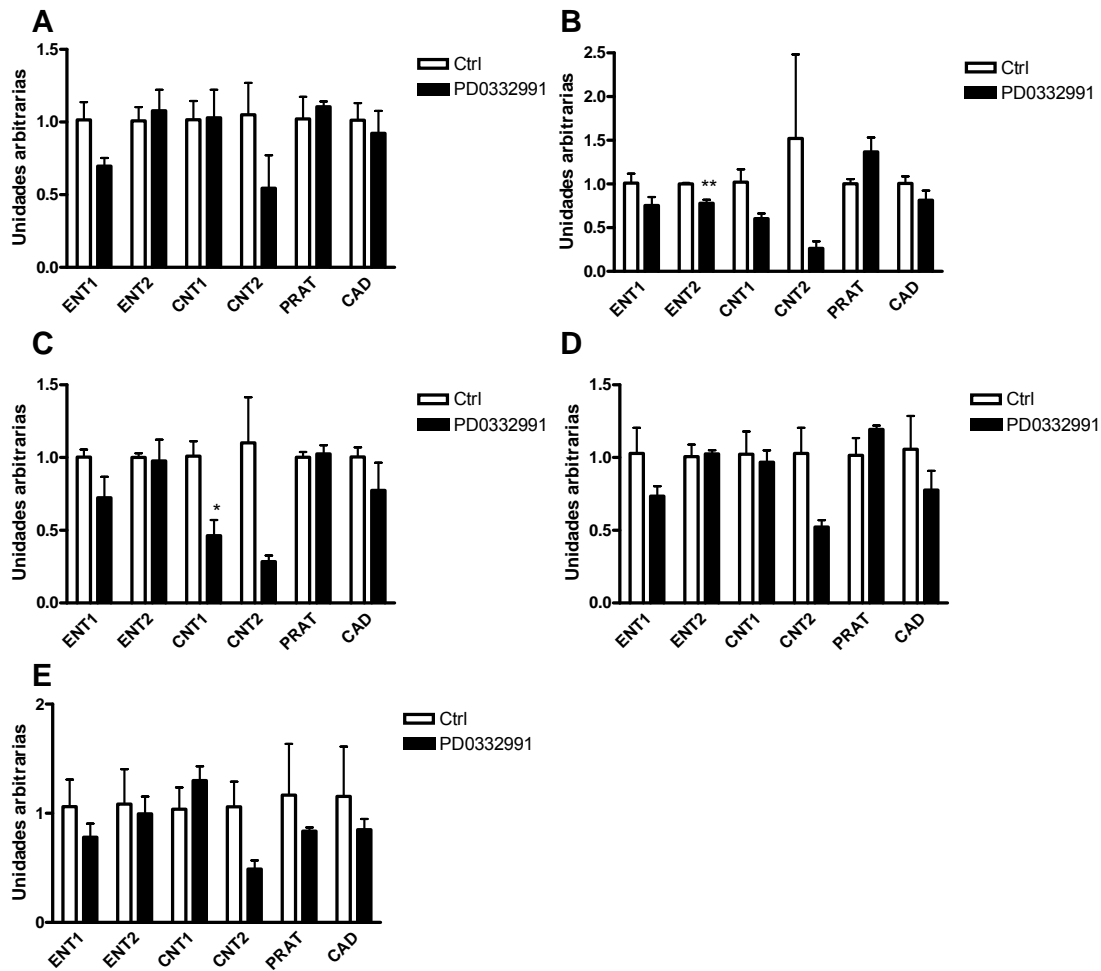


Figura 9. Determinación de los niveles de mRNA de diferentes transportadores de nucleósidos y de las enzimas PRAT y CAD en ratones tratados con el inhibidor de Cdk4, PD0332991 mediante *Real Time PCR*. Análisis del mRNA en ratones tratados 3 días con PD0332991 a 20 mg/kg en hígado (A) previo ayuno de 24h y (B) realimentados durante 8h. (C) Análisis del mRNA en hígado de animales realimentados durante 8 horas pero tratados con PD0332991 a una dosis de 50 mg/kg. Análisis del mRNA en animales tratados 3 días con PD0332991 20 mg/kg previo ayuno de 24 h en (D) tejido adiposo marrón y (E) gastrocnemio. Los valores de C_T obtenidos han estado normalizados respecto al control endógeno (GAPDH). Los niveles de expresión se muestran en unidades arbitrarias, utilizando los animales tratados sólo con vehículo como control de referencia (Ctrl). Los resultados son la media \pm SE de tres animales. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

3.5. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 sobre el metabolismo energético

Curiosamente, el ratón *knock-out* para el transportador ENT1 no sólo es viable, sino que presenta un fenotipo de alteración metabólico. Este modelo fue

generado y preliminarmente caracterizado por el Dr. Doo-Sup Choi de la Clínica Mayo en Rochester (USA), aunque su fenotipo sigue siendo objeto de estudio. Este ratón presenta algunas anormalidades neuronales, un peso inferior y una reducida respuesta tanto hipnótica como atáxica al etanol, además de un mayor consumo de alcohol comparado con el ratón de tipo *wild type*. Estos hechos están asociados a una reducción de los niveles de adenosina y del receptor de adenosina A₁ (Choi DS *et al.*, 2004).

En nuestro laboratorio se ha estado trabajando con este modelo animal, estudiando la expresión de los transportadores de nucleósidos y genes que codifican para proteínas implicadas en la síntesis *de novo* de nucleótidos, en los diferentes tejidos tanto del ratón *wild type* como en el ratón ENT1-KO, para determinar si existe algún tipo de compensación. Los resultados obtenidos mediante microarray, comparando hígados de *wild type* y KO, nos han permitido determinar un gran número de genes que codifican proteínas implicadas en distintas rutas del metabolismo, y se encuentran expresadas diferencialmente en el ratón ENT1-KO. De hecho, una de las hipótesis iniciales de trabajo era que CNT2 podría compensar de alguna forma la falta de ENT1 en estos ratones. Además, en las muestras de ratones tratados con el inhibidor de Cdk4/6 parece que ENT1 podría tener una regulación similar a CNT2, ya que sus niveles también disminuyen. Todo ello nos llevó a analizar, en las líneas de hepatocarcinoma a las que se les restituía hCNT2, qué sucedía en la expresión de un grupo de enzimas del metabolismo que se veían alteradas en el ratón ENT1-KO. Las enzimas escogidas estaban relacionadas con glucólisis y sistema OXPHOS.

- Enzimas relacionadas con la glucólisis:

TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulador*), gen de inducción rápida en respuesta al daño al DNA, tiene función fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2). La función de la FBPasa-2 es disminuir los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato y así inhibir la glucólisis.

GLUT2 (*Glucose transporter 2*), es una proteína transmembrana que media la entrada pasiva de glucosa codificado por el gen SLC2A2. Se expresa en hígado y en células beta de páncreas. En el hígado retira el exceso de glucosa de la sangre y en páncreas regula la secreción de insulina.

PKLR (*pyruvate kinase, liver and RBC*), es una de las tres enzimas limitantes de la velocidad en la glucólisis. Cataliza la transferencia de un grupo fosfato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP, produciendo una molécula de ATP y una molécula de piruvato.

DLAT (*dihydrolipoamide S-acetyltransferase*), este gen codifica para la componente E2 de la multienzima PDC (complejo de la piruvato deshidrogenasa). PDC reside en la membrana mitocondrial interna y cataliza la conversión de piruvato a acetil coenzima A. La dihidrolipoamida acetiltransferasa, acepta grupos acetilo formados por la descarboxilación oxidativa del piruvato y los transfiere a la coenzima A.

PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1*), es la proteína responsable de la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa (PDH), e inactivarla. La PDH es un complejo multienzimático mitocondrial que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato. Es una de las principales enzimas responsables de la vía glucolítica en mamíferos acoplado al sistema OXPHOS. Su actividad enzimática se regula por un ciclo de fosforilación/desfosforilación.

- Enzimas relacionadas con el sistema OXPHOS:

MT-CYB (*mitochondrial cytochrome b*), codifica para una subunidad de la proteína de la cadena respiratoria ubiquinol citocromo c reductasa (complejo III) cataliza la oxidorreducción de los componentes móviles redox ubiquinol y citocromo c, generando un potencial electroquímico vinculado a la síntesis de ATP.

SCO2 (*cytochrome oxidase deficient homolog 2*), es una de las 13 subunidades estructurales que conforman la citocromo c oxidasa (COX) (complejo II), ésta cataliza la transferencia de equivalentes de reducción de

citocromo c al oxígeno molecular y bombas de protones a través de la membrana mitocondrial interna, oxidando el succinato a fumarato.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la introducción de hCNT2 sobre el metabolismo celular, infectamos las tres líneas de hepatocarcinoma humano con AdCtrl y AdhCNT2 a 10 MOI, a las 48 horas se extrajo el RNA y realizamos el análisis de los genes mencionados por *Real Time PCR* (figura 10).

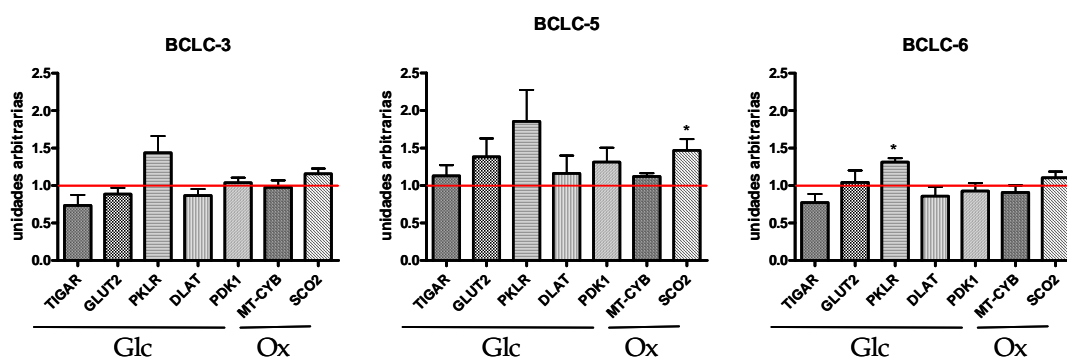


Figura 10. Determinación de los niveles de mRNA de diferentes proteínas implicadas en el metabolismo celular en las líneas celulares infectadas con AdhCNT2 (10 MOI). Las enzimas están agrupadas según la ruta metabólica a la que pertenecen. **Glc:** glucolisis, **Ox:** sistema oxphos y **RG:** reguladores generales. A las 48 horas de la infección se realizó la extracción de RNA. Los valores de C_T obtenidos fueron normalizados respecto al control endógeno (GAPDH). Los niveles de expresión se muestran en unidades arbitrarias, utilizando las líneas celulares infectadas con AdCtrl como control de referencia. Los resultados son la media \pm SE de tres experimentos independientes. La significatividad estadística está valorada mediante la *t-Student*, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al control.

La infección con el AdhCNT2 provoca en todas las líneas, aunque con distinto grado de expresión, un aumento de la expresión del mRNA de PKLR y SCO2, siendo significativo siempre en algunas de las líneas celulares. En cambio, para el resto de genes, observamos comportamientos distintos debido a la infección con AdhCNT2. La expresión de TIGAR disminuye en dos de ellas, mientras que en BCLC-5 parecería presentar una tendencia a aumentar. PDK1 parece aumentar en BCLC-5, mientras que en las otras dos líneas de hepatocarcinoma los niveles de mRNA de PDK1 se mantienen igual con la infección.

En líneas generales no se observan grandes cambios en la expresión de las enzimas analizadas. Aunque, estos parecen indicar una tendencia a potenciar la vía glucolítica y el sistema OXPHOS. Si bien, se debería analizar la actividad de las enzimas o sus productos, para determinar el estado de estas vías.

3.5.1. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 en la respiración celular

Como ya se ha comentado anteriormente, una de las características de las células tumorales es la alteración en su metabolismo intermediario. Este cambio metabólico, el efecto Warburg, que les confiere una ventaja para su supervivencia, fue una de las primeras características reconocidas en las células tumorales. Así, la mayoría de las células cancerosas utilizarían preferentemente las vías glucolíticas para la generación de energía, regulando negativamente la actividad respiratoria aeróbica. Como se ha comentado en la introducción, la inhibición de la glucólisis también se logra por la activación transcripcional dependiente de p53 de la SCO2 (síntesis de citocromo C oxidativo 2), lo que resulta en una mayor respiración mitocondrial (Matoba S *et al.*, 2006). Basándonos en nuestra hipótesis inicial de trabajo, en la que hCNT2 podría contribuir de algún modo a la reversión del fenotipo metabólico tumoral, y dado que SCO2 es una de las proteínas que había mostrado un aumento en sus niveles de mRNA al restituir hCNT2 en las líneas de hepatocarcinoma, nos propusimos cuantificar el consumo de oxígeno en células infectadas con AdhCNT2.

Para caracterizar el metabolismo celular se midió la tasa de consumo de oxígeno (OCR, *oxygen consumption rate*) de la línea BCLC-3 infectada a 10 MOI con AdCtrl y AdhCNT2, respectivamente, a las 72 horas post-infección, mediante el sistema *XF24 Extracellular Flux Analyxzer* (Seahorse Biosciences). Se realizó un protocolo estándar, detallado en el apartado de materiales y métodos, que mediante la adición sucesiva de distintos compuestos, permitió analizar la respiración celular en los distintos estados descritos detalladamente en el

apartado de materiales y métodos (6.1). Todos los compuestos utilizados son permeables a la membrana plasmática. En la situación más fisiológica, respiración de rutina (R), las células consumen oxígeno a partir de la oxidación de los sustratos presentes en el medio de cultivo. El primer compuesto que se añade es la oligomicina, inhibidor de la ATP sintasa, obteniéndose la respiración no destinada a la síntesis de ATP o *proton leak* (L). En segundo y tercer lugar añadimos el desacoplador FCCP, en dosis crecientes, que estimula la respiración a la capacidad máxima del sistema de transporte electrónico (E). Las concentraciones de FCCP fueron optimizadas en experimentos previos, ya que en función de la línea celular y de la confluencia varía considerablemente. Por último se añade rotenona y antimicina A, inhibidores del complejo I y del complejo III de la cadena respiratoria, respectivamente, obteniendo la respiración no mitocondrial (rox o *residual oxygen consumption*).

La tasa de consumo de oxígeno de las células BCLC-3 infectadas con AdCtrl respecto a las células infectadas con AdhCNT2 se midieron en dos experimentos independientes. La figura 11 muestra los resultados obtenidos de estos ensayos.

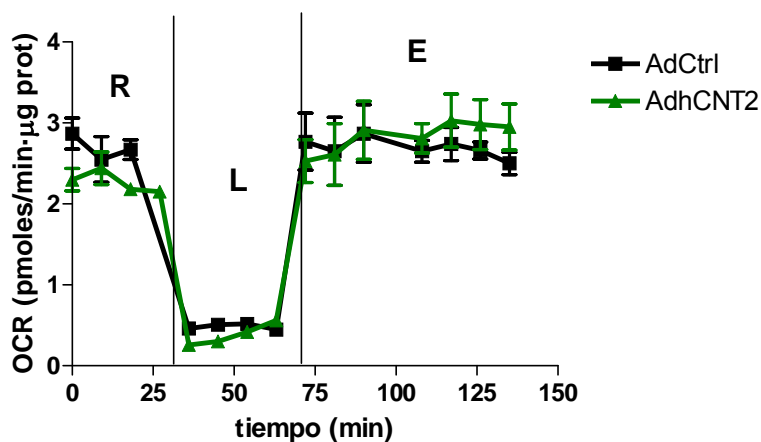


Figura 11. Determinación del consumo de oxígeno en la línea celular BCLC-3 infectada con AdhCNT2 (10 MOI). Se midió la tasa de consumo de oxígeno de las células BCLC-3 transducidas con AdCtrl (negro) y de las células BCLC-3 que sobreexpresan la proteína hCNT2 (verde) en los diferentes estados respiratorios: rutina (R), *proton leak* (L) y capacidad máxima del sistema de transporte de electrones (E). Para todos los estados que se representan en la gráfica se les ha restado la respiración no mitocondrial (rox). Los resultados son la media ± SE de dos experimentos independientes, cada uno con 10 réplicas por condición.

Las células infectadas con el adenovirus control presentaban una respiración en rutina de 2.7 ± 0.30 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína. Al inhibir el complejo V la respiración disminuyó a 0.48 ± 0.08 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína, el desacoplamiento con FCCP estimuló la respiración hasta 2.6 ± 0.29 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína, estos resultados indican que estas células en estado de rutina ya están trabajando a respiración máxima (figura 11, en negro). Los valores que se han descrito y representado, son después de haberles extraído el consumo de oxígeno no mitocondrial después de añadir rotenona y antimicina A, que para estas células fue de 1.4 ± 0.40 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína.

Los valores obtenidos para las células BCLC-3 transducidas con AdhCNT2 eran ligeramente distintos en los diferentes estados. Estas células presentaban una respiración en rutina de 2.2 ± 0.15 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína. Al añadir la oligomicina la respiración disminuyó a 0.29 ± 0.05 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína, y el desacoplamiento con FCCP estimuló la respiración hasta 2.9 ± 0.5 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína, estos resultados indican que estas células todavía pueden trabajar algo más que en rutina, no están trabajando a respiración máxima (figura 11, en verde). Lo mismo que para las células infectadas con AdCtrl estos valores corresponden a la diferencia después de haberles extraído el consumo de oxígeno no mitocondrial después de añadir rotenona y antimicina A, que para estas células fue de 0.59 ± 0.12 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína. Cabe destacar que las células que sobreexpresan hCNT2, a pesar de no presentar grandes cambios en la respiración celular, presentan cambios sensibles en el valor de rox, valor correspondiente a la respiración no mitocondrial. En las células control es de 1.4 ± 0.40 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína y en las células infectadas con hCNT2 de 0.59 ± 0.12 pmol O_2 /min \cdot μ g proteína.

En la siguiente tabla se muestran los valores de los diferentes *Flux Control Ratios* descritos en el apartado de materiales y métodos 6.1., calculados a partir de los valores de consumo de oxígeno mitocondrial (tabla 1).

	AdCtrl	AdhCNT2
UCR (E/R)	0.96 ± 0.09	1.23 ± 0.07
R/E	1.05 ± 0.10	0.81 ± 0.05
RCR (E/L)	5.16 ± 1.50	7.42 ± 0.84
L/E	0.20 ± 0.06	0.14 ± 0.02
RCR _p ((R-L)/E)	0.85 ± 0.04	0.68 ± 0.03

Tabla 1. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 en los diferentes *Flux Control Ratios*. Valores calculados de dos experimentos de respirometría entre las células BCLC-3 infectadas con AdCtrl y AdhCNT2, respectivamente. Los resultados son la media ± SE de dos experimentos independientes.

Los resultados obtenidos para la *Routine Flux Control Ratio* (R/E), si los expresamos en porcentaje, indican que las células BCLC-3 control en rutina ya están al 100% de la capacidad máxima respiratoria, en cambio las células infectadas con AdhCNT2 parece que todavía presentan una pequeña capacidad respiratoria de reserva respecto al consumo en condiciones fisiológicas (80%). Por otro lado, los valores obtenidos en las células que sobreexpresan hCNT2 para el *Leak Control Ratio* (L/E), es decir, estas células utilizan un 6% menos en la producción de ATP, y los valores para el *Phosphorylation Respiratory Control Ratio* (RCR_p), que significa que la respiración no acoplada a la síntesis de ATP también se ve disminuida en un 17%.

3.5.2. Efecto de la sobreexpresión de hCNT2 sobre la producción de lactato y ATP intracelular

La producción de lactato y la concentración del ATP intracelular permiten evaluar la glucólisis y el estado energético de la célula. En la figura 12 se muestra la producción de lactato en las tres líneas de hepatocarcinoma humano infectadas con AdhCNT2 10 MOI. La producción de lactato se midió a las 48 horas y a las 72 horas post-infección, pero cambiando el medio a las 24 y 42 horas post-infección, respectivamente, para intentar maximizar las diferencias en la producción de lactato, ya que según los resultados de transporte las condiciones máximas de expresión se producen a las 48 horas.

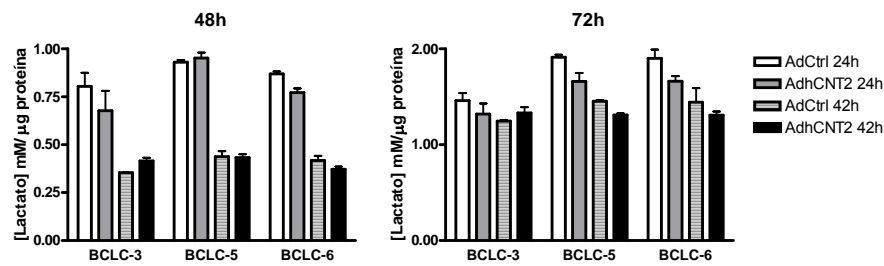


Figura 12. Producción de lactato en las líneas celulares infectadas con AdhCNT2 (10 MOI). El medio se cambió 24h o 42h post-infección y se recogió el sobrenadante para las medidas de lactato a 48 y 72h post-infección. Los resultados son la media \pm SE de un experimento independiente, analizado por triplicado.

En la figura 12 se observa que tanto BCLC-5 como BCLC-6 tienen un comportamiento muy similar, y que a las 72 horas post-infección parece existir una tendencia a la menor producción de lactato cuando se restituye hCNT2.

De manera muy preliminar quisimos determinar la concentración de ATP intracelular, en las mismas condiciones que se habían llevado a cabo para medir la producción de lactato, aunque sólo a las 48 horas post-infección. En las células en las que se cambió el medio a las 24 horas post-infección, no parece haber cambios claros en la concentración de ATP (figura 13A). En cambio, cuando se cambió el medio a las 42 horas post-infección, aún siendo datos muy preliminares, se observó un ligero aumento en las células infectadas con AdhCNT2 respecto a las células infectadas con AdCtrl, más evidente en alguna de las líneas BCLCs. Cabe destacar, que aunque preliminares, estos resultados se correlacionan con la disminución en la producción de lactato observado en las mismas condiciones.

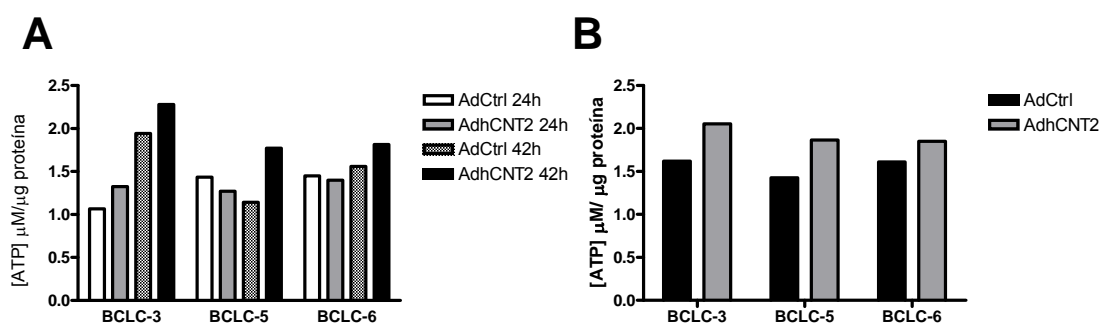


Figura 13. Determinación del ATP intracelular en las líneas celulares infectadas con AdhCNT2 (10 MOI). (A) El medio se cambió 24h o 42h post-infección y la medida de ATP se realizó 48h post-infección. (B) Se incubaron las células infectadas a las 48 horas post-infección con fructosa 5 mM, y se midió la concentración de ATP a las 2 horas. Se muestra el resultado obtenido de un único experimento.

En la figura 13B, se muestra un experimento también de la determinación de la concentración de ATP intracelular, en células infectadas con los dos vectores adenovirales, donde a las 48 horas post-infección, se les cambió el medio y se añadió fructosa 5 mM al medio completo como sustrato glucolítico durante dos horas, tiempo al que se realizó la medida de ATP. En estas condiciones se observó un aumento de la concentración de ATP en todas las células infectadas con AdhCNT2.

3.5.3. Metabolómica

Para caracterizar mejor el posible papel modulador de hCNT2 en el metabolismo celular, realizamos un estudio preliminar de metabolómica en dos líneas de hepatocarcinoma, BCLC-3 y BCLC-5, a las 48 horas post-infección con una dosis de adenovirus de 10 MOI. El estudio se llevó a cabo con 20 muestras, haciendo quintuplicados para cada condición, BCLC-3 y BCLC-5 infectadas con AdCtrl y BCLC-3 y BCLC-5 infectadas con AdhCNT2.

El estudio de los perfiles metabólicos se realizó mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (UPLC®-MS). La espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (UPLC-MS) se adapta bien a este tipo de análisis, debido a su alta sensibilidad, gran cobertura en las diferentes clases de

metabolitos, alta capacidad de rendimiento, y una amplia gama dinámica. En este estudio, también se realizaron varios análisis estadísticos para estudiar las diferencias metabólicas entre los grupos de muestras.

Una vez normalizadas las muestras por su contenido proteico, se realizó un estudio de modelo multivariante de PCA (*Principal Component Analysis*), buscando diferencias entre las células a las que se les había introducido hCNT2 y las controles. Aunque el objetivo del estudio no fuera comparar las dos líneas celulares, es clara la separación entre ellas y a su vez, diferentes entre las células infectadas con AdhCNT2 respecto de las AdCtrl en ambas líneas (figura 14).

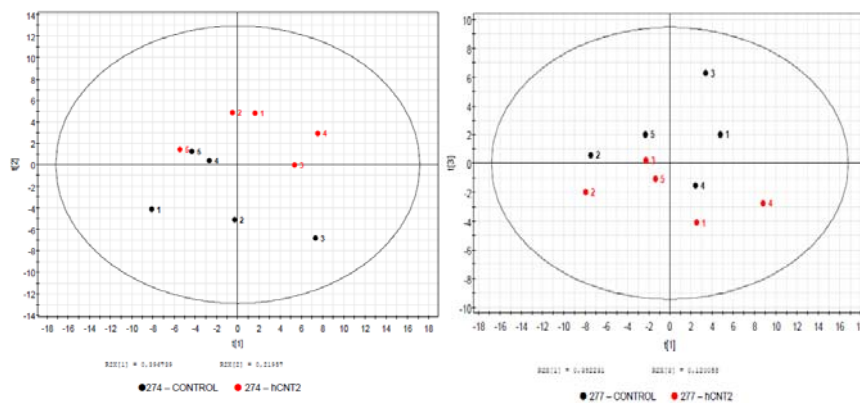


Figura 14. Modelo PCA de las BCLC-3 y BCLC-5 infectadas con AdhCNT2. En la izquierda se muestra el modelo para BCLC-3 y a la derecha para BCLC-5, infectadas con AdhCNT2 (rojo) o con AdCtrl (negro).

Los análisis estadísticos univariantes se llevaron a cabo calculando los porcentajes de cambio de los grupos y el valor p de la *t-Student*. En la siguiente figura se muestra el *Heatmap* individualizado para cada línea celular representado por grupos de metabolitos. Se muestra la comparación entre las células infectadas con AdCtrl respecto AdhCNT2. En una gradación de colores se muestra el logaritmo de los factores de cambio (*fold change*) para cada metabolito, y en gris se señalan los cambios que son significativamente estadísticos.

En líneas generales, para las células BCLC-3 transducidas con AdhCNT2 se encontró que varios nucleótidos (CMP, dCMP, CTP, dAMP, cAMP y GMP) y todos los carbohidratos, excepto la fructosa-1,6-bis-P, estaban disminuidos. Para

el caso de las BCLC-5, la restitución de hCNT2, mostró también niveles más altos de fructosa-1,6-bis-P, así como de, N-acetilneuraminico (NANA) e IMP. Además, los niveles de algunos nucleótidos, como CMP, dCMP, CTP y dAMP, estaban disminuidos. También se observaron cambios en los niveles de fosfoenolpiruvato, γ -glutamil cisteína y propionil-CoA, que también se encontraban disminuidos.

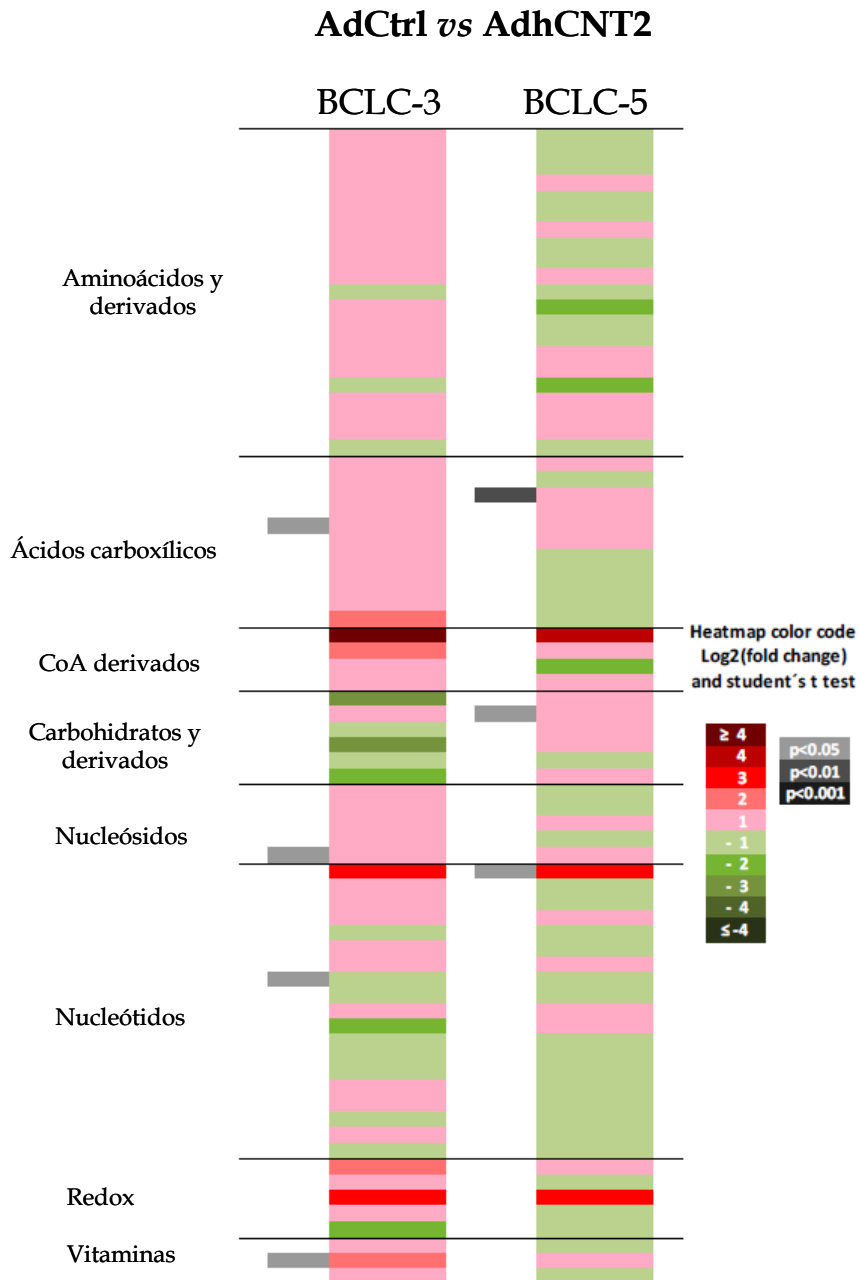


Figura 15. Representación del Heatmap de las dos líneas celulares comparando AdCtrl respecto AdhCNT2. Los diferentes colores representan los factores de cambio. Las líneas en gris denotan los cambios significativos de metabolitos individuales aplicando la *t-Student*.

Cabe destacar que para las dos líneas estudiadas, se observaron en ambas comparaciones que los niveles de CMP, dCMP, CTP y dAMP disminuían en las células que sobreexpresaban hCNT2 (figura 16).

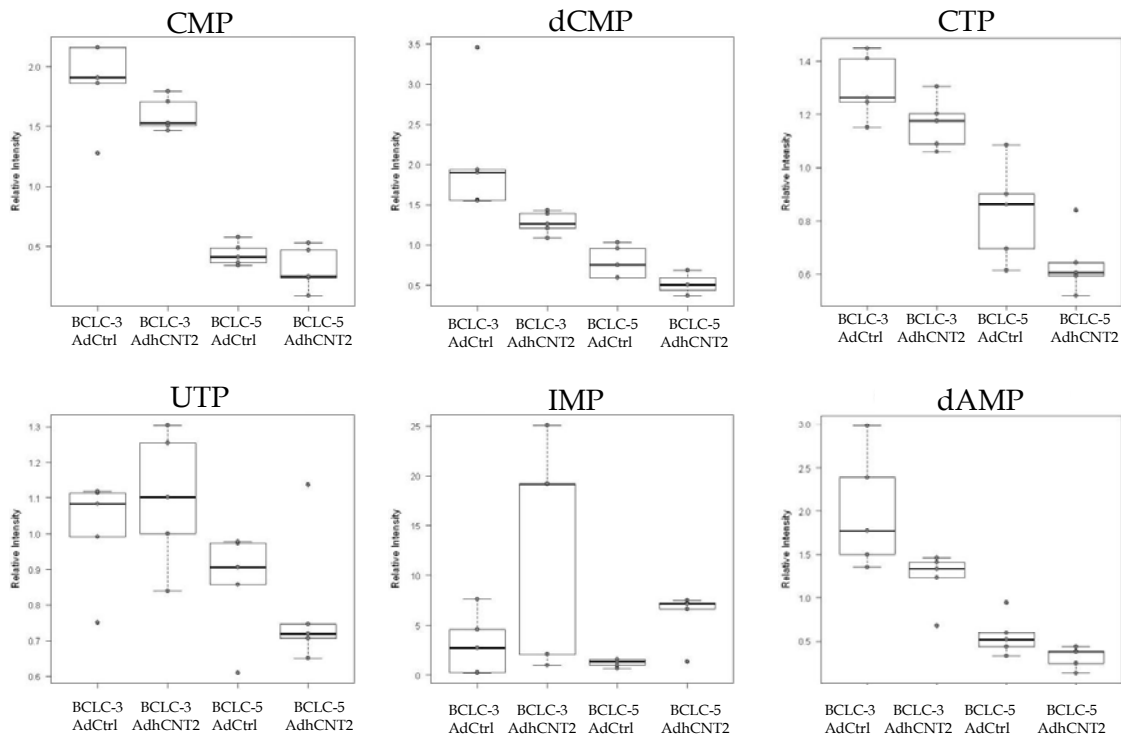


Figura 16. Niveles de distintos nucleótidos. Representación gráfica de los niveles relativos de los distintos nucleótidos analizados a las 48 horas post-infección en las líneas BCLC-3 y BCLC-5 con 10 MOI de AdCtrl y AdhCNT2.

De todos modos, a pesar que el análisis de modelo multivariante PCA proporciona casi una perfecta agrupación entre las células control y las células infectadas para ambas líneas celulares, pocos metabolitos fueron estadísticamente significativos en el análisis univariado (*t-Student*), aunque sí se observaron tendencias globales, probablemente informativas.

Globalmente los resultados obtenidos, nos permiten hipotetizar un modelo en el que la restitución de la proteína hCNT2 en líneas derivadas de hepatocarcinoma, estaría induciendo la vía glucolítica y el sistema OXPHOS (figura 17). Dado que, observamos un aumento de la expresión de la piruvato quinasa (PK), así como de los metabolitos fructosa-1,6-bis-P y acetyl-CoA,

observándose también, una menor producción de lactato. El aumento en la capacidad respiratoria y el incremento en la expresión de SCO2, parecerían apuntar a un metabolismo más acoplado al sistema OXPHOS.

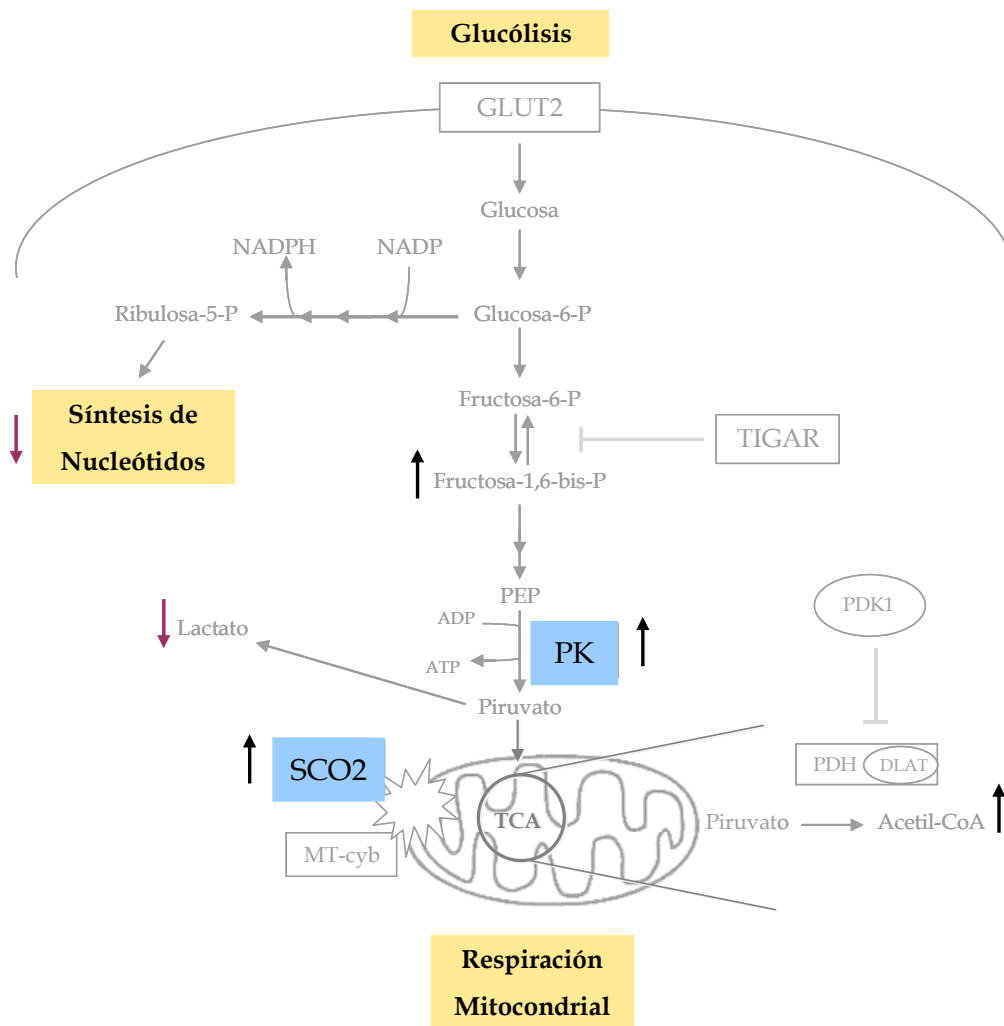


Figura 17. Esquema resumen del efecto de la sobreexpresión de hCNT2 en las líneas BLCL-3 y BCLC-5.

Todos estos estudios deberán ser verificados, validando metabolitos concretos y añadiendo más líneas celulares así como controles experimentales alternativos, como por ejemplo, AdhCNT1, AdhCNT3 o AdhENT1.

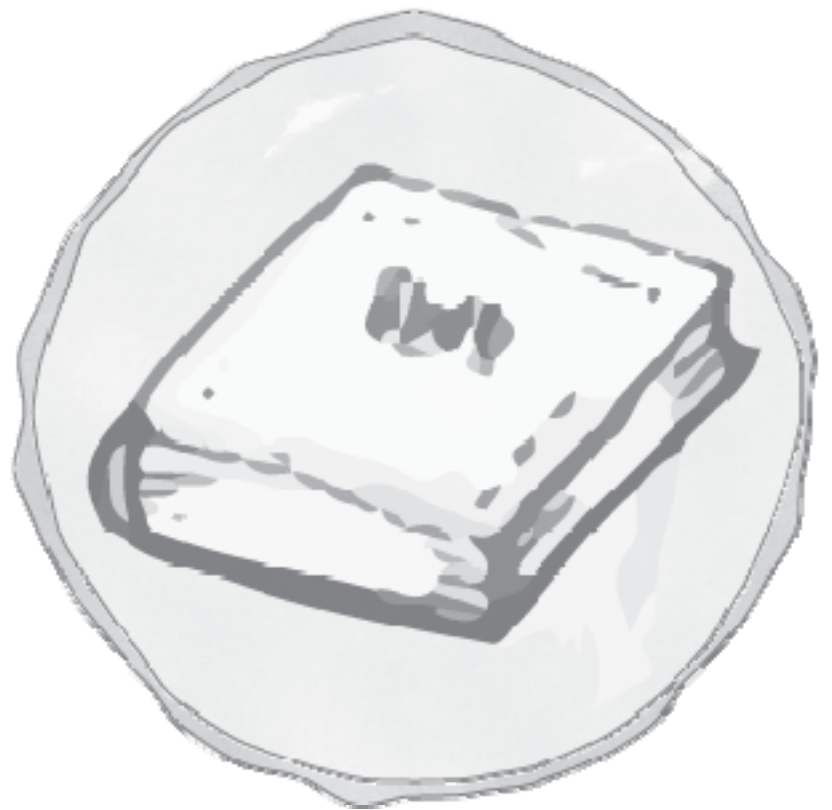
Conclusiones



- La inhibición de la migración celular inducida por la restitución de la proteína hCNT1 podría estar mediada por su interacción con otras proteínas. En este sentido, se ha validado por coimmunoprecipitación la interacción de hCNT1 con RACK1, proteína implicada en procesos de migración.
- El análisis de expresión a nivel de mRNA de hENT1 y hCNT1, así como también de las posibles proteínas *partner* RhoGDI2, RACK1 y PSAP en 52 muestras apareadas de CRC (*colorrectal carcinoma*), muestra una disminución significativa de hENT1, PSAP y RACK1 en tejido tumoral.
- La expresión de la proteína hCNT1 disminuye de manera significativa en tumores de endometrio al compararlo con el tejido no tumoral adyacente, correlacionándose su pérdida con el grado del tumor.
- La diferenciación de las células PC12 produce la aparición de una actividad dependiente de sodio de tipo CNT2, una disminución de la expresión de los receptores A_{2A}, A_{2B} y A₃, y un aumento del receptor A₁, convirtiéndolas en un buen modelo neuronal donde estudiar el posible papel de CNT2 en la regulación de los niveles de adenosina extracelular.
- En las células PC12 diferenciadas la función CNT2 está regulada por agonistas que activan tanto el receptor A₁ como el A_{2A}. Esto sería coherente con el hecho de que la adenosina extracelular podría ser responsable de su propia eliminación del medio a través de sus receptores, activando la capacidad de transporte de CNT2.
- La adenosina extracelular transportada al interior de la célula a través de CNT2, es capaz de activar la AMPK en nuestro modelo neuronal, tal y como se había descrito en tejidos periféricos.

- La hipoxia/isquemia puede regular la expresión de hCNT2, lo cual concuerda con su papel como modulador de los niveles de adenosina extracelular.
- Se ha detectado actividad de los transportadores concentrativos hCNT2 y hCNT3 en la línea no transformada HHL5, derivada de hepatocito humano, mientras que en las líneas derivadas de hepatocarcinoma (BCLCs) no fuimos capaces de detectar actividad de tipo CNT, corroborando la hipótesis de la pérdida de expresión en células tumorales.
- La restitución de la función hCNT2 no modifica el perfil de ciclo celular, al contrario de lo que sucedía con hCNT1 y hENT1. La expresión de los transportadores de nucleósidos se modifica al inhibir Cdk4/Cdk6 en hígado de ratón, disminuyendo los niveles de mRNA de CNT2 y ENT1, en todos los tejidos y condiciones analizadas.
- La restitución de la función hCNT2 en líneas derivadas de hepatocarcinoma, parecería inducir la vía glucolítica y el sistema OXPHOS, observándose un aumento de la expresión de la piruvato quinasa (PK), así como de los metabolitos fructosa-1,6-bis-P y acetil-CoA, acompañado de una menor producción de lactato. El aumento en la capacidad respiratoria y el incremento en la expresión de SCO2, parecerían apuntar a un metabolismo más acoplado al sistema OXPHOS.

Bibliografía



A

- Abella, A., P. Dubus, et al. (2005). "Cdk4 promotes adipogenesis through PPAR γ activation." *Cell Metab* **2**(4): 239-249.
- Adams, D. R., D. Ron, et al. (2011). "RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function." *Cell Commun Signal* **9**: 22.
- Al-Reefy, S. and K. Mokbel (2010). "The role of RACK1 as an independent prognostic indicator in human breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **123**(3): 911; author reply 912.
- Alanko, L., T. Porkka-Heiskanen, et al. (2006). "Localization of equilibrative nucleoside transporters in the rat brain." *J Chem Neuroanat* **31**(3): 162-168.
- Aliagas, E., A. Vidal, et al. (2013). "Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium." *Purinergic Signal* **9**(2): 227-237.
- Amato, S., X. Liu, et al. (2011). "AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization." *Science* **332**(6026): 247-251.
- Anderson, C. M., S. A. Baldwin, et al. (1999). "Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* **70**(2): 293-297.
- Anderson, C. M., W. Xiong, et al. (1999). "Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain." *J Neurochem* **73**(2): 867-873.
- Anderson, C. M., W. Xiong, et al. (1996). "Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* **42**(2): 358-361.
- Aymerich, I., F. Foufelle, et al. (2006). "Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK)." *J Cell Sci* **119**(Pt 8): 1612-1621.
- Aymerich, I., M. Pastor-Anglada, et al. (2004). "Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells." *J Gen Physiol* **124**(5): 505-512.

B

- Baldwin, S. A., P. R. Beal, et al. (2004). "The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29." *Pflugers Arch* **447**(5): 735-743.
- Baldwin, S. A., S. Y. Yao, et al. (2005). "Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes." *J Biol Chem* **280**(16): 15880-15887.
- Barnes, K., H. Dobrzynski, et al. (2006). "Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH." *Circ Res* **99**(5): 510-519.
- Bartrons, R., E. Van Schaftingen, et al. (1984). "The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. A cyclic AMP-mediated effect." *Biochem J* **218**(1): 157-163.
- Bensaad, K., E. C. Cheung, et al. (2009). "Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy." *EMBO J* **28**(19): 3015-3026.
- Berns, H., R. Humar, et al. (2000). "RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas." *FASEB J* **14**(15): 2549-2558.
- Bhutia, Y. D., S. W. Hung, et al. (2011). "CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells." *Cancer Res* **71**(5): 1825-1835.

- Biber, K., K. N. Klotz, et al. (1997). "Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression." J Neurosci **17**(13): 4956-4964.
- Blanchet, E., J. S. Annicotte, et al. (2011). "E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism." Nat Cell Biol **13**(9): 1146-1152.
- Buensuceso, C. S., D. Woodside, et al. (2001). "The WD protein Rack1 mediates protein kinase C and integrin-dependent cell migration." J Cell Sci **114**(Pt 9): 1691-1698.
- Burnstock, G. and J. N. Wood (1996). "Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission." Curr Opin Neurobiol **6**(4): 526-532.

C

- Cabrita, M. A., S. A. Baldwin, et al. (2002). "Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes." Biochem Cell Biol **80**(5): 623-638.
- Cai, Z., L. J. Yan, et al. (2012). "Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease." Neuromolecular Med **14**(1): 1-14.
- Cam, H., E. Balciunaite, et al. (2004). "A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition." Mol Cell **16**(3): 399-411.
- Campana, W. M., J. S. O'Brien, et al. (1999). "Secretion of prosaposin, a multifunctional protein, by breast cancer cells." Biochim Biophys Acta **1427**(3): 392-400.
- Campas, C., J. M. Lopez, et al. (2003). "Adenosine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes." Blood **101**(9): 3674-3680.
- Cano-Soldado, P., I. M. Llorayoz, et al. (2004). "Interaction of nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with the concentrative nucleoside transporter-1 (SLC28A1)." Antivir Ther **9**(6): 993-1002.
- Canon, E., J. M. Cosgaya, et al. (2004). "Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells." Mol Biol Cell **15**(12): 5583-5592.
- Cansev, M. (2006). "Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization." Brain Res Rev **52**(2): 389-397.
- Cao, X. X., J. D. Xu, et al. (2010). "RACK1: A superior independent predictor for poor clinical outcome in breast cancer." Int J Cancer **127**(5): 1172-1179.
- Casanello, P., A. Torres, et al. (2005). "Equilibrative nucleoside transporter 1 expression is downregulated by hypoxia in human umbilical vein endothelium." Circ Res **97**(1): 16-24.
- Cass, C. E., J. D. Young, et al. (1999). "Nucleoside transporters of mammalian cells." Pharm Biotechnol **12**: 313-352.
- Ciruella, F., V. Casado, et al. (2006). "Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers." J Neurosci **26**(7): 2080-2087.
- Coe, I., Y. Zhang, et al. (2002). "PKC regulation of the human equilibrative nucleoside transporter, hENT1." FEBS Lett **517**(1-3): 201-205.
- Coothankandaswamy, V., S. Elangovan, et al. (2013). "The plasma membrane transporter SLC5A8 suppresses tumour progression through depletion of survivin without involving its transport function." Biochem J **450**(1): 169-178.
- Crawford, C. R., D. H. Patel, et al. (1998). "Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line." J Biol Chem **273**(9): 5288-5293.

- Cho, H. J., K. E. Baek, et al. (2010). "RhoGDI2 as a therapeutic target in cancer." Expert Opin Ther Targets **14**(1): 67-75.
- Choi, D. S., M. G. Cascini, et al. (2004). "The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference." Nat Neurosci **7**(8): 855-861.

D

- Dali-Youcef, N., C. Matakı, et al. (2007). "Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10703-10708.
- Darville, M. I., I. V. Antoine, et al. (1995). "An E2F-dependent late-serum-response promoter in a gene that controls glycolysis." Oncogene **11**(8): 1509-1517.
- del Santo, B., G. Tarafa, et al. (2001). "Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver." J Hepatol **34**(6): 873-880.
- del Santo, B., R. Valdes, et al. (1998). "Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells." Hepatology **28**(6): 1504-1511.
- Delicado, E. G., T. Casillas, et al. (1994). "Evidence that adenine nucleotides modulate nucleoside-transporter function. Characterization of uridine transport in chromaffin cells and plasma membrane vesicles." Eur J Biochem **225**(1): 355-362.
- Dhup, S., R. K. Dadhich, et al. (2012). "Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis." Curr Pharm Des **18**(10): 1319-1330.
- Dixon, A. K., A. K. Gubit, et al. (1996). "Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat." Br J Pharmacol **118**(6): 1461-1468.
- Donaton, M. C., I. Holsbeeks, et al. (2003). "The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Microbiol **50**(3): 911-929.
- Dragan, Y., R. Valdes, et al. (2000). "Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas." Hepatology **32**(2): 239-246.
- Duflot, S., M. Calvo, et al. (2002). "Concentrative nucleoside transporter (rCNT1) is targeted to the apical membrane through the hepatic transcytotic pathway." Exp Cell Res **281**(1): 77-85.
- Duflot, S., B. Riera, et al. (2004). "ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors." Mol Cell Biol **24**(7): 2710-2719.
- Dunwiddie, T. V., L. Diao, et al. (1997). "Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus." J Neurosci **17**(2): 607-614.
- Dunwiddie, T. V. and S. A. Masino (2001). "The role and regulation of adenosine in the central nervous system." Annu Rev Neurosci **24**: 31-55.

E

- Eltzschig, H. K., P. Abdulla, et al. (2005). "HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia." J Exp Med **202**(11): 1493-1505.
- Endres, C. J. and J. D. Unadkat (2005). "Residues Met89 and Ser160 in the human equilibrative nucleoside transporter 1 affect its affinity for adenosine, guanosine, S6-(4-nitrobenzyl)-mercaptapurine riboside, and dipyridamole." Mol Pharmacol **67**(3): 837-844.

- Engel, K., M. Zhou, et al. (2004). "Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain." *J Biol Chem* **279**(48): 50042-50049.
- Erpapazoglou, Z., M. Froissard, et al. (2008). "Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1." *Traffic* **9**(8): 1372-1391.
- Errasti-Murugarren, E. and M. Pastor-Anglada (2010). "Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies." *Pharmacogenomics* **11**(6): 809-841.
- Errasti-Murugarren, E., M. Pastor-Anglada, et al. (2007). "Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs." *J Physiol* **582**(Pt 3): 1249-1260.

F

- Fajas, L. (2013). "Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism." *Front Oncol* **3**: 4.
- Fajas, L., J. S. Annicotte, et al. (2004). "Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-) mice." *J Clin Invest* **113**(9): 1288-1295.
- Fajas, L., E. Blanchet, et al. (2010). "The CDK4-pRB-E2F1 pathway : A new modulator of insulin secretion." *Islets* **2**(1): 51-53.
- Fajas, L., V. Egler, et al. (2002). "The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation." *Dev Cell* **3**(6): 903-910.
- Fajas, L., R. L. Landsberg, et al. (2002). "E2Fs regulate adipocyte differentiation." *Dev Cell* **3**(1): 39-49.
- Farre, X., E. Guillen-Gomez, et al. (2004). "Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors." *Int J Cancer* **112**(6): 959-966.
- Felice, M. R., I. De Domenico, et al. (2005). "Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system." *J Biol Chem* **280**(23): 22181-22190.
- Felipe, A., A. Ferrer-Martinez, et al. (1997). "Expression of sodium-dependent purine nucleoside carrier (SPNT) mRNA correlates with nucleoside transport activity in rat liver." *Biochem Biophys Res Commun* **233**(2): 572-575.
- Fernandez-Calotti, P. and 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**(18): 13589-13598.
- Fernandez-Veledo, S., I. Huber-Ruano, et al. (2006). "Bile acids alter the subcellular localization of CNT2 (concentrative nucleoside cotransporter) and increase CNT2-related transport activity in liver parenchymal cells." *Biochem J* **395**(2): 337-344.
- Ferre, P., D. Azzout-Marniche, et al. (2003). "AMP-activated protein kinase and hepatic genes involved in glucose metabolism." *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 1): 220-223.
- Field, S. J., F. Y. Tsai, et al. (1996). "E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation." *Cell* **85**(4): 549-561.
- Finn, R. S., J. Dering, et al. (2009). "PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro." *Breast Cancer Res* **11**(5): R77.
- Fomenkov, A., R. Zangen, et al. (2004). "RACK1 and stratifin target DeltaNp63alpha for a proteasome degradation in head and neck squamous cell carcinoma cells upon DNA damage." *Cell Cycle* **3**(10): 1285-1295.

- Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. (2011). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update." *Pharmacol Rev* **63**(1): 1-34.
- Fu, L. Y., H. L. Jia, et al. (2009). "Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses." *BMC Cancer* **9**: 49.
- Fujita, A., A. Shida, et al. (2012). "Clinical significance of Rho GDP dissociation inhibitor 2 in colorectal carcinoma." *Int J Clin Oncol* **17**(2): 137-142.

G

- Gadalla, A. E., T. Pearson, et al. (2004). "AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus." *J Neurochem* **88**(5): 1272-1282.
- Galan, J. M., V. Moreau, et al. (1996). "Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease." *J Biol Chem* **271**(18): 10946-10952.
- Galmarini, C. M., J. R. Mackey, et al. (2001). "Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies." *Leukemia* **15**(6): 875-890.
- Ganapathy, V., M. Thangaraju, et al. (2009). "Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond." *Pharmacol Ther* **121**(1): 29-40.
- Garcia-Manteiga, J., M. Molina-Arcas, et al. (2003). "Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine-induced cytotoxicity." *Clin Cancer Res* **9**(13): 5000-5008.
- Garcia, N., M. Priego, et al. (2013). "Adenosine A1 and A2A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction." *Eur J Neurosci* **38**(2): 2229-2241.
- Gloeckner-Hofmann, K., E. Guillen-Gomez, et al. (2006). "Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer." *Oncology* **70**(3): 238-244.
- Goberdhan, D. C., D. Meredith, et al. (2005). "PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids." *Development* **132**(10): 2365-2375.
- Gojon, A., G. Krouk, et al. (2011). "Nitrate transceptor(s) in plants." *J Exp Bot* **62**(7): 2299-2308.
- Gomes, C. V., M. P. Kaster, et al. (2011). "Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration." *Biochim Biophys Acta* **1808**(5): 1380-1399.
- Gonzalez-Benitez, E., R. Guinzberg, et al. (2002). "Regulation of glycogen metabolism in hepatocytes through adenosine receptors. Role of Ca²⁺ and cAMP." *Eur J Pharmacol* **437**(3): 105-111.
- Gottlieb, E. and I. P. Tomlinson (2005). "Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update." *Nat Rev Cancer* **5**(11): 857-866.
- Governo, R. J., J. Deuchars, et al. (2005). "Localization of the NBMPR-sensitive equilibrative nucleoside transporter, ENT1, in the rat dorsal root ganglion and lumbar spinal cord." *Brain Res* **1059**(2): 129-138.
- Govindarajan, R., A. H. Bakken, et al. (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**(5): R1809-1822.

- Govindarajan, R., C. J. Endres, et al. (2008). "Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative nucleoside transporters in sandwich-cultured human hepatocytes." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(3): G570-580.
- Govindarajan, R., G. P. Leung, et al. (2009). "Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(4): G910-922.
- Gray, J. H., R. P. Owen, et al. (2004). "The concentrative nucleoside transporter family, SLC28." Pflugers Arch **447**(5): 728-734.
- Grden, M., M. Podgorska, et al. (2007). "Diabetes-induced alterations of adenosine receptors expression level in rat liver." Exp Mol Pathol **83**(3): 392-398.
- Griffith, D. A. and S. M. Jarvis (1996). "Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1286**(3): 153-181.
- Griffiths, M., S. Y. Yao, et al. (1997). "Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta." Biochem J **328 (Pt 3)**: 739-743.
- Gronborg, M., T. Z. Kristiansen, et al. (2006). "Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach." Mol Cell Proteomics **5**(1): 157-171.
- Gu, J. G., I. O. Foga, et al. (1995). "Involvement of bidirectional adenosine transporters in the release of L-[3H]adenosine from rat brain synaptosomal preparations." J Neurochem **64**(5): 2105-2110.
- Gu, J. G. and J. D. Geiger (1992). "Transport and metabolism of D-[3H]adenosine and L-[3H]adenosine in rat cerebral cortical synaptoneurosome." J Neurochem **58**(5): 1699-1705.
- Guillen-Gomez, E., M. Calbet, et al. (2004). "Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats." J Neurochem **90**(4): 883-893.

H

- Hamilton, S. R., S. Y. Yao, et al. (2001). "Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1." J Biol Chem **276**(30): 27981-27988.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hardie, D. G. and D. Carling (1997). "The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?" Eur J Biochem **246**(2): 259-273.
- Harding, M. A., K. C. Arden, et al. (2002). "Functional genomic comparison of lineage-related human bladder cancer cell lines with differing tumorigenic and metastatic potentials by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and a novel method of positional expression profiling." Cancer Res **62**(23): 6981-6989.
- Hayashi, T., J. F. Wojtaszewski, et al. (1997). "Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle." Am J Physiol **273**(6 Pt 1): E1039-1051.
- Heydrick, S. J., B. R. Lardeux, et al. (1991). "Uptake and degradation of cytoplasmic RNA by hepatic lysosomes. Quantitative relationship to RNA turnover." J Biol Chem **266**(14): 8790-8796.
- Hsieh, M. C., D. Das, et al. (2008). "Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex." J Biol Chem **283**(41): 27410-27417.

- Hu, H., C. J. Endres, et al. (2006). "Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3)." Mol Pharmacol **69**(5): 1542-1553.
- Hu, L. D., H. F. Zou, et al. (2007). "Biphasic expression of RhoGDI2 in the progression of breast cancer and its negative relation with lymph node metastasis." Oncol Rep **17**(6): 1383-1389.
- Hu, S., N. Delorme, et al. (2010). "Prosaposin down-modulation decreases metastatic prostate cancer cell adhesion, migration, and invasion." Mol Cancer **9**: 30.
- Huang, Y., P. Anderle, et al. (2004). "Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance." Cancer Res **64**(12): 4294-4301.
- Huber-Ruano, I., E. Errasti-Murugarren, et al. (2012). "Functional outcome of a novel SLC29A3 mutation identified in a patient with H syndrome." Biochem Biophys Res Commun **428**(4): 532-537.
- Huber-Ruano, I., I. Pinilla-Macua, et al. (2010). "Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells." J Cell Physiol **225**(2): 620-630.
- Hutter, E., K. Renner, et al. (2004). "Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts." Biochem J **380**(Pt 3): 919-928.
- Hyde, R., E. L. Cwiklinski, et al. (2007). "Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability." J Biol Chem **282**(27): 19788-19798.
- Hyde, R. J., C. E. Cass, et al. (2001). "The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms." Mol Membr Biol **18**(1): 53-63.
- Hylland, P., G. E. Nilsson, et al. (1994). "Time course of anoxia-induced increase in cerebral blood flow rate in turtles: evidence for a role of adenosine." J Cereb Blood Flow Metab **14**(5): 877-881.

I

- Iankova, I., R. K. Petersen, et al. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma recruits the positive transcription elongation factor b complex to activate transcription and promote adipogenesis." Mol Endocrinol **20**(7): 1494-1505.

J

- Jain, M., R. Nilsson, et al. (2012). "Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation." Science **336**(6084): 1040-1044.
- Jennings, L. L., C. Hao, et al. (2001). "Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system." Neuropharmacology **40**(5): 722-731.
- Jezek, P., L. Plecita-Hlavata, et al. (2010). "Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development." Int J Biochem Cell Biol **42**(5): 604-622.
- Johnson, S. A. (2001). "Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies." Expert Opin Pharmacother **2**(6): 929-943.

- Johnson, Z. L., C. G. Cheong, et al. (2012). "Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å." Nature **483**(7390): 489-493.
- Jordheim, L. P. and C. Dumontet (2007). "Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues." Biochim Biophys Acta **1776**(2): 138-159.

K

- Kiely, P. A., G. S. Baillie, et al. (2009). "Phosphorylation of RACK1 on tyrosine 52 by c-Abl is required for insulin-like growth factor I-mediated regulation of focal adhesion kinase." J Biol Chem **284**(30): 20263-20274.
- Kiely, P. A., M. Leahy, et al. (2005). "RACK1-mediated integration of adhesion and insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling and cell migration are defective in cells expressing an IGF-I receptor mutated at tyrosines 1250 and 1251." J Biol Chem **280**(9): 7624-7633.
- Kiely, P. A., D. O'Gorman, et al. (2006). "Insulin-like growth factor I controls a mutually exclusive association of RACK1 with protein phosphatase 2A and beta1 integrin to promote cell migration." Mol Cell Biol **26**(11): 4041-4051.
- Kim, Y., C. W. Yun, et al. (2002). "Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **21**(14): 3632-3642.
- Kishimoto, Y., M. Hiraiwa, et al. (1992). "Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics." J Lipid Res **33**(9): 1255-1267.
- Kroemer, G. and J. Pouyssegur (2008). "Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel." Cancer Cell **13**(6): 472-482.

L

- Lacoste, C., J. Herve, et al. (2012). "Iodide transporter NIS regulates cancer cell motility and invasiveness by interacting with the Rho guanine nucleotide exchange factor LARG." Cancer Res **72**(21): 5505-5515.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lai, Y., A. H. Bakken, et al. (2002). "Simultaneous expression of hCNT1-CFP and hENT1-YFP in Madin-Darby canine kidney cells. Localization and vectorial transport studies." J Biol Chem **277**(40): 37711-37717.
- Lai, Y., C. M. Tse, et al. (2004). "Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs." J Biol Chem **279**(6): 4490-4497.
- Lane, J., T. A. Martin, et al. (2010). "The differential expression of hCNT1 and hENT1 in breast cancer and the possible impact on breast cancer therapy." J Exp Ther Oncol **8**(3): 203-210.
- Larrayoz, I. M., F. J. Casado, et al. (2004). "Electrophysiological characterization of the human Na(+)/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function." J Biol Chem **279**(10): 8999-9007.
- Lasley, R. D., J. O. Hegge, et al. (1998). "Comparison of interstitial fluid and coronary venous adenosine levels in in vivo porcine myocardium." J Mol Cell Cardiol **30**(6): 1137-1147.
- Lavoigne, A., A. Baquet, et al. (1987). "Stimulation of glycogen synthesis and lipogenesis by glutamine in isolated rat hepatocytes." Biochem J **248**(2): 429-437.

- Lavoigne, A., H. A. Buc, et al. (1987). "The mechanism by which adenosine decreases gluconeogenesis from lactate in isolated rat hepatocytes." Biochem J **246**(2): 449-454.
- Lazer, G. and S. Katzav (2011). "Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy?" Cell Signal **23**(6): 969-979.
- Leclerc, I., C. Lenzner, et al. (2001). "Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase." Diabetes **50**(7): 1515-1521.
- Lee, E. W., Y. Lai, et al. (2006). "Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine." J Biol Chem **281**(24): 16700-16706.
- Lee, K. H., C. J. Ryu, et al. (2005). "CDNA microarray analysis of nerve growth factor-regulated gene expression profile in rat PC12 cells." Neurochem Res **30**(4): 533-540.
- Li, J. Y., R. J. Boado, et al. (2001). "Cloned blood-brain barrier adenosine transporter is identical to the rat concentrative Na⁺ nucleoside cotransporter CNT2." J Cereb Blood Flow Metab **21**(8): 929-936.
- Li, J. Y., R. J. Boado, et al. (2001). "Differential kinetics of transport of 2',3'-dideoxyinosine and adenosine via concentrative Na⁺ nucleoside transporter CNT2 cloned from rat blood-brain barrier." J Pharmacol Exp Ther **299**(2): 735-740.
- Li, X., J. Wang, et al. (2012). "Overexpression of RhoGDI2 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal carcinoma." Ann Surg Oncol **19**(1): 145-153.
- Liu, Y. V., J. H. Baek, et al. (2007). "RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha." Mol Cell **25**(2): 207-217.
- Loewen, S. K., A. M. Ng, et al. (1999). "Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na(+) nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2." J Biol Chem **274**(35): 24475-24484.
- Longley, D. B., D. P. Harkin, et al. (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies." Nat Rev Cancer **3**(5): 330-338.
- Lopez-Bergami, P., H. Habelhah, et al. (2005). "RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]." Mol Cell **19**(3): 309-320.
- Lu, H., C. Chen, et al. (2004). "Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice." Drug Metab Dispos **32**(12): 1455-1461.
- Lund, P., N. W. Cornell, et al. (1975). "Effect of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes." Biochem J **152**(3): 593-599.

M

- Macek, T. A., H. Schaffhauser, et al. (1998). "Protein kinase C and A3 adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins." J Neurosci **18**(16): 6138-6146.

- Mackey, J. R., S. Y. Yao, et al. (1999). "Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters." *J Natl Cancer Inst* **91**(21): 1876-1881.
- Malva, J. O., A. P. Silva, et al. (2003). "Presynaptic modulation controlling neuronal excitability and epileptogenesis: role of kainate, adenosine and neuropeptide Y receptors." *Neurochem Res* **28**(10): 1501-1515.
- Mangravite, L. M., J. H. Lipschutz, et al. (2001). "Localization of GFP-tagged concentrative nucleoside transporters in a renal polarized epithelial cell line." *Am J Physiol Renal Physiol* **280**(5): F879-885.
- Mangravite, L. M., G. Xiao, et al. (2003). "Localization of human equilibrative nucleoside transporters, hENT1 and hENT2, in renal epithelial cells." *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(5): F902-910.
- Mani, R. S., J. R. Hammond, et al. (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**(46): 30818-30825.
- Matoba, S., J. G. Kang, et al. (2006). "p53 regulates mitochondrial respiration." *Science* **312**(5780): 1650-1653.
- Mazurek, S., C. B. Boschek, et al. (2005). "Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading." *Semin Cancer Biol* **15**(4): 300-308.
- McCahill, A., J. Warwicker, et al. (2002). "The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms." *Mol Pharmacol* **62**(6): 1261-1273.
- McGinn, C. J., E. M. Miller, et al. (1994). "The role of cell cycle redistribution in radiosensitization: implications regarding the mechanism of fluorodeoxyuridine radiosensitization." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **30**(4): 851-859.
- Medes, G., A. Thomas, et al. (1953). "Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro." *Cancer Res* **13**(1): 27-29.
- Meijer, D., M. P. Jansen, et al. (2009). "TSC22D1 and PSAP predict clinical outcome of tamoxifen treatment in patients with recurrent breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **113**(2): 253-260.
- Melani, A., F. Corti, et al. (2012). "Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum." *Exp Neurol* **233**(1): 193-204.
- Menendez, J. A. and R. Lupu (2007). "Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis." *Nat Rev Cancer* **7**(10): 763-777.
- Minuesa, G., S. Purcet, et al. (2008). "Expression and functionality of anti-human immunodeficiency virus and anticancer drug uptake transporters in immune cells." *J Pharmacol Exp Ther* **324**(2): 558-567.
- Molho-Pessach, V., I. Lerer, et al. (2008). "The H syndrome is caused by mutations in the nucleoside transporter hENT3." *Am J Hum Genet* **83**(4): 529-534.
- Molina-Arcas, M., B. Bellosillo, et al. (2003). "Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **101**(6): 2328-2334.
- Molina-Arcas, M., F. J. Casado, et al. (2009). "Nucleoside transporter proteins." *Curr Vasc Pharmacol* **7**(4): 426-434.
- Molina-Arcas, M. and M. Pastor-Anglada (2010). "Role of nucleoside transporters in nucleoside-derived drug sensitivity." *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **29**(4-6): 335-346.
- Mourtada-Maarabouni, M., L. Kirkham, et al. (2005). "Functional expression cloning reveals a central role for the receptor for activated protein kinase C 1 (RACK1) in T cell apoptosis." *J Leukoc Biol* **78**(2): 503-514.

Mu, J., J. T. Brozinick, Jr., et al. (2001). "A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle." Mol Cell 7(5): 1085-1094.

N

Nagasawa, K., F. Kawasaki, et al. (2007). "Characterization of guanine and guanosine transport in primary cultured rat cortical astrocytes and neurons." Glia 55(14): 1397-1404.

Navarro, G., P. Carriba, et al. (2008). "Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer." ScientificWorldJournal 8: 1088-1097.

O

Oetjen, E., C. Schweickhardt, et al. (1990). "Stimulation of glucose production from glycogen by glucagon, noradrenaline and non-degradable adenosine analogues is counteracted by adenosine and ATP in cultured rat hepatocytes." Biochem J 271(2): 337-344.

Onishi, I., P. J. Lin, et al. (2007). "RACK1 associates with NHE5 in focal adhesions and positively regulates the transporter activity." Cell Signal 19(1): 194-203.

Osses, N., J. D. Pearson, et al. (1996). "Hypoxanthine enters human vascular endothelial cells (ECV 304) via the nitrobenzylthioinosine-insensitive equilibrative nucleoside transporter." Biochem J 317 (Pt 3): 843-848.

P

Parkinson, F. E., W. Xiong, et al. (2009). "Transgenic expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons." J Neurochem 109(2): 562-572.

Pasini, F. L., C. Frigerio, et al. (1996). "Modulation of venous endothelial activity and transcellular calcium transport by defibrotide: the adenosine hypothesis." Semin Thromb Hemost 22 Suppl 1: 15-20.

Pastor-Anglada, M., P. Cano-Soldado, et al. (2005). "Cell entry and export of nucleoside analogues." Virus Res 107(2): 151-164.

Pastor-Anglada, M., F. J. Casado, et al. (2001). "Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells." Mol Membr Biol 18(1): 81-85.

Pastor-Anglada, M., E. Errasti-Murugarren, et al. (2007). "Concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia: from absorption to cell signaling." J Physiol Biochem 63(1): 97-110.

Pastor-Anglada, M., A. Felipe, et al. (1998). "Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies." Trends Pharmacol Sci 19(10): 424-430.

Pastor-Anglada, M., A. Felipe, et al. (1998). "Nucleoside transporters and liver cell growth." Biochem Cell Biol 76(5): 771-777.

Patil, S. D. and J. D. Unadkat (1997). "Sodium-dependent nucleoside transport in the human intestinal brush-border membrane." Am J Physiol 272(6 Pt 1): G1314-1320.

- Peng, L., R. Huang, et al. (2005). "Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes." *Glia* **52**(1): 25-35.
- Pennycooke, M., N. Chaudary, et al. (2001). "Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(3): 951-959.
- Perez-Torras, S., J. Garcia-Manteiga, et al. (2008). "Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer." *Biochem Pharmacol* **76**(3): 322-329.
- Perez-Torras, S., A. Vidal-Pla, et al. (2013). "Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner." *Cell Death Dis* **4**: e648.
- Persson, B. L., J. Petersson, et al. (1999). "Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation." *Biochim Biophys Acta* **1422**(3): 255-272.
- Pinto-Duarte, A., J. E. Coelho, et al. (2005). "Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus." *J Neurochem* **93**(3): 595-604.
- Polyak, K., Y. Xia, et al. (1997). "A model for p53-induced apoptosis." *Nature* **389**(6648): 300-305.
- Porkka-Heiskanen, T. and A. V. Kalinchuk (2011). "Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis." *Sleep Med Rev* **15**(2): 123-135.

R

- Ritzel, M. W., A. M. Ng, et al. (2001). "Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib)." *Mol Membr Biol* **18**(1): 65-72.
- Ritzel, M. W., A. M. Ng, et al. (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**(4): 2914-2927.
- Ritzel, M. W., S. Y. Yao, et al. (1997). "Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1)." *Am J Physiol* **272**(2 Pt 1): C707-714.
- Ritzel, M. W., S. Y. Yao, et al. (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**(4): 203-211.
- Robak, T., A. Korycka, et al. (2009). "Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases." *Molecules* **14**(3): 1183-1226.
- Rodriguez-Mulero, S., E. Errasti-Murugarren, et al. (2005). "Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: effect of diabetes." *Kidney Int* **68**(2): 665-672.
- Rogato, A., E. D'Apuzzo, et al. (2010). "The multiple plant response to high ammonium conditions: the *Lotus japonicus* AMT1; 3 protein acts as a putative transceptor." *Plant Signal Behav* **5**(12): 1594-1596.

- Ronnett, G. V., S. Ramamurthy, et al. (2009). "AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection." *J Neurochem* **109 Suppl 1**: 17-23.
- Rorsman, P. and G. Trube (1985). "Glucose dependent K⁺-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP." *Pflugers Arch* **405(4)**: 305-309.
- Ruiz-Montasell, B., F. Javier Casado, et al. (1992). "Uridine transport in basolateral plasma membrane vesicles from rat liver." *J Membr Biol* **128(3)**: 227-233.
- Ruiz-Montasell, B., J. V. Martinez-Mas, et al. (1993). "Early induction of Na(+)-dependent uridine uptake in the regenerating rat liver." *FEBS Lett* **316(1)**: 85-88.

S

- Saadjian, A. Y., S. Levy, et al. (2002). "Role of endogenous adenosine as a modulator of syncope induced during tilt testing." *Circulation* **106(5)**: 569-574.
- Sabine, J. R. and I. L. Chaikoff (1967). "Control of fatty acid synthesis in homogenate preparations of mouse hepatoma BW 7756." *Aust J Exp Biol Med Sci* **45(5)**: 541-548.
- Sahasranaman, S., D. Howard, et al. (2008). "Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines." *Eur J Clin Pharmacol* **64(8)**: 753-767.
- Saiko, P., Z. Horvath, et al. (2005). "Heterodinucleoside phosphates of 5-fluorodeoxyuridine and arabinofuranosylcytosine--new drugs in cancer chemotherapy?" *In Vivo* **19(1)**: 205-214.
- Saito, A., G. Fujii, et al. (2002). "Detection of genes expressed in primary colon cancers by in situ hybridisation: overexpression of RACK 1." *Mol Pathol* **55(1)**: 34-39.
- Saito, H., M. Nishimura, et al. (1999). "Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans." *Am J Respir Crit Care Med* **159(3)**: 1014-1018.
- Sakowicz, M., A. Szutowicz, et al. (2004). "Insulin and glucose induced changes in expression level of nucleoside transporters and adenosine transport in rat T lymphocytes." *Biochem Pharmacol* **68(7)**: 1309-1320.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74(12)**: 5463-5467.
- Sarruf, D. A., I. Iankova, et al. (2005). "Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Mol Cell Biol* **25(22)**: 9985-9995.
- Scharrer, E. and B. Grenacher (2001). "Active intestinal absorption of nucleosides by Na⁺-dependent transport across the brush border membrane in cows." *J Dairy Sci* **84(3)**: 614-619.
- Schwartzberg-Bar-Yoseph, F., M. Armoni, et al. (2004). "The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression." *Cancer Res* **64(7)**: 2627-2633.
- Sen, R. P., L. Sobrevia, et al. (1996). "Bovine adrenal endothelial cells express nucleoside transporters nonregulated by protein kinases A and C." *Am J Physiol* **271(2 Pt 1)**: C504-510.
- Shin, H. C., C. P. Landowski, et al. (2003). "Functional expression and characterization of a sodium-dependent nucleoside transporter hCNT2 cloned from human duodenum." *Biochem Biophys Res Commun* **307(3)**: 696-703.
- Sklan, E. H., E. Podoly, et al. (2006). "RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system." *Prog Neurobiol* **78(2)**: 117-134.

- Slugoski, M. D., S. K. Loewen, et al. (2007). "Specific mutations in transmembrane helix 8 of human concentrative Na⁺/nucleoside cotransporter hCNT1 affect permeant selectivity and cation coupling." *Biochemistry* **46**(6): 1684-1693.
- Smith, K. M., A. M. Ng, et al. (2004). "Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes." *J Physiol* **558**(Pt 3): 807-823.
- Smith, K. M., M. D. Slugoski, et al. (2005). "The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics." *J Biol Chem* **280**(27): 25436-25449.
- Soler, C., A. Felipe, et al. (2000). "Nitric oxide regulates nucleoside transport in activated B lymphocytes." *J Leukoc Biol* **67**(3): 345-349.
- Soler, C., A. Felipe, et al. (1998). "Regulation of nucleoside transport by lipopolysaccharide, phorbol esters, and tumor necrosis factor-alpha in human B-lymphocytes." *J Biol Chem* **273**(41): 26939-26945.
- Soler, C., J. Garcia-Manteiga, et al. (2001). "Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation." *FASEB J* **15**(11): 1979-1988.
- Soler, C., R. Valdes, et al. (2001). "Lipopolysaccharide-induced apoptosis of macrophages determines the up-regulation of concentrative nucleoside transporters Cnt1 and Cnt2 through tumor necrosis factor-alpha-dependent and -independent mechanisms." *J Biol Chem* **276**(32): 30043-30049.
- Sondek, J. and D. P. Siderovski (2001). "Ggamma-like (GGL) domains: new frontiers in G-protein signaling and beta-propeller scaffolding." *Biochem Pharmacol* **61**(11): 1329-1337.
- Spiegel, R., S. T. Cliffe, et al. (2010). "Expanding the clinical spectrum of SLC29A3 gene defects." *Eur J Med Genet* **53**(5): 309-313.
- Stevens, E. V., N. Banet, et al. (2011). "RhoGDI2 antagonizes ovarian carcinoma growth, invasion and metastasis." *Small GTPases* **2**(4): 202-210.
- Stolarczyk, E., C. Guissard, et al. (2010). "Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(5): E1078-1087.
- Subauste, M. C., T. Ventura-Holman, et al. (2009). "RACK1 downregulates levels of the pro-apoptotic protein Fem1b in apoptosis-resistant colon cancer cells." *Cancer Biol Ther* **8**(23): 2297-2305.
- Sundaram, M., S. Y. Yao, et al. (2001). "Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs." *J Biol Chem* **276**(48): 45270-45275.
- Sundaram, M., S. Y. Yao, et al. (2001). "Equilibrative nucleoside transporters: mapping regions of interaction for the substrate analogue nitrobenzylthioinosine (NBMPR) using rat chimeric proteins." *Biochemistry* **40**(27): 8146-8151.
- Sundaram, M., S. Y. Yao, et al. (1998). "Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs." *J Biol Chem* **273**(34): 21519-21525.

T

- Theodorescu, D., L. M. Sapinoso, et al. (2004). "Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer." *Clin Cancer Res* **10**(11): 3800-3806.

- Thevelein, J. M. and K. Voordeckers (2009). "Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors." Mol Biol Evol **26**(11): 2407-2414.
- Tozzi, V. (2010). "Pharmacogenetics of antiretrovirals." Antiviral Res **85**(1): 190-200.
- Trincavelli, M. L., A. Melani, et al. (2008). "Regulation of A(2A) adenosine receptor expression and functioning following permanent focal ischemia in rat brain." J Neurochem **104**(2): 479-490.
- Trussell, L. O. and M. B. Jackson (1985). "Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(14): 4857-4861.

V

- Valdes, R., F. J. Casado, et al. (2002). "Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs." Biochem Biophys Res Commun **296**(3): 575-579.
- Valdes, R., S. Fernandez-Veledo, et al. (2006). "TGF-beta transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells." Cell Mol Life Sci **63**(21): 2527-2537.
- Valdes, R., M. A. Ortega, et al. (2000). "Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine." Gastroenterology **119**(6): 1623-1630.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." Science **324**(5930): 1029-1033.
- Vasquez, G., F. Sanhueza, et al. (2004). "Role of adenosine transport in gestational diabetes-induced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelium." J Physiol **560**(Pt 1): 111-122.
- Vickers, M. F., R. S. Mani, et al. (1999). "Functional production and reconstitution of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) in *Saccharomyces cerevisiae*. Interaction of inhibitors of nucleoside transport with recombinant hENT1 and a glycosylation-defective derivative (hENT1/N48Q)." Biochem J **339** (Pt 1): 21-32.
- Visser, F., M. F. Vickers, et al. (2002). "Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyrindamole." J Biol Chem **277**(1): 395-401.
- Vousden, K. H. (2009). "Functions of p53 in metabolism and invasion." Biochem Soc Trans **37**(Pt 3): 511-517.

W

- Wahl, M. and L. Schilling (1993). "Regulation of cerebral blood flow--a brief review." Acta Neurochir Suppl (Wien) **59**: 3-10.
- Walko, C. M. and C. Lindley (2005). "Capecitabine: a review." Clin Ther **27**(1): 23-44.
- Wang, H. Q., D. A. Altomare, et al. (2005). "Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells." Oncogene **24**(22): 3574-3582.
- Wang, J. and K. M. Giacomini (1997). "Molecular determinants of substrate selectivity in Na⁺-dependent nucleoside transporters." J Biol Chem **272**(46): 28845-28848.
- Warburg, O. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." Science **124**(3215): 269-270.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.

- Ward, J. L., G. P. Leung, et al. (2003). "Functional analysis of site-directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2." Arch Biochem Biophys **411**(1): 19-26.
- Ward, J. L., A. Sherali, et al. (2000). "Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine." J Biol Chem **275**(12): 8375-8381.
- Willers, I. M. and J. M. Cuezva (2011). "Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H(+)-ATP synthase: a key regulator of the metabolic phenotype in cancer." Biochim Biophys Acta **1807**(6): 543-551.
- Winder, W. W. and D. G. Hardie (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): E1-10.
- Wojtal, K. A., J. J. Eloranta, et al. (2009). "Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients." Drug Metab Dispos **37**(9): 1871-1877.
- Wong, A., R. A. Soo, et al. (2009). "Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine." Drug Metab Rev **41**(2): 77-88.

Y

- Yamasaki, L., T. Jacks, et al. (1996). "Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1." Cell **85**(4): 537-548.
- Yao, S. Y., A. M. Ng, et al. (2011). "Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1)." J Biol Chem **286**(37): 32552-32562.
- Yao, S. Y., A. M. Ng, et al. (2001). "Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes." Mol Membr Biol **18**(2): 161-167.
- Yao, S. Y., A. M. Ng, et al. (2002). "Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation." J Biol Chem **277**(28): 24938-24948.
- Young, C. D. and S. M. Anderson (2008). "Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors." Breast Cancer Res **10**(1): 202.
- Young, J. D., S. Y. Yao, et al. (2013). "The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29." Mol Aspects Med **34**(2-3): 529-547.

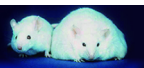
Z

- Zawarynski, P., T. Talerico, et al. (1998). "Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain." FEBS Lett **441**(3): 383-386.
- Zhang, D., W. Xiong, et al. (2011). "Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons regulates adenosine levels in physiological and hypoxic-ischemic conditions." J Neurochem **118**(1): 4-11.
- Zhang, J., F. Visser, et al. (2003). "Uridine binding motifs of human concentrative nucleoside transporters 1 and 3 produced in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Pharmacol **64**(6): 1512-1520.

- Zhang, W., G. Z. Cheng, et al. (2008). "RACK1 and CIS mediate the degradation of BimEL in cancer cells." J Biol Chem **283**(24): 16416-16426.
- Zhou, G., R. Myers, et al. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest **108**(8): 1167-1174.
- Zhu, Z. and J. K. Buolamwini (2008). "Constrained NBMPR analogue synthesis, pharmacophore mapping and 3D-QSAR modeling of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) inhibitory activity." Bioorg Med Chem **16**(7): 3848-3865.

Publicaciones





Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells

Lorena MEDINA-PULIDO*, Míriam MOLINA-ARCAS*¹, Carles JUSTICIA†‡, Eduardo SORIANO§, Ferran BURGAYA§, Anna M. PLANAS†‡ and Marçal PASTOR-ANGLADA*²

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona (IBUB), and CIBER EHD, 08028 Barcelona, Spain, †Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 08036 Barcelona, Spain, ‡Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain, and §Departament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona, and CIBER NED, 08028 Barcelona, Spain

Under several adverse conditions, such as hypoxia or ischaemia, extracellular levels of adenosine are elevated because of increased energy demands and ATP metabolism. Because extracellular adenosine affects metabolism through G-protein-coupled receptors, its regulation is of high adaptive importance. CNT2 (concentrative nucleoside transporter 2) may play physiological roles beyond nucleoside salvage in brain as it does in other tissues. Even though nucleoside transport in brain has mostly been seen as being of equilibrative-type, in the present study, we prove that the rat pheochromocytoma cell line PC12 shows a concentrative adenosine transport of CNT2-type when cells are differentiated to a neuronal phenotype by treatment with NGF (nerve growth factor). Differentiation of PC12 cells was also associated with the up-regulation of adenosine A₁ receptors. Addition of adenosine receptor agonists to cell cultures increased CNT2-related activity by a mechanism consistent with A₁ and A_{2A} receptor activation.

The addition of adenosine to the culture medium also induced the phosphorylation of the intracellular regulatory kinase AMPK (AMP-activated protein kinase), with this effect being dependent upon adenosine transport. CNT2-related activity of differentiated PC12 cells was also dramatically down-regulated under hypoxic conditions. Interestingly, the analysis of nucleoside transporter expression after experimental focal ischaemia in rat brain showed that CNT2 expression was down-regulated in the infarcted tissue, with this effect somehow being restricted to other adenosine transporter proteins such as CNT3 and ENT1 (equilibrative nucleoside transporter 1). In summary, CNT2 is likely to modulate extracellular adenosine and cell energy balance in neuronal tissue.

Key words: adenosine receptor, concentrative nucleoside transporter 2 (CNT2), hypoxia, PC12 cell, P1 purinergic receptor.

INTRODUCTION

Adenosine is a purine nucleoside that is widely distributed in the CNS (central nervous system) of vertebrates. It is a constitutive metabolite of all cells and, in addition, is involved in several biosynthetic pathways [1]. Moreover, adenosine exerts a dual role as a homeostatic modulator and a neuromodulator in the nervous system [2,3]. Adenosine mediates its effects via specific G-protein-coupled receptors: A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃. In brain, these receptors are located on neurons, astrocytes, microglia and endothelial cells [4–6]. Nevertheless, its neuromodulatory role appears to rely mostly on its balanced action on inhibitory A₁ and facilitatory A_{2A} receptors [7]. High extracellular adenosine levels have neuroprotective effects that are likely to be regulated by either extracellular synthesis or membrane transport processes, with control of extracellular adenosine being of utmost importance [8,9]. Nucleoside transporters have a major impact on extracellular adenosine levels and, consequently, on purinergic signalling. Two families of nucleoside transporters are known, namely CNTs (concentrative nucleoside transporters) [SLC28 (solute carrier 28 family)] and ENTs (equilibrative nucleoside transporters) (SLC29) [10–12]. Four ENT and three CNT subtypes have been cloned in mammals [13], which differ in their

substrate selectivity and their energy requirements. Some CNTs transport adenosine and other nucleosides into the cell in a secondary active manner, dependent upon the Na⁺ electrochemical gradient, whereas ENTs are facilitative transporters, which should mediate adenosine (and other nucleoside) translocation down the transmembrane substrate concentration gradient. In particular, ENT1 and CNT2 are good candidates to mediate adenosine uptake, since their expression is widespread and they show, comparatively, low *K_m* values for adenosine (40 μM and 8 μM for ENT1 and CNT2 respectively) [14–16]. However, CNT-type carriers are Na⁺-dependent concentrative transporters, with either one or two Na⁺ molecules per nucleoside being translocated [17–19]. Both properties, high affinity for adenosine and capacity to concentrate the nucleoside within cells, make CNT2 a suitable candidate to modulate extracellular adenosine levels.

Distribution of these transporters is not homogeneous among tissues, and their expression can be regulated at both the transcriptional and post-transcriptional levels [11,20]. Although ENT1 is thought to be broadly distributed and highly expressed in most tissues [13], it has been proposed that ENT2 would be the primary nucleoside transporter in rat brain [21]. Although CNT-type transporters were initially thought to be expressed mostly in epithelial tissues, *CNT1* and *CNT2* transcripts have been

Abbreviations used: ACC, acetyl-CoA carboxylase; AICAR, 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside 1-β-D-ribofuranoside; AMPK, AMP-activated protein kinase; CNS, central nervous system; CNT, concentrative nucleoside transporter; CPA, N⁶-cyclopentyladenosine; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; ENT, equilibrative nucleoside transporter; MAP2, microtubule-associated protein 2; MCA, middle cerebral artery; MCAO, MCA occlusion; NECA, 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; NGF, nerve growth factor; NHS, neonatal horse serum; NMDG, N-methyl-D-glucamine; R-PIA, (–)-N⁶-(2-phenylisopropyl)adenosine; SLC, solute carrier family.

¹ Present address: Signal Transduction Laboratory, Cancer Research UK London Research Institute, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LY, U.K.

² To whom correspondence should be addressed (email mpastor@ub.edu).

detected in rat brain [22], *CNT2* cDNA has been cloned from a rat blood–brain barrier library [23], *CNT3* mRNA has been detected by Northern blot analysis [18], *CNT2* mRNA has been mapped by *in situ* hybridization [24] and *CNT2* cDNA has been detected and its related transport measured in rat neurons and astrocytes [25,26]. Several studies have suggested a link between *CNT2* and extracellular adenosine in epithelial tissues. We have observed that *CNT2* function in rat hepatocytes can be transiently stimulated by A₁ receptor activation, by a mechanism that relies upon K_{ATP} channels, thus linking adenosine and energy metabolism [27]. Extracellular adenosine has also been suggested to modulate intracellular energy metabolism in epithelial cells by activating AMPK (AMP-activated protein kinase), with this effect being dependent on transport, mostly accounted for by *CNT2* [28]. Moreover, hypotheses favouring a link between *CNT2* and energy metabolism have been reinforced by identifying GRP58 (glucose-regulated protein 58) and the glycolytic enzyme aldolase B as *CNT2*-interacting partners in hepatocytes [29].

In the present study, we have addressed the analysis of *CNT2* expression and function in neuronal models, as a way to investigate whether this transporter is regulated in a way similar to that described previously in peripheral tissues. In that case, *CNT2* would be an additional player in the regulation of extracellular adenosine concentrations and a major contributor to modulate adenosine-related function in the CNS.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

AICAR (5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside 1- β -D-ribofuranoside), formycin B, NBTI [*S*-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine], uridine, cytidine, guanosine and adenosine were obtained from Sigma–Aldrich. [5,6-³H]Uridine (35–50 Ci/mmol) was purchased from GE Healthcare. [5-³H(N)]Cytidine (21.5 Ci/mmol) and [8-³H(N)]guanosine (7 Ci/mmol) were purchased from Moravex Biochemicals.

Cell culture and neuronal induction medium

PC12 cells were maintained at 37°C/5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (BioWhittaker) supplemented with 5% (v/v) NHS (neonatal horse serum), 10% (v/v) FBS, 50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate. For neuronal induction, PC12 cells were seeded at 10⁴ cells/cm² on tissue culture dishes pre-coated with 0.01 mg/ml poly-D-lysine (Sigma–Aldrich). The cells were allowed to reach exponential phase growth (2 days). At that time, the medium was replaced by DMEM containing 2% (v/v) NHS, 50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 50 ng/ml NGF (nerve growth factor) (Sigma–Aldrich).

Nucleoside-uptake measurements

Uptake rates were measured as described previously [27] by exposing replicate cultures at room temperature (20–22°C) to each ³H-labelled nucleoside (1 μ M, 1 μ Ci/ml) in an uptake buffer (5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄ and 10 mM HEPES, pH 7.4), supplemented with either sodium chloride or NMDG (*N*-methyl-D-glucamine) (137 mM). Uptake assays were stopped at the indicated times by washing cells in an ice-cold stop medium [30], followed by immediate treatment of cells with 100 μ l/well 0.5% Triton X-100 in 100 mM NaOH. Aliquots of 90 and 10 μ l

were used for radioactivity counting and protein determination by Bradford assay respectively.

To determine the effect and the specificity of purinergic modulation on nucleoside transport activity, cells were incubated for various times with the adenosine receptor agonists R-PIA [(–)-*N*⁶-(2-phenylisopropyl)adenosine] (10, 50 and 100 nM, 1, 10 and 100 μ M), CPA (*N*⁶-cyclopentyladenosine) (50 nM), NECA (5'-*N*-ethylcarboxamidoadenosine) (50 nM), CGS 21680 {2-[*p*-(2-carboxyethyl)phenethylamino]-5'-*N*-ethylcarboxamido adenosine} (5 nM and 50 nM) in the absence or the presence of adenosine receptor antagonists DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) (10 nM) or ZM 241385 {4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl) phenol} (10 nM). All these agonists and antagonists were purchased from Sigma.

Western blot analysis

Anti-phospho-AMPK, anti-AMPK, anti-phospho-ACC (acetyl-CoA carboxylase) and anti-ACC were purchased from Cell Signaling Technology and used at a dilution of 1/1000. An anti-(rat *CNT2*) polyclonal antibody raised in our laboratory was used at a dilution of 1/2000. Cell lysates were prepared from PC12 cells grown in 60-mm-diameter culture dishes by treatment with extraction buffer [50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 5 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate and Complete™ Mini protease inhibitor cocktail (Roche)]. The cell suspension was homogenized on ice by passing it 20 times through a 25-gauge needle, and cell debris was removed by centrifugation at 16000 *g* for 15 min. Protein extracts were separated on 10% (w/v) polyacrylamide gels and transferred on to Immobilon-P membranes (Millipore). Antibody binding was detected with an HRP (horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody using the ECL detection system (GE Healthcare).

Immunocytochemistry

PC12 cells were seeded at a concentration of 10⁴ cells/cm² on glass coverslips treated with poly-D-lysine and placed on 24-well plates. Cells were differentiated with 50 ng/ml NGF after 10 days and were washed twice with PBS, fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde/0.06 M sucrose for 15 min and washed with PBS/20 mM glycine for 10 min. For permeabilization, cells were treated with Triton X-100 (0.1% in PBS) for 10 min at room temperature and blocked with blocking buffer (10% goat serum in PBS and 0.1% Triton X-100) for 1 h at room temperature. Incubation with primary antibody against MAP2 (microtubule-associated protein 2) (1/500 dilution) was performed for 1 h at room temperature. Cells were washed for 10 min with PBS and incubated with secondary antibody (anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor® 488, 1/1000 dilution; Molecular Probes/Invitrogen) for 45 min at room temperature in the dark. Coverslips were rinsed twice with washing buffer for 10 min each time and mounted with medium suitable for immunofluorescence. Images were obtained using a Leica TCS SP5 microscope. Controls with irrelevant secondary antibodies conjugated to the same fluorophore and autofluorescence controls were used.

Reverse transcription-PCR and real-time PCR

Isolation of mRNA was performed after treatment using the SV Total RNA Isolation System (Promega Biotech), following the manufacturer's protocol. Total DNase-treated RNA (1 μ g) was used to generate cDNA using MMLV

(Moloney murine leukaemia virus) reverse transcriptase (Promega Biotech) and random hexamers (GE Healthcare) for reverse transcription. Quantitative real-time PCR was performed with the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the manufacturer's recommendations. Assays-on-Demand TaqMan probes (Applied Biosystems) for A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃, ENT1, ENT2, CNT3 and 18S (Rn00567668_m1, Rn00583935_m1, Rn00567697_m1, Rn00563680_m1, Rn00581622_m1, Rn00581977_m1 and Rn00590238_m1 respectively) were used. The primers and probes used to amplify CNT1 and CNT2 were designed using Primer Express software (Applied Biosystems) and are as follows. rCNT1: forward, 5'-CGACTCCCTCACAGTCACTCAA-3'; reverse, 5'-CTTCCGCTCTGCTTTGTTTCAG-3'; probe, 5'-CCACCTTCA-CCCTCCGGCAGG-3'. rCNT2: forward, 5'-TGCGGGAATCTGCATGTT-3'; reverse, 5'-CTCCAGCTACCGCACTGT-3'; probe, 5'-ATCCTCATCCTCTTTGCCTGCTCCAAA-3'. Relative quantification of gene expression was performed as described in the TaqMan user manual with 18S as an internal control.

Rat *in vivo* model of ischaemia in the brain

Focal brain ischaemia was induced by 90 min of intraluminal occlusion of the right MCA (middle cerebral artery) followed by reperfusion. Adult male Sprague–Dawley rats (Charles River) (300–350 g of body weight) were used. Animal experimentation was performed according to the local legislation (Decret 214/1997 of 30th of July by the 'Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya') under the approval of the Ethical Committee (CEEA) of the University of Barcelona, and in compliance with European legislation. Animals were kept under a 12 h light/12 h dark cycle, with controlled environmental conditions of temperature and humidity, and were given food and water *ad libitum*. Rats were anaesthetized with isoflurane in a mixture of O₂ and N₂O (30:70, v/v) and intubated through the trachea for controlled ventilation. The common and external carotid arteries were exposed and the pterigopalatine artery was ligated. A filament nylon monofilament 4/0 LOOK™ suture (Harvard-Apparatus), heat-rounded at the tip, was introduced through the external carotid artery to the level where the MCA branches out and a ligature was placed on the internal carotid artery. The ligature was taken off and the filament was cautiously removed 90 min after occlusion to allow reperfusion. Sham-operated rats were subjected to the same surgical procedures and the filament was introduced in the MCA, but was immediately removed to avoid induction of ischaemia while carrying out the surgical interventions. Rats were allowed to recover from the anaesthesia and, 8 h after surgery, were deeply anaesthetized with isoflurane and perfused through the heart with saline to remove blood from the brain vessels. The parietal cortex of the ipsilateral and contralateral hemispheres was dissected out and immediately frozen for further RNA extraction.

RESULTS

CNT2 concentrative transport in neurons and neuronal cell lines

Our first attempts to detect a CNT2-type transport activity in primary cultures of either embryonic forebrain or early postnatal cerebellum neurons confirmed that this biological activity could indeed be identified, but results lacked enough reproducibility, with concentrative transport activity being sometimes easily detected, but absent from other assays (results not shown). This is consistent with our own experience in most primary cultures which rapidly lose CNT function, with CNT expression being a

typical feature of differentiated cell types [31]. Considering the need for a reliable easily reproducible cell system in which to study CNT2 regulation, we checked several available neuronal cell lines and we identified PC12 pheochromocytoma cells as the best model for that purpose. After culturing these cells with NGF, they extend long neurites and undergo biochemical changes, characteristic of mature sympathetic neurons [32,33]. We thus differentiated PC12 cells using standard procedures (see the Materials and methods section). Morphological changes were evident and neural differentiation was proved further by checking cultures for anti-MAP2 immunoreactivity (Figure 1A).

PC12 cell differentiation associated with sustained changes in the mRNA amounts encoding some nucleoside transporters, as measured by real-time PCR assays. Figure 1(B) shows that, whereas *ENT1* transcript levels increased during the differentiation process, the one coding for ENT2 decreased and that of CNT2 showed a tendency to increase. However, Western blot assays showed that CNT2 protein contents were higher in differentiated cells, at least since the fourth day after NGF administration (Figure 1C). This finding was supported further by transport uptake assays (Figure 2). Undifferentiated cells (day 0) did not show any measurable concentrative (Na⁺-dependent) transport, whereas at both 5 and 10 days after NGF administration, a concentrative-type activity was evident for uridine (a CNT1, CNT2 and CNT3 substrate) and guanosine (a CNT2 and CNT3 substrate), whereas cytidine (a CNT1 and CNT3 substrate) uptake was shown to be exclusively mediated by transporters of the equilibrative-type. This is consistent with CNT2 as the only CNT-type protein functionally expressed in differentiated PC12 cells. Thus Na⁺-dependent guanosine uptake was routinely used as a functional assay for CNT2-related function.

A₁ receptor regulation of CNT2 transport in PC12 cells

Owing to the importance of adenosine in neuronal tissues, we assessed whether PC12 differentiation was associated with changes in the expression of adenosine receptors. Undifferentiated PC12 cells contained mRNAs coding for all adenosine receptors characterized to date (A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃), as shown in Figure 3(A). Along differentiation, A_{2A}, A_{2B} and A₃ transcripts decreased, but, conversely, A₁ mRNA amounts increased up to 15-fold compared with control cells.

Interestingly, the activation of A₁ receptor by the agonist R-PIA (50 nM) induced a 2-fold increase in CNT2-type transport 15 min after its administration in differentiated PC12 cells after 5 days of incubation with NGF (Figure 3B). However, dose–response assays revealed a bimodal curve (Figure 3C). This curve reached a first plateau when R-PIA was administered at nanomolar levels, and a second increase was seen when administered at micromolar levels. This double-pattern of R-PIA-dependent stimulation of CNT2-type transport is consistent with its activation by two different types of receptors (see the Discussion).

Several other adenosine receptor agonists and antagonists were also used for a better characterization of the receptors implicated in the increase in CNT2-related function. As shown in Figure 4(A), both A₁- and A_{2A}-preferring agonists were efficient stimulators of concentrative transport in PC12 cells. The selective A₁ antagonist DPCPX reversed the activation by R-PIA (Figure 4A); however, the A_{2A} antagonist ZM 241385 was also able to block CGS 21680-induced activation of CNT2 (Figure 4B). Altogether, these data suggest that, although A₁ and A_{2A} trigger generally antagonist signals, activation of both receptors transiently increases CNT2 function.

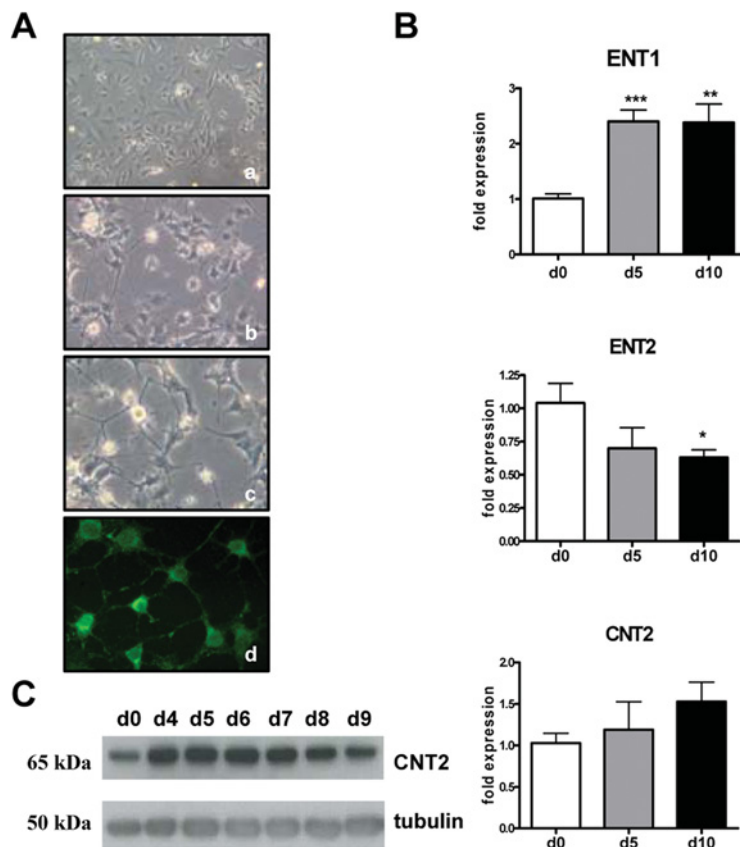


Figure 1 Nucleoside transporter expression in differentiated PC12 cells

(A) PC12 cell line derived from pheochromocytoma cells. This line responds to NGF, which induces neurite outgrowth and allows the differentiation of PC12 cells in sympathetic-like neurons. Undifferentiated PC12 cells (a), differentiated PC12 cells after 5 (b) and 10 (c) days of incubation with 50 ng/ml NGF. Immunocytochemistry of differentiated PC12 cells with an anti-MAP2 antibody; a differentiation marker of cytoskeleton (d). (B) Real-time PCR assays were performed for rat ENT1, ENT2 and CNT2 using cells at day (d) 0, 5 and 10 of differentiation. Results (means \pm S.E.M.) are from at least three independent experiments. The statistical significance was assessed by Student's *t* test: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. (C) Representative immunoblot of CNT2 (~65 kDa) protein levels during the days (d) of differentiation is shown. Tubulin was used as a loading control. Molecular masses are indicated.

Adenosine uptake might be coupled to energy metabolism modulation

As indicated in the Introduction, CNT2 is a good candidate to mediate adenosine uptake. For this reason, we decided to analyse whether the presence of CNT2 activity in activated PC12 cells could affect energy metabolism. Extracellular addition of adenosine at a concentration of 10 μ M induced AMPK phosphorylation ~2-fold (Figure 5A). This effect was shown to be relatively rapid (it peaked 5 min after adenosine addition) (Figures 5A and 5E) and was totally reversed by adding 100 μ M formycin B, an inhibitor of CNT2-related transport (Figures 5B and 5E). Thus CNT2-mediated adenosine uptake appears to play a major role in the up-regulation of AMPK triggered by extracellular adenosine. In all of these experiments, 500 μ M AICAR was used as a positive control. AICAR is known to promote AMPK phosphorylation, as reproduced in the present study (Figure 5A). Interestingly, under conditions of CNT2 inhibition, AICAR still promoted AMPK phosphorylation, although the magnitude of the effect appeared to be lower than in the absence of formycin B (Figure 5B). This can be explained by the fact that, at very high concentrations, such as the ones used in the present study, other transporters might translocate AICAR. In fact, although no direct evidence of AICAR uptake via ENT1 has been found so far, its cytotoxicity in primary CLL (chronic lymphocytic leukaemia) cells is prevented when ENT1 activity is pharmacologically inhibited [34].

To determine whether the activation of AMPK triggered by adenosine could indeed be translated into known downstream targets of the kinase, we analysed ACC phosphorylation in differentiated PC12 cells undergoing AMPK activation after adenosine addition. Both adenosine and AICAR increased ACC phosphorylation (Figures 5C and 5F). This effect was prevented by adding 100 μ M formycin B, a CNT2 inhibitor (Figure 5D).

Concentrative transport during hypoxia

On the basis of the hypothesis that CNT2 function can modulate extracellular adenosine and the finding that CNT2 is in fact under purinergic control and thus can contribute to depletion of extracellular adenosine following adenosine receptor activation, experiments were designed to determine whether CNT2-related transport was sensitive to hypoxia in differentiated PC12 cells. Accordingly, the Na⁺-coupled transport of guanosine and uridine was measured either under standard conditions or following acute hypoxia (Figure 6). Basal transport activities in differentiated PC12 cells remained stable for 48 h, whereas, following differentiation of PC12 cells, 24 and 48 h of acute hypoxia (1% O₂) hindered Na⁺-dependent transport completely, no matter whether guanosine (Figure 6A) or uridine (Figure 6B) were used as substrates. Conversely, ENT1-type equilibrative transport was unaffected after culturing the cells under hypoxia (Figure 6C).

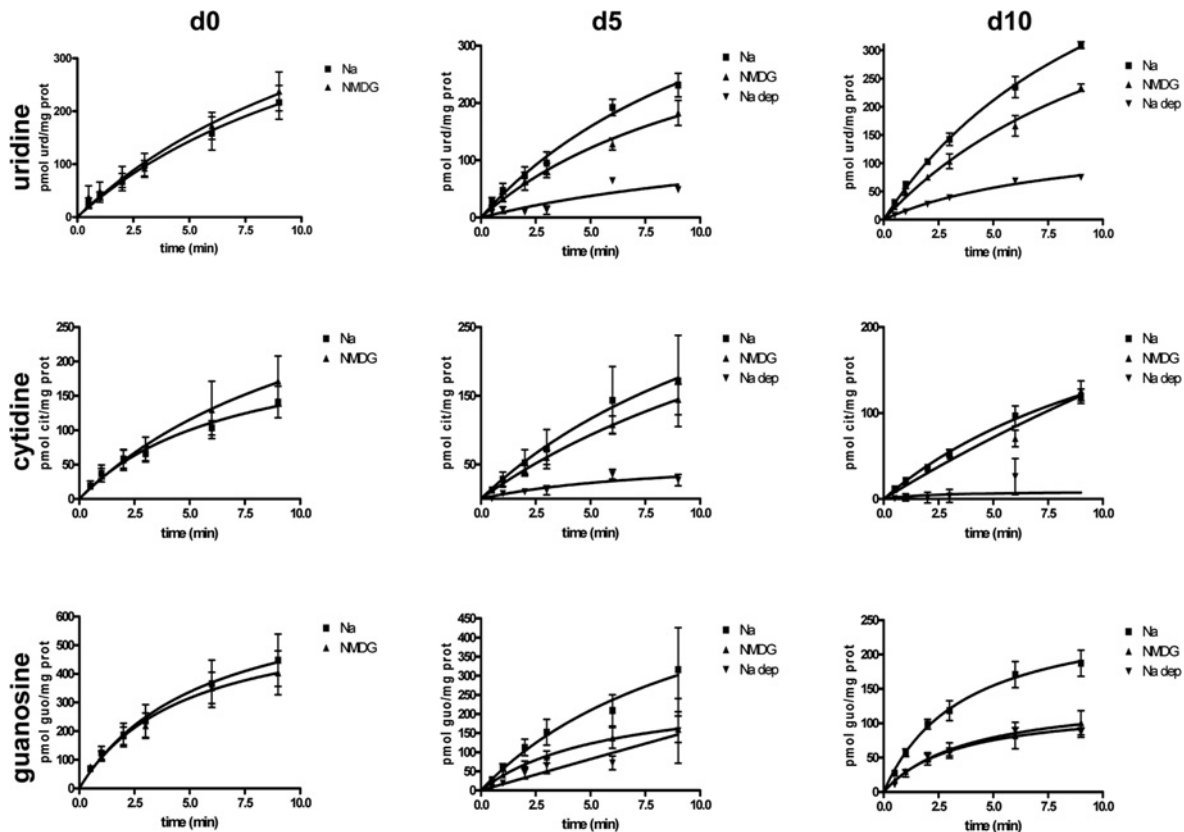


Figure 2 Time courses of different nucleosides in the different states of differentiation of PC12 cells

Cells were incubated with 1 μ M of each nucleoside in the presence (■) or absence (▲) of Na⁺. Na⁺-dependent (Na dep) nucleoside uptake (▼) is the difference between the two measurements. Results (means \pm S.E.M.) are from at least three independent experiments performed in quadruplicate.

Nucleoside transporter and adenosine receptor expression changes following brain ischaemia *in vivo*

A quantitative real-time PCR approach was used to study changes in the amounts of mRNAs encoding adenosine receptors and transporters during ischaemia *in vivo*. RNA extracts from either sham-operated animals or the contralateral hemisphere of infarcted rats were used as controls. As explained in the Materials and methods section, infarction was experimentally induced by MCAO (MCA occlusion) for 90 min. Amounts of mRNA for the five nucleoside transporters and the four adenosine receptor proteins were measured 8 h after reperfusion. As shown in Figure 7, significant decreases in mRNA levels were found after ischaemia exclusively for ENT1, CNT2 and CNT3, the three nucleoside transporter members able to efficiently transport adenosine, whereas *ENT2* and *CNT1* mRNA levels remained unmodified. Concerning the receptors, only the low-affinity receptor A₃ showed a marked decrease in mRNA levels after brain ischaemia, whereas A₁, A_{2A} and A_{2B} mRNA levels did not change.

DISCUSSION

Besides its role in nucleoside salvage and nucleotide biosynthesis, adenosine is a nucleoside implicated in cell signalling. The role of adenosine as an inhibitor of metabolism both in peripheral tissues as in brain is widely acknowledged [1,2,8]. Therefore adenosine dynamics can influence the metabolic status of, among others, neural tissue cells.

Although highly specialized tissues express functional CNT-type proteins [35], previous studies on neural tissue reported the occurrence of ENT proteins only, despite the presence of CNT transcripts in brain [23,24,36]. ENT1 is the only nucleoside transporter protein which has been comprehensively studied and mapped thanks, among other reasons, to the existence of high-affinity ligands for this particular isoform [37,38]. Moreover, the ENT1-null mouse model is the only one available so far among nucleoside transporter proteins and shows a CNS phenotype characterized by decreased hypnotic and ataxic responses to ethanol and greater consumption of alcohol, a feature that can be somehow reversed by A₁ receptor antagonists [39]. In a complementary manner, transgenic expression of human ENT1 in mouse brain results in altered behavioural responses to drugs known to affect adenosine signalling, such as caffeine and ethanol [40]. Moreover, when using hippocampal slices from these transgenic mice, it was shown that inhibition of excitatory neurotransmission following transient hypoxia or oxygen–glucose deprivation was reduced when compared with the wild-type [16], thereby suggesting that nucleoside transporters may be suitable pharmacological targets for the treatment of cerebral ischaemia. In any case, the apparently mild phenotype of the ENT1-null mice favours the view that adenosine concentrations in the brain might be also regulated by other transporter proteins, such as CNT2. Occurrence of CNT2 in the brain has been mapped at the mRNA level [23], and the CNT2 protein has recently been identified in plasma and vesicle membrane preparations from the rat striatum, thereby suggesting CNT2 is contributing to adenosine signalling in the brain [41].

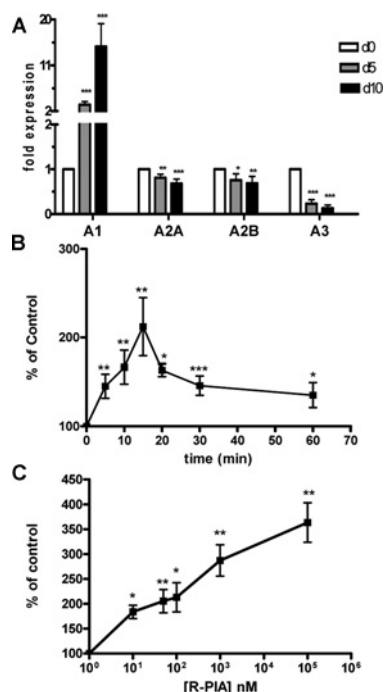


Figure 3 P1 receptor activation of CNT2 transport activity in PC12 cells

(A) Expression of adenosine receptors in PC12 cells at different stages of differentiation. PC12 cells were differentiated with 50 ng/ml NGF. Real-time PCR assays were performed for A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors using cells at day (d) 0, 5 and 10 of differentiation. The target gene expression was normalized by a housekeeping gene expression (18S). Results (means ± S.E.M.) are from four independent experiments. (B) Purinergic activation of CNT2. Na⁺-dependent guanosine uptake, mediated by CNT2, was monitored in differentiated PC12 cells after 5 days of incubation with 50 ng/ml NGF, after the addition of 50 nM R-PIA. (C) Na⁺-dependent guanosine uptake into differentiated PC12 cells was monitored after 15 min of treatment with R-PIA at various concentrations. Basal uptake rates were 15.4 ± 2.2 pmol of guanosine/min per mg of protein. Results (means ± S.E.M.) are from at least four independent experiments performed in quadruplicate, expressed as the percentage change above basal values. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

In the present study, we are showing that PC12 cells, when induced to differentiate by NGF, express functional CNT2 transporter proteins at the time cells show a neuronal phenotype. CNT2 was also identified by Western blotting as a protein of approximately 60–65 kDa. Its abundance was low before differentiation, but progressively increased along with cell differentiation, in parallel to what we observed when Na⁺-coupled nucleoside uptake was measured. The fact that this transport activity allowed the uptake of uridine and guanosine, but not cytidine, is consistent with a transporter protein of the CNT2-type.

Interestingly, PC12 differentiation also induced significant changes in adenosine receptor expression. Whereas the mRNA contents for the A_{2A} receptor and for the low-affinity A_{2B} and A₃ receptors decreased, the amounts of mRNA encoding the A₁ receptor, the more widespread receptor with the highest affinity for adenosine among P1 receptors, increased up to 15-fold after PC12 differentiation. Under those conditions, CNT2-related function was acutely up-regulated after the addition of A₁ receptor agonists. This would be consistent with extracellular adenosine up-regulating its own removal from the extracellular milieu via the A₁ receptor-mediated activation of CNT2. However, the bimodal curve of the R-PIA-triggered activation of CNT2 points towards other receptors mediating a similar response. In fact, the A_{2A} receptor appears to be an additional regulator of CNT2 function in differentiated PC12 cells. As reviewed recently, both A₁ and

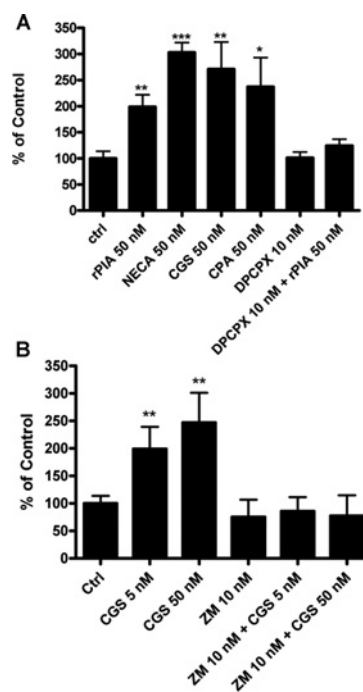


Figure 4 Selectivity of adenosine receptor activation of CNT2 function in PC12 cells

(A) Effect of adenosine receptor agonists and antagonists on CNT2 transport activity in differentiated PC12 cells, after 5 days of incubation with 50 ng/ml NGF. Na⁺-dependent guanosine uptake was monitored after 15 min of incubation with different adenosine receptor agonists (R-PIA, NECA, CGS 21680 and CPA, each at 50 nM). ctrl, control. Activation of Na⁺-dependent guanosine uptake into differentiated PC12 cells by R-PIA (50 nM) treatment for 15 min was antagonized by pre-incubation of cells for 30 min with A₁R antagonists (DPCPX at 10 nM). (B) Effect of A_{2A} receptor agonists and antagonists on CNT2 transport activity in differentiated PC12 cells, after 5 days of incubation with 50 ng/ml NGF. Na⁺-dependent guanosine uptake was monitored after 15 min of incubation with CGS 21680, a specific agonist of A_{2A} receptors, in either the presence or absence of pre-incubation with 10 nM ZM 241385, a high-affinity A_{2A} antagonist, for 30 min. Basal uptake rates were in the range of those summarized in the legend to Figure 3. Results (means ± S.E.M.) are from three independent experiments, expressed as the percentage change above basal values. Statistical significance was assessed by Student's *t* test: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. Agonists: R-PIA (50 nM), A₁ > A₃ > A_{2A} > A_{2B}; CPA (50 nM), A₁ > A₃ > A_{2A} > A_{2B}; NECA (50 nM), A₁, A_{2A}, A₃ > A_{2B}; CGS 21680 (50 nM), A_{2A} > A₃ > A₁ > A_{2B}. Antagonists: DPCPX (10 nM), A₁; ZM 241385 (10 nM), A_{2A}.

A_{2A} receptors are the most abundant and the two receptors which are likely to play major roles in adenosine action in the brain [7]. A_{2A} receptors have been shown previously to modulate the extracellular levels of adenosine through the regulation of ENT-related nucleoside transport processes in the rat hippocampus [42]. Since A₁ and A_{2A} receptors trigger antagonistic signals in target cells, but both appear to transiently activate CNT2 function, presumably promoting adenosine removal from the extracellular milieu, the role that CNT2 might play in adenosine modulation in the brain can presumably be highly dependent upon CNT2 regional distribution (currently poorly known) and A₁ and A_{2A} receptor localization. Moreover, the possibility that receptors and transporters might also share particular cellular and membrane microdomains or even interact themselves is still an open question in the field that warrants further work.

Adenosine is a putative neurotransmitter. To date, it is not clear whether it exists as a neuromodulator or due to ATP hydrolysis [43,44]. In agreement with adenosine action in peripheral tissues, adenosine contributes to a metabolic decrease in brain [1]. A common target for adenosine-mediated inhibitory signalling in peripheral tissues is AMPK. It has been shown that extracellular

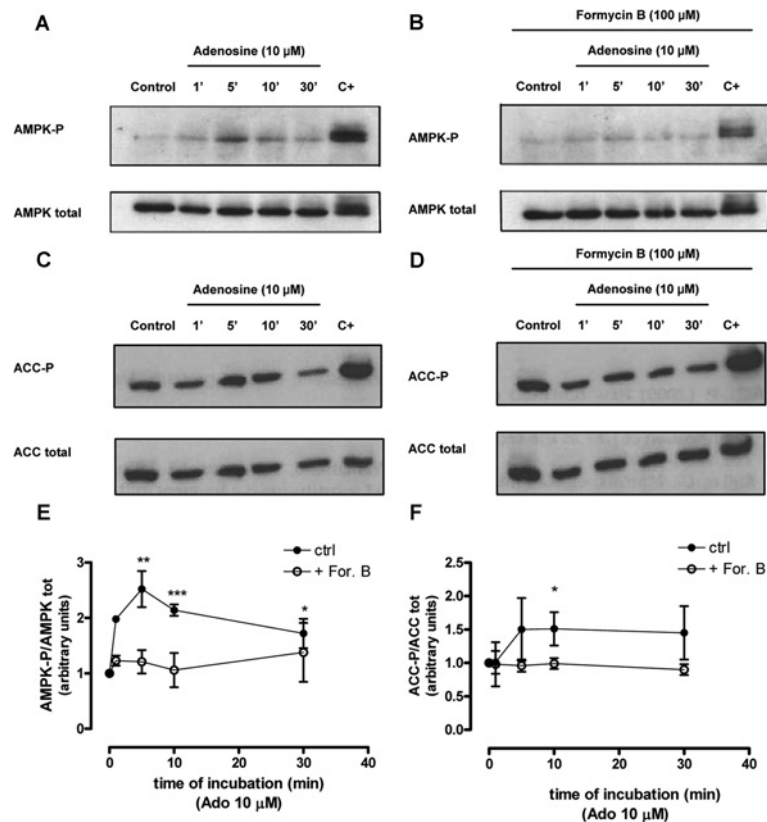


Figure 5 Adenosine activates AMPK in differentiated PC12 cells

(A) Phosphorylated AMPK (AMPK-P) and (C) phosphorylated ACC (ACC-P) protein levels were monitored by Western blotting. Differentiated PC12 cells were incubated in either the presence or absence of $10 \mu\text{M}$ adenosine or $500 \mu\text{M}$ AICAR (an allosteric activator of AMPK; C+) for different times and 1 h respectively. (B and D) CNT2-mediated adenosine transport is required for AMPK and ACC activation in differentiated PC12 cells. Cells were treated with $10 \mu\text{M}$ adenosine for different times, with pre-incubation of $100 \mu\text{M}$ formycin B (For. B) for 10 min. (E and F) The magnitude of the induction triggered was quantified densitometrically. Results (means \pm S.E.M.) are shown as arbitrary units normalized to control values (non-treated cells, ctrl). Total AMPK and total ACC were used as loading controls respectively.

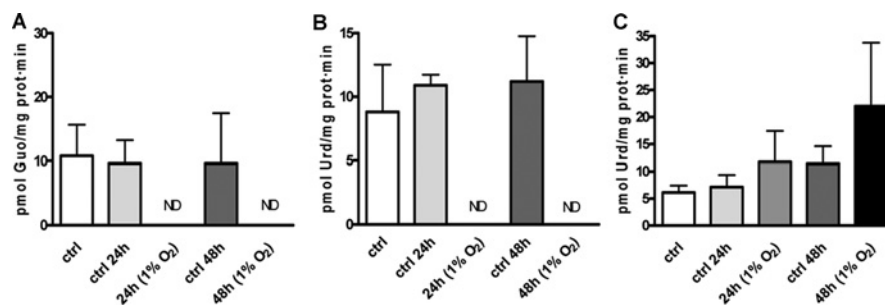


Figure 6 Effect of hypoxia on CNT2 transport activity

Na^+ -dependent guanosine (A) and uridine (B) and ENT1-mediated (C) uptake into differentiated PC12 cells was monitored after 24 and 48 h of exposure to acute hypoxic conditions (1% O₂). ENT1-mediated activity was measured as the $1 \mu\text{M}$ NBT1-sensitive uptake in choline chloride medium. Results (means \pm S.E.M.) are from triplicate measurements performed in three independent experiments. ND, not detected. This means that transport rates in the presence of the Na^+ transmembrane gradient was not different from these measured in its absence (NMDG). ctrl, control; prot, protein.

adenosine promoted AMPK phosphorylation on Thr¹⁷², and that this increase was dependent upon CNT2 function [28]. Interestingly, it has been reported recently that AMPK activation inhibits neuronal polarization [45]. The authors of this paper relate neuronal differentiation to energy metabolism. In fact, inhibition of AMPK has also been shown to be neuroprotective, for instance, under hypoxia (i.e. ictus among others) [46].

The functional link between adenosine uptake-related processes and energy metabolism has also been addressed in the present

study, first by determining the effect of hypoxia on nucleoside transporter function in differentiated PC12 cells and, secondly, by monitoring expression changes in adenosine transporters and receptors in a rat model of transient focal brain ischaemia. Adenosine-uptake processes are known to be repressed in intestine under hypoxic conditions, with HIF1 (hypoxia inducible factor 1) being a mediator of the down-regulation of *SLC29A1* and *SLC29A2* genes in endothelium and colon respectively [47]. Nevertheless, neither endothelium nor colon appears to express

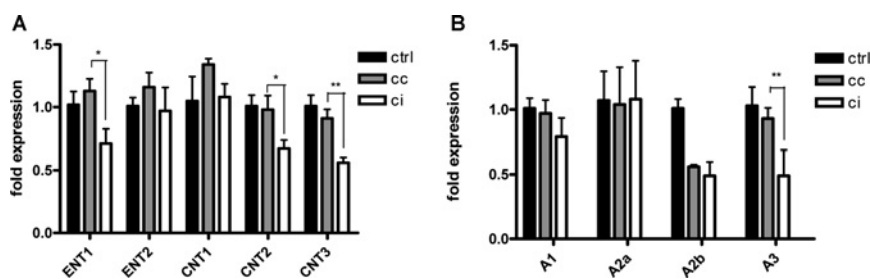


Figure 7 Expression of nucleoside transporters and adenosine receptors following brain ischaemia *in vivo*

Real-time PCR assays of nucleoside transporters (A) and adenosine receptors (B) were performed with RNA extracts from adult male Sprague–Dawley rats that suffered transient focal cerebral ischaemia (produced by intraluminal MCAO occlusion) of 90 min and 8 h reperfusion. ci, cortex ipsilateral (infarcted); cc, cortex contralateral; ctrl, sham-operated rats. Results (means \pm S.E.M.) are from experiments on five animals. The statistical significance was assessed by Student's *t* test: **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

CNT2-type transporters. In any case, as shown in the present study, the fact that hypoxia down-regulated CNT2 function in PC12 cells, without affecting ENT1-related activity, along with the *in vivo* observation that ischaemia selectively decreased the mRNA levels encoding adenosine transporters, such as ENT1, CNT2 and CNT3, highlights the possibility that not only ENT1, but also mostly the concentrative high-affinity adenosine transporter CNT2 plays a role in the modulation of extracellular adenosine concentrations. On the other hand, the occurrence of CNT3 in brain is also a finding that will require further analysis.

Taken together, our results are consistent with the view that extracellular adenosine levels might be regulated, at least in part, by the purinergic activation of CNT2 in differentiated neuronal-type PC12 cells. The possibility that A₁ and A_{2A} receptors contribute to deplete extracellular adenosine, although both, in principle, trigger antagonistic intracellular signals, should be analysed further in the context of the brain distribution of the whole purinome as well as on the possibility of functional flexibility associated with the formation of receptor heterodimers, as reported for these two receptors [48]. Moreover, down-regulation of CNT2, as shown in the *in vitro* and *in vivo* models of hypoxia/ischaemia used in the present study, would be also consistent with the need to inhibit adenosine-uptake processes, probably as a way to regulate energy metabolism via the decrease in the adenosine activator role on AMPK.

AUTHOR CONTRIBUTION

Lorena Medina-Pulido contributed in the design of the research, performed the experiments, analysed the results and prepared the paper. Miriam Molina-Arcas designed the experiments and analysed the results. Carles Justicia and Anna Planas contributed with the ischaemic *in vivo* model. Eduardo Soriano contributed in the discussion of the data. Ferran Burgaya and Marçal Pastor-Anglada designed the experiments, analysed the results and prepared the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ingrid Iglesias for technical support and Tanya Yates for linguistic advice.

FUNDING

This work was supported by Fundació La Marató de TV3 [grant number 062410], Ministerio de Economía y Competitividad, Spain [grant number SAF2011-23660] and Generalitat de Catalunya, Spain [grant number 2009SGR624] (to M.P.-A.). L.M.-P. holds a fellowship from PFIS (Instituto de Salud Carlos III, Spain).

REFERENCES

- Fredholm, B. B., Johansson, S. and Wang, Y. Q. (2011) Adenosine and the regulation of metabolism and body temperature. *Adv. Pharmacol.* **61**, 77–94
- Porkka-Heiskanen, T. and Kalinchuk, A. V. (2011) Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis. *Sleep Med. Rev.* **15**, 123–135
- Rebola, N., Pinheiro, P. C., Oliveira, C. R., Malva, J. O. and Cunha, R. A. (2003) Subcellular localization of adenosine A₃ receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res.* **987**, 49–58
- Fredholm, B. B., Ijzermann, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. and Linden, J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**, 527–552
- Klinger, M., Freissmuth, M. and Nanoff, C. (2002) Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell. Signalling* **14**, 99–108
- Gessi, S., Merighi, S., Varani, K. and Borea, P. A. (2011) Adenosine receptors in health and disease. *Adv. Pharmacol.* **61**, 41–75
- Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tome, A. R., Agostinho, P. M. and Cunha, R. A. (2011) Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 1380–1399
- Dunwiddie, T. V. and Masino, S. A. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 31–55
- Parkinson, F. E., Damaraju, V. L., Graham, K., Yao, S. Y., Baldwin, S. A., Cass, C. E. and Young, J. D. (2011) Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 948–972
- Molina-Arcas, M., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M. (2009) Nucleoside transporter proteins. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **7**, 426–434
- Baldwin, S. A., Beal, P. R., Yao, S. Y., King, A. E., Cass, C. E. and Young, J. D. (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflügers Arch.* **447**, 735–743
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Errasti-Murugarren, E. and Casado, F. J. (2008) SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica* **38**, 972–994
- Cabrita, M. A., Baldwin, S. A., Young, J. D. and Cass, C. E. (2002) Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 623–638
- Wang, J., Su, S. F., Dresser, M. J., Schaner, M. E., Washington, C. B. and Giacomini, K. M. (1997) Na⁺-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am. J. Physiol.* **273**, F1058–F1065
- Ward, J. L., Sheraili, A., Mo, Z. P. and Tse, C. M. (2000) Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells: ENT2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J. Biol. Chem.* **275**, 8375–8381
- Zhang, D., Xiong, W., Albensi, B. C. and Parkinson, F. E. (2011) Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons regulates adenosine levels in physiological and hypoxic-ischemic conditions. *J. Neurochem.* **118**, 4–11
- Larrayoz, I. M., Casado, F. J., Pastor-Anglada, M. and Lostao, M. P. (2004) Electrophysiological characterization of the human Na⁺/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J. Biol. Chem.* **279**, 8999–9007
- Ritzel, M. W., Ng, A. M., Yao, S. Y., Graham, K., Loewen, S. K., Smith, K. M., Hyde, R. J., Karpinski, E., Cass, C. E., Baldwin, S. A. and Young, J. D. (2001) Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cit). *Mol. Membr. Biol.* **18**, 65–72

- 19 Smith, K. M., Ng, A. M., Yao, S. Y., Labeledz, K. A., Knaus, E. E., Wiebe, L. I., Cass, C. E., Baldwin, S. A., Chen, X. Z., Karpinski, E. and Young, J. D. (2004) Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **558**, 807–823
- 20 Gray, J. H., Owen, R. P. and Giacomini, K. M. (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflügers Arch.* **447**, 728–734
- 21 Anderson, C. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., Cass, C. E. and Parkinson, F. E. (1999) Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain. *Mol. Brain Res.* **70**, 293–297
- 22 Anderson, C. M., Xiong, W., Young, J. D., Cass, C. E. and Parkinson, F. E. (1996) Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. *Mol. Brain Res.* **42**, 358–361
- 23 Li, J. Y., Boado, R. J. and Pardridge, W. M. (2001) Cloned blood–brain barrier adenosine transporter is identical to the rat concentrative Na⁺ nucleoside cotransporter CNT2. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 929–936
- 24 Guillen-Gomez, E., Calbet, M., Casado, J., de Lecea, L., Soriano, E., Pastor-Anglada, M. and Burgaya, F. (2004) Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *J. Neurochem.* **90**, 883–893
- 25 Nagai, K., Nagasawa, K. and Fujimoto, S. (2005) Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 1343–1350
- 26 Peng, L., Huang, R., Yu, A. C., Fung, K. Y., Rathbone, M. P. and Hertz, L. (2005) Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. *Glia* **52**, 25–35
- 27 Dufflot, S., Riera, B., Fernandez-Veledo, S., Casado, V., Norman, R. I., Casado, F. J., Lluis, C., Franco, R. and Pastor-Anglada, M. (2004) ATP-sensitive K⁺ channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A₁ adenosine receptors. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2710–2719
- 28 Aymerich, I., Foufelle, F., Ferre, P., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M. (2006) Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *J. Cell Sci.* **119**, 1612–1621
- 29 Huber-Ruano, I., Pinilla-Macua, I., Torres, G., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M. (2010) Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells. *J. Cell. Physiol.* **225**, 620–630
- 30 del Santo, B., Valdes, R., Mata, J., Felipe, A., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M. (1998) Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology* **28**, 1504–1511
- 31 Aymerich, I., Pastor-Anglada, M. and Casado, F. J. (2004) Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. *J. Gen. Physiol.* **124**, 505–512
- 32 Harrill, J. A. and Mundy, W. R. (2011) Quantitative assessment of neurite outgrowth in PC12 cells. *Methods Mol. Biol.* **758**, 331–348
- 33 Lee, K. H., Ryu, C. J., Hong, H. J., Kim, J. and Lee, E. H. (2005) cDNA microarray analysis of nerve growth factor-regulated gene expression profile in rat PC12 cells. *Neurochem. Res.* **30**, 533–540
- 34 Campas, C., Lopez, J. M., Santidrian, A. F., Barragan, M., Bellosillo, B., Colomer, D. and Gil, J. (2003) Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* **101**, 3674–3680
- 35 del Santo, B., Tarafa, G., Felipe, A., Casado, F. J. and Pastor-Anglada, M. (2001) Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *J. Hepatol.* **34**, 873–880
- 36 Anderson, C. M., Xiong, W., Geiger, J. D., Young, J. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A. and Parkinson, F. E. (1999) Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *J. Neurochem.* **73**, 867–873
- 37 Zhu, Z. and Buolamwini, J. K. (2008) Constrained NBMPR analogue synthesis, pharmacophore mapping and 3D-QSAR modeling of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 3848–3865
- 38 Governo, R. J., Deuchars, J., Baldwin, S. A. and King, A. E. (2005) Localization of the NBMPR-sensitive equilibrative nucleoside transporter, ENT1, in the rat dorsal root ganglion and lumbar spinal cord. *Brain Res.* **1059**, 129–138
- 39 Choi, D. S., Cascini, M. G., Mailliard, W., Young, H., Paredes, P., McMahon, T., Diamond, I., Bonci, A. and Messing, R. O. (2004) The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat. Neurosci.* **7**, 855–861
- 40 Parkinson, F. E., Xiong, W., Zamzow, C. R., Chestley, T., Mizuno, T. and Duckworth, M. L. (2009) Transgenic expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons. *J. Neurochem.* **109**, 562–572
- 41 Melani, A., Corti, F., Stephan, H., Muller, C. E., Donati, C., Bruni, P., Vannucchi, M. G. and Pedata, F. (2012) Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic *in vivo* conditions in the rat striatum. *Exp. Neurol.* **233**, 193–204
- 42 Pinto-Duarte, A., Coelho, J. E., Cunha, R. A., Ribeiro, J. A. and Sebastiao, A. M. (2005) Adenosine A_{2A} receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* **93**, 595–604
- 43 Cunha, R. A., Sebastiao, A. M. and Ribeiro, J. A. (1998) Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A₁ receptors. *J. Neurosci.* **18**, 1987–1995
- 44 Dale, N. and Frenguelli, B. G. (2009) Release of adenosine and ATP during ischemia and epilepsy. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 160–179
- 45 Amato, S., Liu, X., Zheng, B., Cantley, L., Rakic, P. and Man, H. Y. (2011) AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization. *Science* **332**, 247–251
- 46 Ronnett, G. V., Ramamurthy, S., Kleman, A. M., Landree, L. E. and Aja, S. (2009) AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *J. Neurochem.* **109** (Suppl. 1), 17–23
- 47 Eltzschig, H. K., Abdulla, P., Hoffman, E., Hamilton, K. E., Daniels, D., Schönfeld, C., Löffler, M., Reyes, G., Duszenko, M., Karhausen, J. et al. (2005) HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J. Exp. Med.* **202**, 1493–1505
- 48 Ciruela, F., Ferre, S., Casado, V., Cortes, A., Cunha, R. A., Lluis, C. and Franco, R. (2006) Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2427–2431

Received 14 February 2013/25 June 2013; accepted 3 July 2013

Published as BJ Immediate Publication 3 July 2013, doi:10.1042/BJ20130231

