



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Lligams funcionals i bioquímics entre els transportadors de nucleòsids i el metabolisme de nucleòtids

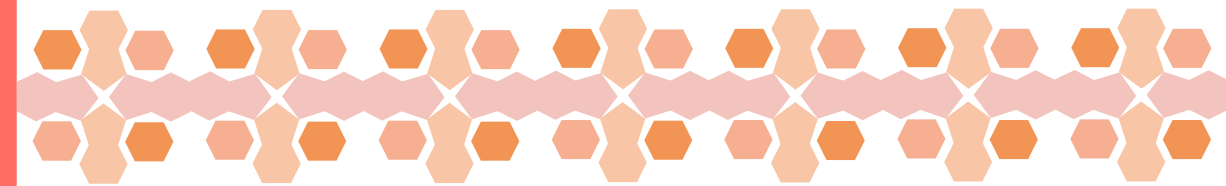
Catalina Maria Perelló Reus

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.

**Lligams funcionals i bioquímics entre
els transportadors de nucleòsids i el
metabolisme de nucleòtids**



Tesi doctoral

Catalina Maria Perelló Reus

2020





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat en Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

**Lligams funcionals i bioquímics entre els
transportadors de nucleòsids i el
metabolisme de nucleòtids**

Catalina Maria Perelló Reus

Barcelona, 2020

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

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR

FACULTAT DE BIOLOGIA

Lligams funcionals i bioquímics entre els transportadors de nucleòsids i el metabolisme de nucleòtids

Memòria presentada per:

Catalina Maria Perelló Reus

La interessada,

Vist i plau dels directors,

Dr. MARÇAL PASTOR ANGLADA

Catedràtic de Bioquímica i Biologia
Molecular

Departament de Bioquímica i
Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

Dra. SANDRA PÉREZ TORRAS

Investigadora CIBERehd

Professora Associada

Departament de Bioquímica i
Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

A sa meva família.

AGRAÏMENTS

Una vegada escrita la tesi arriba un moment de mirar endavant però no ho puc fer sense abans aturar un moment per pensar com he arribat fins aquí i totes les persones que heu estat al meu costat durant aquest procés. Vos vull agrair el que he après tant a nivell científic com a nivell personal durant aquests anys de la tesi.

Del laboratori, ho vull agrair als meus directors per l'oportunitat de desenvolupar la tesi i per tot el que he après. Així com també a tots els companys i companyes per les experiències que hem compartit durant aquests anys, dins i fora del laboratori.

La tesi no només queda al laboratori sinó que és un procés que va més enllà i està dins el dia a dia, per això també vull agrair el suport de les meves amistats pels moments de desconexió i per totes les vegades que m'heu hagut d'aguantar amb la tesi. Tant a Barcelona com a Mallorca, així com les que heu seguit el vostre camí a altres llocs però que vos sent molt a prop.

També vull donar les gràcies a la meva família pel suport incondicional que m'heu donat durant aquest procés i per l'exemple d'esforç i dedicació que he vist sempre i que he pogut aplicar en aquest projecte.

Durant aquest temps no només he fet la tesi sinó que també he trobat a la persona amb la que vull compartir la meva vida. Et vull agrair el costat que m'has fet tant amb la tesi com a nivell personal.

ABSTRACT

Maintenance of balanced nucleotide pools is necessary for cellular homeostasis. The nucleotide content of the cell is determined by the uptake of nucleosides by specific transporters, the salvage pathway and *de novo* synthesis of purine and pyrimidine nucleotides. These pathways are highly regulated at different levels and likely to be controlled by mechanisms allowing some sort of coordination among them. In order to decipher possible functional links within this machinery, in this work we have explored the relationship between nucleoside transporters and other elements of nucleotide metabolism. We have studied the interaction and the possible functional link of the human concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3) with ADK (adenosine kinase), SAMHD1 (sterile alpha-motif (SAM) and histidine-aspartate (HD) domain-containing protein 1) and QDPR (quinoid dihydropteridin reductase), all of them somehow related to nucleotide metabolism. Biochemical and functional validation of these interactions has evidenced the interconnection between CNT3 and the machinery implicated in nucleotide metabolism. Furthermore, nucleoside analogues are used in the treatment of cancer but they are often administered as pro-drugs. Their metabolic activation takes profit of different metabolic steps known to be implicated in nucleotide metabolism. Thus, changes in these pathways can be extremely relevant in determining drug activation and action in cancer therapy. Recently, combinations of the nucleoside analog Ara-C (cytarabine) and FMS-like tyrosine kinase (FLT3) inhibitors have been developed as first line treatments of acute myeloid leukemia (AML). We have observed that FLT3 positively correlates with enzymes implicated in Ara-C metabolism such as deoxycytidine kinase (dCK), 5'-nucleotidase cN-II and SAMHD1. We have also demonstrated a link among these elements associated with FLT3 inhibition which supports the possibility of coordinated regulation of different elements of the nucleotide metabolic network by this tyrosine kinase receptor. These observations also suggest that, to avoid chemoresistance, it is important to consider the schedule of administration of Ara-C and FLT3 inhibitors in the treatment of AML. Overall, this study provides novel evidence suggesting the existence of protein networks able to promote coordinate regulation of the machinery implicated in nucleotide metabolism.

LLISTAT D'ACRÒNIMS

5'-N: 5'-nucleotidases

5-MTHF: 5- metiltetrahidrofolat

ADA: adenosina desaminasa

ADK: adenosina quinasa

ADK-L: isoforma llarga d'adenosina quinasa

ADK-S: isoforma curta d'adenosina quinasa

ADSL: adenilsuccinat liasa

ADSS: adenilsuccinat sintasa

AICAR: aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid

AMP: adenosina monofosfat

APRT: adenosina fosforibosiltransferasa

Ara-C: arabinòsid de citidina, citarabina

ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid formiltransferasa / inosina monofosfat ciclohidrolasa

ATRA: *all trans retionic acid*

BH₂: dihidrobiopterina

BH₄: tetrahidrobiopterina

CAD: carbamoïlfosfat sintetasa II, aspartat carbamoïltransferasa i dihidroorotasa

CDA: citidina desaminasa

CDK: ciclina dependent de quinases

cN-II: 5'-nucleotidasa II

CNT: transportador concentratiu de nucleòsids

CoIP: coimmunoprecipitació

DA: desaminasa

dCK: desoxicitidina quinasa

DCTD: desoxicitidina monofosfat desaminasa

dFBS: sèrum fetal boví dialitzat

dGK: desoxiguanosina quinasa

DHF: dihidrofolat

DHFR: dihidrofolat reductasa

DHODH: dihidroorotat deshidrogenasa

DNA: àcid desoxiribonucleic

dNDP: desoxinucleòsid difosfat

dNMP: desoxinucleòsid monofosfat

dNTP: desoxinucleòsid trifosfat

EMA: agència europea del medicament,

FBS: sèrum fetal boví

FDA: *food and drug administration*

FLT3: *FMS-like tyrosine kinase 3*

FLT3L: lligand d'FLT3

fTHF: formiltetrahidrofolat

GMPS: guanosina monofosfat sintasa

HPA: hiperfenilalaninèmia

HPRT: hipoxantina fosforibosiltransferasa

IF: immunofluorescència

IMPDH: inosina monofosfat deshidrogenasa

ITD: *internal tandem duplication*

LLA: leucèmia limfàtica aguda

LLC: leucèmia limfàtica crònica

LMA: leucèmia mieloide aguda

MP: mercaptopurina

mRNA: RNA missatger

mtDNA: DNA mitocondrial

MTHFD: metilentetrahidrofolat deshidrogenasa

MTX: metotrexat

MYTH: *membrane yeast two hybrid*

NBTI: nitrobenziltioinosina

NDPK: nucleòsid difosfat proteïna quinasa

NK: desoxiribonucleòsid quinases

NMPK: nucleòsid monofosfat proteïna quinasa

NTP: nucleòsid trifosfat

PAH: fenilalanina hidroxilasa

PAICS: fosforibosilaminoimidazol carboxilasa i fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintasa

PFAS: fosforibosilformillicinamidina sintasa

PPAT: fosforibosilpirofosfat transformilasa

pRB: proteïna del retionoblastoma

PRPP: fosforibosil pirofosfat

PRPS: fosforibosilpirofosfat sintetasa

QDPR: *quinoid dihydropteridin reductase*

RNA: àcid ribonucleic

RNR: ribonucleòtid reductasa

SAH: S-adenosilhomocisteïna

SAM: S-adenosilmetionina

SAMHD1: *sterile alpha-motif (SAM) and histidine-aspartate (HD) domain-containing protein 1*

TG: tioguanina

THF: tetrahidrofolat

TK1: timidina quinasa 1

TK2: timidina quinasa 2

TM: transmembrana

TN: transportador de nucleòsids

TP: timidina fosforilasa

TS: timidilat sintasa

UMPS: uridina monofosfat sintetasa

WT: *wild type*

ZMP: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribòsid 5'-monofosfat

ZTP: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribòsid 5'-trifosfat

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
1. Nucleòtids i nucleòsids a la cèl·lula.....	1
2. Transportadors de nucleòsids.....	2
2.1. Transportadors concentratius de nucleòsids	2
2.2. Transportadors equilibratius de nucleòsids.....	4
2.3. Regulació dels transportadors de nucleòsids	5
2.4. Altres funcions dels transportadors concentratius de nucleòsids	9
3. Enzims implicats en la recuperació de nucleòtids	10
3.1. Recuperació de nucleobases	10
3.2. Recuperació de nucleòsids.....	10
4. Vies de síntesi <i>de novo</i>	12
4.1. Síntesi <i>de novo</i> de pirimidines.....	13
4.2. Síntesi <i>de novo</i> de purines	15
4.3. Complexos proteics en la síntesi <i>de novo</i> de nucleòtids.....	15
5. Síntesi de desoxiribonucleòtids. Ribonucleòtid reductasa.....	17
6. Regulació del metabolisme de nucleòtids	18
6. Implicació del metabolisme de nucleòtids en patologia	21
8. Antimetabòlits per al tractament del càncer	23
8.1. Tiopurines	25
8.2. Anàlegs de nucleòsids i nucleobases	25
OBJECTIUS	31
RESULTATS I DISCUSSIÓ	35
Bloc 1. Estudi de proteïnes d'interacció amb el transportador concentratiu de nucleòsids CNT3.....	35
Capítol 1. Relació bioquímica i funcional entre CNT3 i els enzims del metabolisme de nucleòtids ADK i SAMHD1.....	36
1. Estudi de la interacció amb ADK.....	37
1.1. Efecte de la interacció CNT3-ADK en l'activitat del transportador	40

1.2. Caracterització de la interacció de CNT3 amb la isoforma llarga d'ADK (ADK-L) i identificació dels residus de CNT3 implicats en la interacció.....	42
2. Estudi de la interacció amb SAMHD1	48
2.1. Interacció de CNT3 i SAMHD1 en fase G2/M	48
2.2. Efecte de la disminució de SAMHD1 en l'expressió i activitat dels transportadors de nucleòsids.....	52
Capítol 2. Validació bioquímica i funcional de la interacció entre CNT3 i QDPR.	60
1. Estudi de la interacció amb QDPR	63
1.1. Regulació de l'expressió entre QDPR i CNT3	73
1.2. Efecte de la sobreexpressió de QDPR sobre l'activitat dels CNTs	81
1.3. Estudi del possible paper fisiològic de la interacció entre CNT3 i QDPR.....	84
Bloc 2. Regulació d'elements del metabolisme de nucleòtids per FLT3 en leucèmia aguda pediàtrica.	93
1. Relació entre l'expressió de dCK i cN-II	97
2. Regulació d'elements del metabolisme de nucleòtids per FLT3.	102
DISCUSSIÓ GENERAL	115
CONCLUSIONS	127
MATERIALS I MÈTODES	131
1. Cultiu cel·lular	131
1.1. Manteniment dels cultius	131
1.1.1. Passatge de cèl·lules en monocapa.....	131
1.1.2. Passatge de cèl·lules en suspensió	132
1.2. Comptatge i sembra	132
1.3. Criopreservació i descongelació.....	133
1.4. Test de micoplasma	133
1.5. Inactivació del sèrum.....	134
1.6. Dialització del sèrum	134
1.7. Línies cel·lulars	134
1.7.1. Línies cel·lulars en monocapa.....	134
1.7.2. Línies cel·lulars en suspensió	135

1.8. Cultiu primari. Diferenciació de monòcits a macròfags	136
2. Biologia molecular.....	136
2.1. Subclonació.....	136
2.1.1. Digestió amb enzims de restricció.....	136
2.1.2. Lligació	137
2.2. Generació de bacteris competents	137
2.3. Transformació	138
2.4. Amplificació dels bacteris i aïllament del DNA plasmídic.	138
3. Manipulació dels nivells de proteïna	139
3.1. Transfecció.....	139
3.2. Silenciament.....	140
4. Anàlisi de l'expressió de proteïna.....	140
4.1. Extracció de proteïna a partir de cultius cel·lulars.....	140
4.1.1. Quantificació de proteïna pel mètode Bradford.	141
4.2. Electroforesi en SDS-PAGE	141
4.2.1. Preparació de les mostres.	141
4.2.2. Preparació dels gels de poliacrilamida.	142
4.2.3. Electroforesi.....	142
4.2.4. Western Blot	142
5. Anàlisi de la interacció de proteïnes.....	144
5.1. Coimmunoprecipitació (coIP).....	144
5.2. Immunodetecció de proteïnes per immunofluorescència.	144
5.2.1. En línies cel·lulars.....	145
5.2.2. En teixit congelat inclòs en OCT	146
6. Anàlisi de l'expressió d'mRNA	146
6.1. Extracció d'RNA	146
6.2. Quantificació d'RNA per espectrofotometria	147
6.3. Retrotranscripció	147
6.4. PCR a temps real	147

7. Assajos de transport de nucleòsids.....	149
7.1. Medis de transport i substrats radioactius.....	150
7.2. Assajos de transport en monocapa.	150
7.3. Valoració de la quantitat de proteïna	151
7.4. Càlculs	151
8. Assajos de viabilitat de cèl·lules en suspensió.....	152
9. Anàlisi del cicle cel·lular.....	152
10. Luciferasa	153
11. Anàlisi dels nivells de folats i aminoàcids	153
11.1. Anàlisi de 5-MTHF per HPLC	154
11.2. Anàlisi d'aminoàcids per UPLC-MS/MS.....	154
11.3. Anàlisi dels nivells de purines i pirimidines per UPLC-MS/MS	154
12. Tractament estadístic de les dades.....	155
13. Principis ètics.....	155
REFERÈNCIES	159
ANNEX	



INTRODUCCIÓ



INTRODUCCIÓ

1. Nucleòtids i nucleòsids a la cèl·lula

Els nucleòtids són la unitat estructural de l'àcid desoxiribonucleic (DNA) i l'àcid ribonucleic (RNA) de manera que són els monòmers de la informació genètica, són necessaris per a la replicació del genoma, la transcripció i la traducció. També són font d'energia, sent l'ATP la font d'energia universal i el GTP per un grup més selecte de processos biològics. A més, els nucleòtids conjugats com la UDP-glucosa participen en processos biosintètics com la síntesi de glicogen. Finalment, són els precursors de diferents cofactors i segons missatgers. Una característica comuna en la biosíntesi dels cofactors nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD⁺), flavina adenina dinucleòtid (FAD) i coenzim A (CoA) és la transferència d'una unitat d'AMP procedent d'ATP. Els nucleòtids cíclics com l'AMP cíclic i el GMP cíclic són segons missatgers que transmeten senyals tant a l'interior de la cèl·lula com entre cèl·lules. Els nucleòsids *per se* també poden dur a terme funcions importants. Per exemple, l'adenosina està implicada en la senyalització purinèrgica mitjançant la unió a receptors d'adenosina.

Els nucleòtids es componen d'una base nitrogenada, un sucre i almenys un grup fosfat. Els nucleòsids estan formats per una base nitrogenada i el sucre. Els nucleòtids es classifiquen segons aquests components (**Taula 1**). Les bases poden ser púriques – adenina (A) i guanina (G)- o pirimidíniques -citosina (C), uracil (U) i timina (T)-. Els sucres poden ser ribosa o desoxiribosa. Depenent del grau de fosforilació es generen nucleòtids mono-, di- o tri- fosfat.

		RNA		DNA	
Base		Ribonucleòsid	Ribonucleòtid	Desoxiribonucleòsid	Desoxiribonucleòtid
Purines	Adenina (A)	Adenosina	Adenilat (AMP)	Desoxiadenosina	Desoxiadenilat (dAMP)
	Guanina (G)	Guanosina	Guanilat (GMP)	Desoxiguanosina	Desoxiguanilat (dGMP)
Pirimidines	Uracil (U) /Timina (T)	Uridina	Uridilat (UMP)	Desoxitimidina	Desoxitimidilat (dTMP)
	Citosina (C)	Citidina	Citidilat (CMP)	Desoxicitidina	Desoxicitidilat (dCMP)

Taula 1. Nomenclatura de bases, nucleòsids i nucleòtids.

La cèl·lula presenta dos *pools* de nucleòtids: un citoplasmàtic i un mitocondrial, parcialment interconnectats. Tanmateix, en línies generals podem assumir que

serveixen per a la síntesi i reparació de DNA nuclear i mitocondrial, respectivament (Mathews 2006). Sorprenentment, els nivells de nucleòtids purínics i pirimidínics no són iguals tal i com s'esperaria per l'abundància de cada un dels nucleòtids en el DNA i l'RNA (Reichard 1988) sinó que els nivells de nucleòtids lliures són asimètrics amb representació diferent de cada un d'ells. Això suggereix un nivell no prou ben conegut de compartimentació subcel·lular ja que a efecte de síntesi d'àcids nucleics és necessari que els nivells dels diferents nucleòtids es mantinguin equilibrats. De no ser així es poden donar problemes en la replicació i reparació del DNA (Mathews 2015). Hi ha dos tipus de vies per a l'obtenció d'aquests nucleòtids: les vies de recuperació i les vies de síntesi *de novo*. La primera aprofita els productes de la dieta i de la degradació d'àcids nucleics (nucleòsids i nucleobases) i la segona sintetitza els nucleòtids de nou a partir d'unitats elementals (glucosa, aminoàcids, donadors de carboni), sent aquest procés més costós energèticament ja que a part de gastar ATP també fa servir substrats que podrien ser utilitzats per a altres vies metabòliques.

2. Transportadors de nucleòsids.

Els nucleòsids i les nucleobases són molècules hidrofíliques que no poden travessar lliurement la membrana plasmàtica. Per això, necessiten els transportadors de nucleòsids (TNs), proteïnes de membrana que permeten la seva entrada i sortida a la cèl·lula. En aquesta tesi es fa un èmfasi especial en aquestes proteïnes i la seva relació amb altres elements del metabolisme de nucleòtids. Els transportadors de nucleòsids pertanyen a la superfamília de proteïnes de membrana *SoLute Carriers (SLC)*. En concret, formen part de les famílies gèniques *SLC28* i *SLC29* que codifiquen els transportadors concentratius de nucleòsids (CNTs) i transportadors equilibratius de nucleòsids (ENTs), respectivament (**Figura 1**).

2.1. Transportadors concentratius de nucleòsids

La família de CNTs està formada per tres membres -CNT1, CNT2 i CNT3- codificats pels gens *SLC28A1*, *SLC28A2* i *SLC28A3*, respectivament. Catalitzen un transport unidireccional amb despesa energètica acoblada a l'ió sodi el que permet el transport del nucleòsid en contra de gradient. Presenten diferent estequiometria nucleòsid:Na⁺ sent 1:1 per CNT1 i CNT2 i 1:2 per CNT3 (Pastor-Anglada et al. 2008). Aquest últim, a més, pot fer servir un protó en lloc de sodi (Smith et al. 2005). L'afinitat d'aquests transportadors pel seu substrat es troba en el rang micromolar (μM) baix i la selectivitat de substrat és característica de cada un dels transportadors. El substrat que tenen en

La cristal·lització dels CNTs humans no s'ha dut a terme però se n'ha predit l'estructura a partir dels cristalls dels ortòlegs de *Vibrio Cholerae* (vcCNT) (Johnson, Cheong, and Lee 2012) i de *Neisseria wadsworthii* (CNT_{NW}) (Hirschi, Johnson, and Lee 2017). Els 8 dominis transmembrana procariotes juntament amb els tres dominis transmembrana addicionals i la cua N-terminal llarga que s'havien predit en eucariotes (Hamilton et al. 2001) fa que el model dels CNTs humans sigui d'11 dominis transmembrana i una cua N-terminal intracel·lular llarga (**Figura 2**). Aquesta cua consta de 83, 80 i 103 aminoàcids del total de 650, 659 i 691 aminoàcids que conformen CNT1, CNT2 i CNT3, respectivament (Pastor-Anglada et al. 2008). Aquesta adquisició evolutiva no està implicada en la funció transportadora (Hamilton et al. 2001) i es pensa que podria conferir noves funcions a aquests transportadors. La cristal·lització de vcCNT ha donat informació addicional i ha servit per fer altres prediccions com ara que la proteïna forma trímers, fet que s'ha confirmat experimentalment en el cas de CNT3 (Stecula et al. 2017). També s'ha utilitzat com a model per estudiar altres aspectes dels CNTs com descriure els residus implicats en la unió del segon ió sodi a CNT3 (Arimany-Nardi et al. 2017).

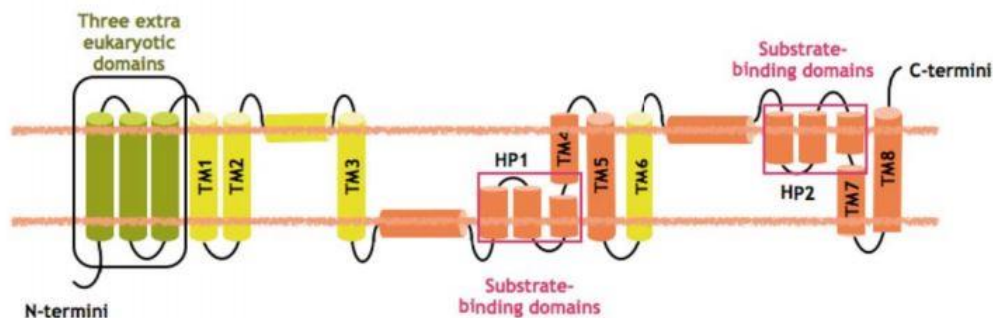


Figura 2. Model de l'estructura del CNT eucariota. Els CNT eucariotes han adquirit tres dominis transmembrana i una cua N-terminal llarga respecte a l'estructura del CNT procariota que presenta 8 dominis transmembrana. Tesi doctoral Cristina Arimany-Nardi. Basat en la cristal·lització de vcCNT (Johnson, Cheong, and Lee 2012).

2.2. Transportadors equilibratius de nucleòsids

La família d'ENTs està formada per quatre membres -ENT1, ENT2, ENT3 i ENT4- codificats pels gens *SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* i *SLC29A4*, respectivament. ENT1-3 presenten transport bidireccional a favor de gradient (**Figura 1B**). Són transportadors que transloquen una àmplia varietat de nucleòsids (Baldwin et al. 2004; Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015) amb afinitats més baixes que els CNTs i també s'encarreguen de la translocació de nucleobases, especialment ENT2 (Yao et al. 2011; Yao et al. 2002). ENT4 transporta adenosina amb baixa afinitat a pH àcid tot i tractar-se essencialment d'un transportador de cations orgànics (Barnes et al. 2006). Els dos membres millor

caracteritzats, ENT1 i ENT2, es poden diferenciar per la seva sensibilitat a l'inhibidor nitrobenziltioinosina (NBTI) sent més sensible ENT1 que ENT2 (Baldwin et al. 2004).

ENT1 i ENT2 es troben a la membrana plasmàtica i regulen els nivells de nucleòsids intracel·lulars i extracel·lulars. A més, aquests i els altres membres es troben en diferents localitzacions subcel·lulars. ENT1 està present en la membrana mitocondrial (Lai, Tse, and Unadkat 2004). Hi ha isoformes d'ENT2 (HNP32 i HNP36) que es troben a la membrana nuclear i recluten ENT2 a nucli per tenir els nucleòsids necessaris per la replicació del DNA fent que disminueixi la seva presència a la membrana plasmàtica (Grane-Boladeras, Spring, et al. 2016). ENT3 es localitza a lisosomes i probablement s'encarrega de la sortida de nucleòsids una vegada s'ha portat a terme la degradació dels nucleòtids que s'hi han incorporat (Baldwin et al. 2005; Wei et al. 2018). Aquest transportador depèn del medi àcid per dur a terme la seva funció tot i què no transporta protons. ENT3 també s'ha descrit a mitocondri (Govindarajan et al. 2009).

Recentment, s'ha cristal·litzat l'ENT1 humà (Wright and Lee 2019) i s'ha confirmat la topologia predita experimentalment (Sundaram et al. 2001). ENT1 està format per 11 dominis transmembrana amb la cua C-terminal extracel·lular i la cua N-terminal citoplasmàtica (**Figura 3**).

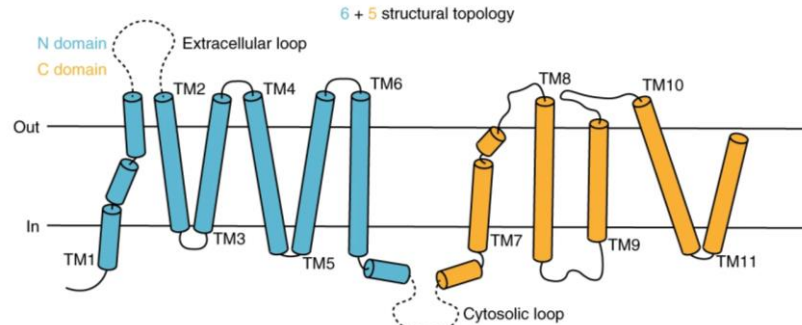


Figura 3. Diagrama de la topologia de l'estructura d'hENT1 cristal·litzada. hENT1 presenta 11 dominis transmembrana (TM) amb l'N-terminal a la part citosòlica i la C-terminal en la part extracel·lular. Presenta una topologia pseudosimètrica 6+5 que es divideix en el domini N-terminal (blau) i el domini C-terminal (taronja). També presenta dos *loops*, un extracel·lular entre els dominis TM1 i TM2 i un intracel·lular entre els dominis TM6 i TM7 (Wright and Lee 2019).

2.3. Regulació dels transportadors de nucleòsids

La regulació transcripcional dels transportadors de nucleòsids humans és poc coneguda. En general, l'expressió dels CNTs depèn de l'estat de diferenciació. Així en hepatòcits humans en cultiu s'ha observat que els nivells de CNT1 i CNT2 disminueixen per la pèrdua del fenotip hepàtic. Mitjançant estudis en la línia cel·lular de fetge BC2 que

es diferencia en cultiu, s'ha vist que l'expressió de CNT1 augmenta amb el temps i hi té un paper el factor HNF4 α . En canvi, els nivells de CNT2 depenen de l'acció coordinada dels factors C/EBP α i HNF3 γ (Fernandez-Veledo et al. 2007). HNF4 α s'uneix als dominis DR-1 del promotor del gen *SLC28A1* (que codifica CNT1), duent a terme la seva acció mitjançant la intervenció de dos cofactors: el coactivador PGC1- α i el corepressor induïble per àcids biliars SHP (Klein et al. 2009). Tot i que en el model d'hepatòcit no s'ha pogut estudiar l'expressió de CNT3 perquè no s'hi expressa, també s'ha vist que la seva expressió està relacionada amb la diferenciació. Els nivells de CNT3 augmenten en la línia cel·lular HL-60 diferenciada (Ritzel et al. 2001) així com en monòcits derivats de macròfags (Minuesa et al. 2008). També s'ha pogut observar un increment de CNT3 per l'acció d'aldosterona en la línia cel·lular de ronyó HK-2 (dades no publicades del grup). Actualment, en el nostre grup s'estan estudiant els elements reguladors de CNT1 (tesi doctoral Dra. Aida Mata).

Pel que fa als transportadors equilibratius, el més estudiat és ENT1. La seva expressió en general és més àmplia que la dels CNTs tot i que la seva regulació depèn del teixit i és diferent a la dels altres ENTs (Abdulla and Coe 2007). El promotor d'ENT1 presenta llocs d'unió a una gran varietat de factors de transcripció, entre ells ERE que regula la transcripció en la línia cel·lular MCF-7 (Abdulla and Coe 2007). PPAR α i PPAR γ augmenten els nivells d'mRNA i proteïna d'ENT1 en la línia cel·lular de càncer d'ovari A2780. A més, PPAR α augmenta el transport d'adenosina per part d'aquest transportador (Montero et al. 2012). Diferents situacions fisiopatològiques com la hipòxia i els nivells de glucosa poden regular els nivells d'ENT1 en cèl·lules endotelials. ENT1 permet regular els nivells d'adenosina en hipòxia. En aquesta situació HIF-1 α (*hypoxia inducible factor*) s'uneix al promotor d'ENT1 per disminuir els nivells d'expressió del transportador tant en teixit epitelial com endotelial, el que dona un augment d'adenosina que pot dur a terme el seu paper protector en situació d'hipòxia (Eltzschig et al. 2005). Els nivells elevats de glucosa disminueixen l'expressió i el transport d'adenosina en cèl·lules HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) (Puebla et al. 2008). En el tractament del càncer, els nivells d'ENT1 són importants ja que poden portar a quimiorresistència a anàlegs de nucleòsids. En leucèmia pediàtrica s'ha pogut observar que per la inhibició d'FLT3 disminueixen els nivells d'ENT1 el que provoca un menor efecte de la citarabina, un anàleg de nucleòsid que és substrat d'aquest transportador (Catala et al. 2016). En càncer pancreàtic ENT1 determina la resposta a la gemcitabina, un altre anàleg, utilitzat en primera línia en el tractament d'aquest tumor (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). S'ha vist que en aquest tipus de tumors els nivells d'ENT1 es regulen per ZIP4 a través de la via de senyalització ZEB1-integrina-JNK, de manera que

alts nivells de ZIP4 promouen menor expressió d'ENT1 (Liu et al. 2019). Aquest eix, a la vegada, també promou tumorogènesi i metàstasi.

S'han descrit formes dels transportadors de nucleòsids generades per *splicing* alternatiu. Les isoformes HNP32 i HNP39 d'ENT2 es troben a membrana nuclear i poden determinar els nivells d'ENT2 a membrana plasmàtica condicionant la seva activitat en aquesta localització, ja que poden formar oligòmers funcionals en la membrana nuclear interna que permeten l'entrada de nucleòsids al nucli en condicions proliferatives (Grane-Boladeras, Spring, et al. 2016). En canvi, per CNT3 existeix una forma més curta (CNT3ins) que queda retinguda al reticle endoplasmàtic (Errasti-Murugarren et al. 2009) que podria permetre l'entrada dels nucleòsids a l'espai intermembrana de la membrana nuclear preparats per a l'acció d'ENT2. Recentment, s'ha descrit una isoforma de CNT1 que està més expressada en càncer i podria servir com a marcador tumoral (Wang and Buolamwini 2019).

Els transportadors de nucleòsids també poden patir modificacions posttraduccionals que determinaran la seva funció així com la capacitat d'oligomeritzar. ENT1 i ENT2 es poden glicosilar en el *loop* entre els dominis TM1 i TM2 (Bicket and Coe 2016; Ward et al. 2003; Vickers et al. 1999). En el cas d'ENT1 la glicosilació en N48 determina la localització a membrana plasmàtica, la funció i l'oligomerització. La forma mutada que no es pot glicosilar disminueix la presència del transportador a membrana plasmàtica i el poc que s'expressa no presenta activitat (Bicket and Coe 2016). En canvi, en el cas d'ENT2 la glicosilació només determina la localització a membrana plasmàtica (Ward et al. 2003). Pel que fa als transportadors concentratius, CNT1 es pot glicosilar i es coneixen mutacions en aquest transportador que alteren la glicosilació i la vida mitjana de la proteïna. A més, es suggereix la formació d'oligòmers ja que la presència de la forma WT i mutada es manté l'activitat del transportador mentre que amb l'expressió de només formes mutades no (Perez-Torras et al. 2019).

S'han descrit múltiples llocs de fosforilació en el *loop* entre els dominis TM6 i TM7 d'ENT1 (Reyes et al. 2011), en concret PKC fosforila la S281 (Hughes et al. 2015). Recentment, s'ha estudiat més en detall la fosforilació d'ENT1 i ENT2 i la seva implicació funcional. ENT1 es pot fosforilar per PKA i PKC (Reyes 2011, Grane-boladeras 2019) i ENT2 per CK-II (Grane-Boladeras et al. 2019). La fosforilació pot determinar l'oligomerització dels transportadors que es pot traduir en oligòmers ENT1-ENT1, ENT2-ENT2 o ENT1-ENT2. En situacions basals ENT2 es troba per davall de la membrana plasmàtica. Per acció de PKC, la fosfatasa PP1 treu la fosforilació d'ENT2 i el transportador es col·loca a la membrana plasmàtica, el que permet la formació

d'oligòmers ENT1-ENT2. Això permet que es doni un canvi de perfil d'entrada de nucleòsids i nucleobases, ja que s'ha observat una disminució de l'entrada d'adenosina per part d'ENT1 i un augment de l'entrada d'hipoxantina per la presència d'ENT2 (Grane-Boladeras et al. 2019). Així es poden modular els nivells d'adenosina i els seus productes de manera ràpida, el que podria estar implicat amb la regulació purinèrgica. També s'ha descrit que la trimerització de CNT3 és crítica per a la seva estabilitat i la seva funció ja que en el monòmer hi ha parts hidrofíliques que estan en contacte amb la membrana plasmàtica. A més, la distància de translocació del substrat disminueix en el trímer respecte al monòmer (Stecula et al. 2017).

Adicionalment, s'ha descrit la modulació dels nivells dels transportadors a membrana plasmàtica per diferents mecanismes. La proteïna RS1 regula de manera coordinada els nivells de CNT1, CNT2 i CNT3 a membrana plasmàtica així com la seva activitat que es veu disminuïda per la presència d'RS1 (Errasti-Murugarren et al. 2012). En canvi, galectina 4 interacciona amb CNT3 i ajuda a la localització del transportador a membrana plasmàtica en cèl·lules de càncer de colon (Fernandez-Calotti et al. 2016). El transportador de nucleòsids CNT3 es regula per *all trans retinoic acid* (ATRA) en la línia cel·lular de leucèmia limfàtica crònica (LLC) MEC-1. ATRA induïx l'expressió i secreció de TFG- β 1, el qual provoca una ràpida translocació de CNT3 a la membrana plasmàtica, mitjançant un mecanisme que implica un augment de l'activitat ERK1/2 (Fernandez-Calotti and Pastor-Anglada 2010). Aquest tractament millora la resposta a fludarabina, fàrmac transportat per CNT3, en cèl·lules de CLL *ex vivo* que en condicions basals no presenten activitat de tipus CNT3 a la membrana plasmàtica (Fernandez-Calotti et al. 2012).

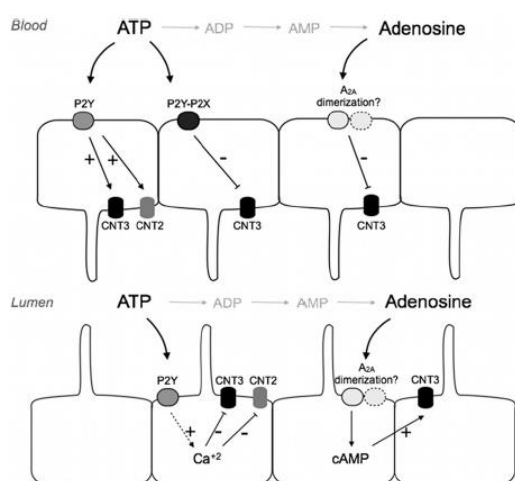


Figura 4. Representació esquemàtica dels passos pels que adenosina i ATP poden modular l'entrada d'adenosina luminal en colangiòcits de rat. Model simplificat que proposa els mecanismes pels que ATP i adenosina regulen els transportadors CNT2 i CNT3 en colangiòcits de rat (Godoy et al. 2014).

En models de rata, hi ha evidències que els transportadors de nucleòsids també poden estar regulats per senyalització purinèrgica. Pel que fa a rCNT2 això s'ha comprovat mitjançant l'activació dels receptors de tipus A1 a hepatòcits i A1 i A2A a neurones (Medina-Pulido et al. 2013; Duflo et al. 2004). En colangiòcits, el receptor d'adenosina d'alta afinitat A_{2A} només modula rCNT3, de manera diferent segons si la senyalització prové de la membrana apical o basolateral (**Figura 4**). També s'ha descrit l'efecte de l'ATP en l'activitat d'rCNT2 i rCNT3 mitjançant receptors de tipus P2Y (Godoy et al. 2014).

2.4. Altres funcions dels transportadors concentratius de nucleòsids

En eucariotes coexisteixen les dues famílies de transportadors de nucleòsids, els ENTs i els CNTs. El fet que s'hagin conservat les dues famílies de transportadors ens duu a pensar que poden tenir funcions addicionals a part del transport de nucleòsids. En concret, en els CNTs eucariotes s'han adquirit tres dominis transmembrana i una cua N-terminal llarga que no estan relacionats amb l'activitat transportadora, pel que els CNTs poden haver adquirit evolutivament altres funcions més enllà del transport (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2018a). En el nostre grup s'ha descrit CNT1 com a transceptor, concepte que ve de la contracció dels noms "transportador" i "receptor". Això implica que aquestes proteïnes també tenen un paper en senyalització dependent o independent de la funció transportadora. La restitució de CNT1 en línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic que no expressen el transportador és capaç de modular el cicle cel·lular, induir mort, disminuir la migració i modular vies de senyalització com PI3K/AKT/mTOR i MAPK/ERK (Perez-Torras et al. 2013). Aquestes funcions són independents de la seva capacitat transportadora ja que la restitució d'una variant mutada (CNT1S546P) que no transporta exerceix els mateixos efectes.

La presència de la llarga cua N-terminal intracel·lular que a més és estructuralment desorganitzada permet hipotetitzar que puguin unir proteïnes. De fet, l'interactoma dels transportadors és rellevant ja que la relació amb altres proteïnes els pot portar a adquirir funcions addicionals. En aquest sentit CNT2 està relacionat amb el metabolisme energètic. Mitjançant GST *pull-down* i assajos de doble híbrid en bacteri es van descobrir *Glucose-regulated protein 58* (GRP58) i aldolasa B com a possibles proteïnes d'interacció amb el transportador que podrien explicar aquesta relació. S'ha vist que GRP58 és un modulador negatiu de l'expressió i l'activitat de CNT2 i que aldolasa B, mitjançant una interacció transitòria, modula l'afinitat del transportador pels seus substrats (Huber-Ruano et al. 2010).

3. Enzims implicats en la recuperació de nucleòtids

Seguint amb la funció canònica dels transportadors de nucleòsids, aquestes proteïnes permeten l'entrada de nucleòsids i nucleobases. Gràcies al transport equilibratiu a favor de gradient, una vegada dins la cèl·lula els nucleòsids i nucleobases lliures poden tornar a sortir de la cèl·lula si la concentració intracel·lular és major que l'extracel·lular. Degut a això dins la cèl·lula es duen a terme reaccions de fosforilació en el cas dels nucleòsids i transferència en les nucleobases que generaran nucleòsids monofosfat. Aquests ja no poden ser transportats per aquestes proteïnes, queden retinguts dins la cèl·lula i són substrats de les següents reaccions metabòliques.

3.1. Recuperació de nucleobases

La recuperació de nucleobases consisteix en la generació del nucleòtid monofosfat a partir de la transferència de fosforibosil pirofosfat (PRPP). Aquesta reacció és més important en la recuperació de purines que de pirimidines, les quals depenen més de reaccions de fosforilació de nucleòsids (Nyhan 2014). Els enzims encarregats de catalitzar aquesta reacció són la hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT) que té com substrats la guanina o la hipoxantina de manera que genera GMP i IMP i l'adenina fosforibosil transferasa (APRT) que utilitza adenina i té com a producte final AMP (Figura 6B).

3.2. Recuperació de nucleòsids

Per recuperar els nucleòsids es duen a terme reaccions de fosforilació fins a la generació d'NTPs. El pas limitant és el primer pas de fosforilació que ve determinat pels cicles de substrat que es regulen per part del parell d'enzims desoxiribonucleòsid quinases (NK) i 5'-nucleotidases (5'-N) (Rampazzo et al. 2010) (Figura 5). En cèl·lules humanes trobem quatre desoxiribonucleòtid quinases, amb diferent localització subcel·lular. Els enzims citoplasmàtics són timidina quinasa 1 (TK1) i desoxicitidina quinasa (dCK) i els enzims mitocondrials timidina quinasa 2 (TK2) i desoxiguanosina quinasa (dGK). A cada compartiment, per l'acció combinada de les dues proteïnes presents es dona la fosforilació dels quatre desoxiribonucleòsids i, en menor mesura, també poden catalitzar les reaccions per als ribonucleòsids (Eriksson et al. 2002). Les 5'-nucleotidases I, II i III citosòliques (cN-I/II/III) s'encarreguen del pas de nucleòtids monofosfat a nucleòsids. cN-I presenta preferència per desoxinucleòsids monofosfat, sobretot de pirimidina, pel que té un paper en la regulació dels *pools* de desoxiribonucleòtids. cN-II és actiu sobretot per (d)IMP i regula els *pools* d'ATP i GTP. cN-III degrada l'RNA durant la maduració dels eritròcits, té preferència per ribo- més que

desoxiribonucleòtids de pirimidina i no actua en nucleòtids de purina. Aquestes dues últimes proteïnes (cN-II i III) també presenten activitat fosfotransferasa (Bianchi and Spychala 2003). També poden dur a terme aquesta reacció les 5'(3')-desoxinucleotidases, una present a citoplasma (cdN) i l'altra a mitocondri (mdN) (Bianchi and Spychala 2003). Els cicles de substrat també són importants per l'efecte dels anàlegs de nucleòsids que necessiten ser activats una vegada dins la cèl·lula (Eriksson 2013).

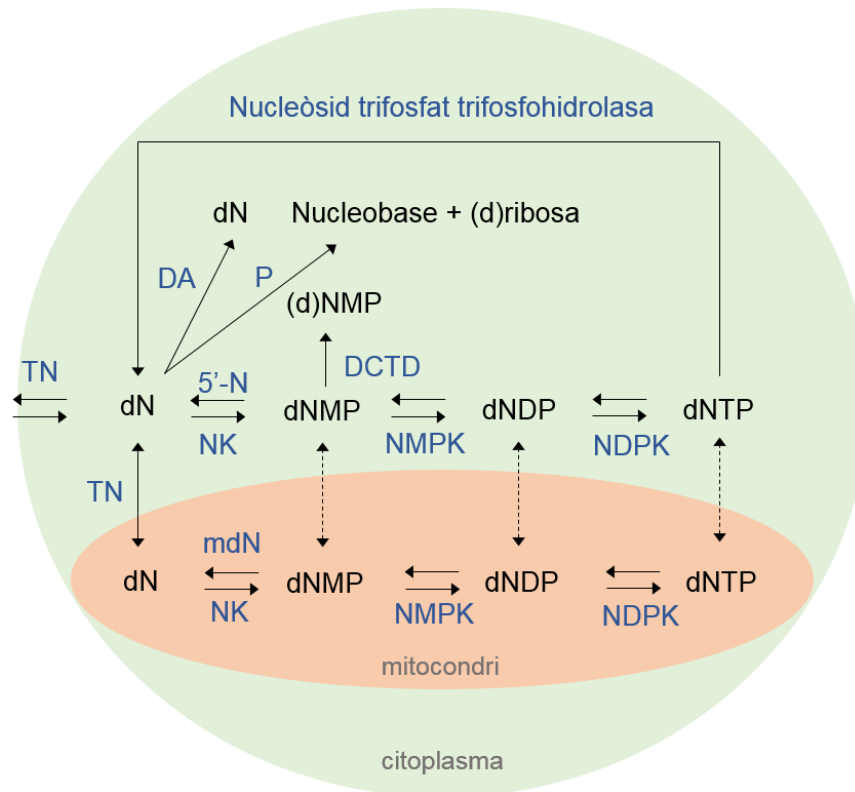


Figura 5. Esquema simplificat dels elements implicats en el metabolisme de recuperació de nucleòsids. Les cèl·lules presenten dos pools diferenciats de nucleòtids, el citoplasmàtic i el mitocondrial. Estan connectats entre ells a través de transportadors. Les cèl·lules poden incorporar nucleòsids ((d)N) del medi extracel·lular a través de transportadors de nucleòsids (TN). Tant al mitocondri com el citoplasma els nucleòsids són fosforilats per diverses quinases per generar nucleòtids. Els enzims necessaris són nucleòsid quinases (NK), nucleòsid monofosfat proteïna quinasa (NMPK) i nucleòsid difosfat proteïna quinasa (NDPK). Per treure el primer fosfat són necessàries 5'-nucleotidases (5'-N) al citoplasma i desoxinucleotidasa mitocondrial (mdN) al mitocondri. En el citoplasma també es donen reaccions de desaminació per part de desaminases (DA) i dCMP desaminasa (DCTD), sobre el nucleòtid també hi poden actuar fosforilases (P). dNMP: desoxinucleòsid monofosfat; dNDP: desoxinucleòsid difosfat; dNTP: desoxinucleòsid trifosfat. Esquema simplificat basat en (Camara et al. 2013).

Una altra nucleotidasa que permet regular els nivells de nucleòsids és l'ectonucleotidasa (eN o CD73) que desfosforila NMP fora de la cèl·lula (Bianchi and Spychala 2003)

regulant els nivells de nucleòsids disponibles per a l'entrada dins la cèl·lula a través dels transportadors de nucleòsids així com per la regulació purinèrgica.

Les nucleòsid monofosfat quinases (NMPK) catalitzen el segon pas de fosforilació (Figura 5). En el citosol UMP/CMP quinasa s'encarrega de sintetitzar nucleòtids de pirimidina (Van Rompay, Johansson, and Karlsson 1999) i per les purines podem trobar la guanilat quinasa i l'adenilat quinasa. En el mitocondri s'encarrega d'aquest pas de fosforilació l'UMP/CMP quinasa 2 (Xu, Johansson, and Karlsson 2008). La tercera reacció de fosforilació de ribonucleòtids i desoxiribonucleòtids és catalitzada per la nucleòtid difosfat quinasa (NDPK1) (Agarwal, Robison, and Parks 1978) (Figura 5).

També hi ha proteïnes que s'encarreguen de la inactivació dels nucleòtids. La proteïna amb *sterile alpha-motif (SAM) and histidine-aspartate (HD) domain-containing protein 1* (SAMHD1) presenta la funció desoxinucleòsid trifosfat trifosfohidrolasa, passant directament de nucleòtid trifosfat a nucleòsid (**Figura 5**). És rellevant per la restricció viral i la regulació dels nivells de desoxinucleòtids de la cèl·lula després de la divisió cel·lular (Goldstone et al. 2011). Presenta localització nuclear, on duu a terme la seva funció.

Les desaminases (DA) permeten passar d'un nucleòsid a un altre (Figura 5). La citidina desaminasa (CDA) s'encarrega de generar uridina i desoxiuridina a partir de citidina i desoxicitidina (Serdjebi, Milano, and Ciccolini 2015). L'adenosina desaminasa (ADA) està implicada en el metabolisme de purines catalitzant el pas d'adenosina i desoxiadenosina a inosina i desoxiinosina (Cristalli et al. 2001). També es pot dur a terme la desaminació de nucleòtids monofosfat com és el cas del pas de desoxicitidina monofosfat a desoxiuridina monofosfat que es dona per la dCMP desaminasa (DCTD) (William et al. 1982) (Figura 5).

Els nivells de nucleòsids també es poden regular per l'acció de fosforilases (P) (Figura 5). Pel metabolisme de purines es coneix la fosforilasa de nucleòsids de purina (PNP) i en el cas del metabolisme de pirimidines l'acció resideix en les proteïnes timidina fosforilasa (TP) i uridina fosforilasa (UP) (Pugmire and Ealick 2002).

4. Vies de síntesi *de novo*

La síntesi *de novo* de nucleòtids consisteix en la generació de nucleòtids a partir de molècules més senzilles que provenen d'altres vies. És més costosa energèticament que la recuperació i es dona sobretot en cèl·lules en divisió. La base púrica es sintetitza pas a pas directament sobre una estructura que conté ribosa, el fosforibosil pirofosfat (PRPP). En canvi, en el cas de les pirimidines la base es genera primer i seguidament

s'incorpora a la ribosa (Villa et al. 2019). El producte final és IMP en el cas de les purines i UMP en el cas de les pirimidines. Per generar els altres nucleòtids de cada família existeixen diverses reaccions a partir d'aquests nucleòtids sintetitzats *de novo*.

4.1. Síntesi *de novo* de pirimidines

La síntesi *de novo* de pirimidines consisteix en sis reaccions catalitzades per tres enzims, un d'ells mitocondrial, que donen com a producte final uridina monofosfat (UMP) (Evans and Guy 2004) (**Figura 6A**). El primer enzim de la via, carbamoil fosfat sintetasa II, aspartat carbamoil transferasa, i dihidroorotasa (CAD) duu a terme tres reaccions seqüencials per convertir glutamina a dihidroorotat. Aquest producte és oxidat a orotat en una reacció catalitzada per l'enzim mitocondrial dihidroorotat deshidrogenasa (DHODH). Seguidament, es donen les dues darreres reaccions de la via que estan catalitzades per l'enzim uridina monofosfat sintetasa (UMPS) que presenta l'activitat orotat fosforibosiltransferasa que permet afegir la ribosa activada a l'anell ja format i finalment es genera UMP per l'acció de l'ornitina monofosfat descarboxilasa d'aquest mateix enzim.

A partir de l'UMP es poden generar els altres nucleòtids de pirimidina. En primer lloc, UMP es fosforila i seguidament actuen enzims específics (**Figura 7**). Per l'acció de CTP sintasa es genera CTP a partir d'UTP. En el cas dels nucleòtids de timidina, no es generen en forma de ribonucleòtid sinó de desoxinucleòtid directament, fet que fa que només formi part del DNA i no de l'RNA. Es genera a partir de dUMP que s'haurà format per l'acció de la ribonucleòtid reductasa (veure apartat 5). La timidilat sintasa (TS) és l'enzim encarregat del pas de la reacció de metilació per generar dTMP a partir de dUMP. Una altra font de dUMP és la reacció de l'enzim dUTPasa que controla els nivells de dUTP generant dUMP. Un excés de dUTP podria fer que s'incorporés aquest nucleòtid enlloc de dTTP el que generaria errors al DNA (Nyiri et al. 2018).

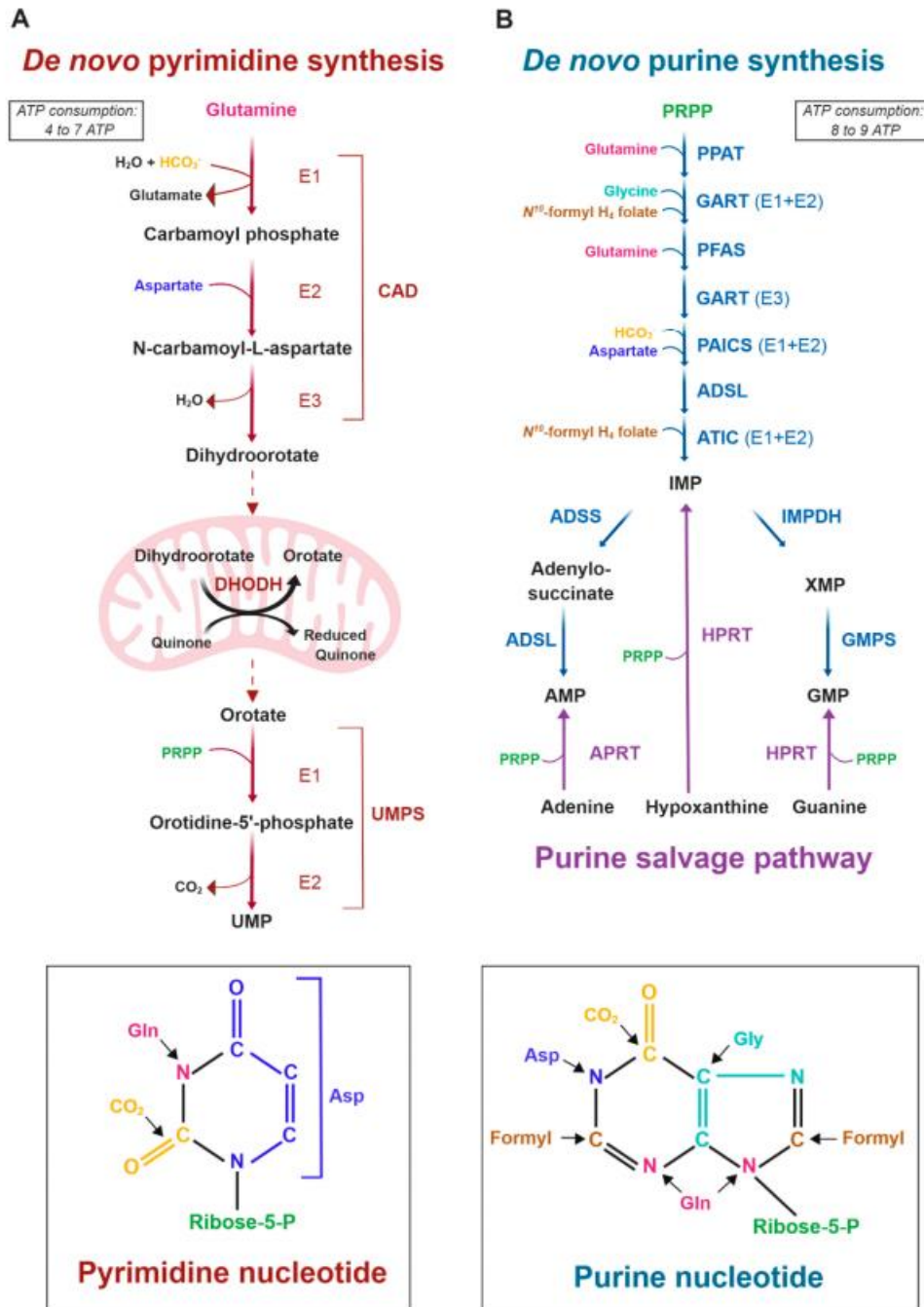


Figura 6. Vies de síntesi de purines i pirimidines. A) Representació esquemàtica de la via de síntesi *de novo* de pirimidines. Enzims de la síntesi *de novo* de pirimidines: CAD: carbamoïl-fosfat sintetasa 2, aspartat transcarbamilasa i dihidroorotasa; DHODH: dihidroorotat deshidrogenasa; UMPS: uridina monofosfat sintetasa. B) Representació esquemàtica de la via de síntesi *de novo* i recuperació de nucleobases de purines. Enzims de la síntesi de purines: PPAT: fosforibosilpirofosfat transformilasa; PFAS: fosforibosilformilflicinamidina sintasa; PAICS: fosforibosilaminoimidazol carboxilasa i fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintasa; ADSL: adenilosuccinat liasa; ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid formiltransferasa / IMP ciclohidrolasa; IMPDH: inosina monofosfat deshidrogenasa; GMPS: guanina monofosfat sintasa; ADSS: adenilosuccinat sintasa; HPRT: hipoxantina fosforibosiltransferasa; APRT: adenosina fosforibosiltransferasa (Villa et al. 2019).

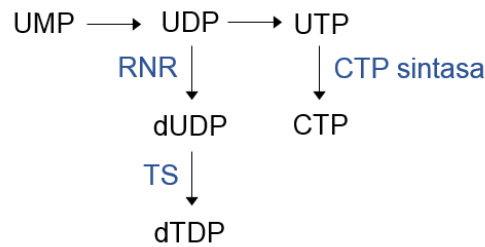


Figura 7. Enzims implicats en la generació de les altres formes de nucleòtids de pirimidina a partir del producte de la síntesi *de novo* UMP. RNR: ribonucleòtid reductasa; TS timidilat sintasa.

4.2. Síntesi *de novo* de purines

La síntesi *de novo* de purines es dona íntegrament en el citoplasma. Es realitza mitjançant deu reaccions enzimàtiques catalitzades per sis proteïnes (Pedley and Benkovic 2017) (**Figura 6B**). L'anell de purina es genera directament sobre la ribosa activada, PRPP. El producte final d'aquesta via és la inosina monofosfat (IMP) a partir de la qual es poden generar els altres nucleòtids purínics. El primer pas és catalitzat per la PRPP-amidotransferasa (PPAT). Seguidament, GART catalitza dues reaccions seqüencials. Seguit pel quart pas de la via que és catalitzat per la fosforibosil formilglicinamida sintetasa (PFAS). El cinquè pas de la via coincideix amb la tercera reacció de GART. Les següents reaccions estan catalitzades per l'enzim bifuncional fosforibosilaminoimidazol carboxilasa (CAIRS)/ fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintetasa (SAICARS) (PAICS). La vuitena reacció és reversible i està catalitzada per adenilosuccinat liasa (ADSL). Els dos darrers generen IMP gràcies a l'enzim bifuncional 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid formiltransferasa (AICAR Tfase)/IMP ciclohidrolasa (IMPCH) (ATIC).

IMP és convertit als altres nucleòtids purínics pels enzims inosina monofosfat deshidrogenasa (IMPDH) i guanosina monofosfat sintetasa (GMPS) en el cas de la guanosina monofosfat (GMP) i adenosilsuccinat sintetasa (ADSS) i adenilosuccinat liasa (ADSL) per generar adenosina monofosfat (AMP) (**Figura 6B**). La generació d'AMP requereix GTP i la generació de GTP necessita ATP de manera que això permetrà que hi hagi la mateixa proporció de cada un dels nucleòtids.

4.3. Complexos proteics en la síntesi *de novo* de nucleòtids

Molts dels enzims de la via de síntesi *de novo* de purines i pirimidines presenten estructures quaternàries que determinaran la seva activitat. S'ha descrit que GART forma dímers, PAICS octàmers i ADSL tetràmers. ATIC existeix en un equilibri monòmer-dímer. El dímer predomina quan el seu substrat aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid (AICAR) i el cofactor fTHF es troben presents, fet que dona

un augment de l'activitat de l'enzim (Vergis et al. 2001). En la síntesi de pirimidines, la proteïna multifuncional CAD forma hexàmers que es formen a partir de dos trímers que podrien millorar l'eficiència metabòlica de la via creant un canal per on poden passar els intermediaris entre les diferents funcions de la proteïna (Moreno-Morcillo et al. 2017). CAD és regulat al·lostèricament de manera positiva per ATP i PRPP i en canvi, s'inhibeix per UTP.

Un element comú en les vies de síntesi *de novo* de purines i pirimidines és la presència d'enzims multifuncionals. GART, PAICS i ATIC en la primera via i CAD i UMPS en la segona. A més, formen estructures més complexes. Els enzims de la síntesi de purines s'organitzen formant un complex multiproteic anomenat purinosoma (**Figura 8**), que es forma quan els nivells de purines disponibles són baixos (An et al. 2008). En aquestes condicions es dona la canalització dels substrats i productes de les reaccions fent-les més eficients així com protegint alguns intermediaris poc estables (Pedley and Benkovic 2017) o fins i tot tòxics com s'ha pogut observar en pacients que presenten mutacions en enzims de la via (Baresova et al. 2012). Aquesta macroestructura també permet explicar el fet de que una de les reaccions de GART no sigui seqüencial. En el cas de les pirimidines no s'ha descrit un complex similar però sí que s'ha pogut observar que CAD i UMPS es localitzen propers al mitocondri on es troba DHODH (Evans and Guy 2004). El purinosoma també colocalitza amb aquest orgànu, de manera dependent a mTORC1 (French et al. 2016). mTORC1, a la vegada, pot estimular la síntesi de purines mitjançant l'augment d'expressió de l'enzim MTHFD2 que s'encarrega de la síntesi de folats dins el mitocondri (Ben-Sahra et al. 2016).

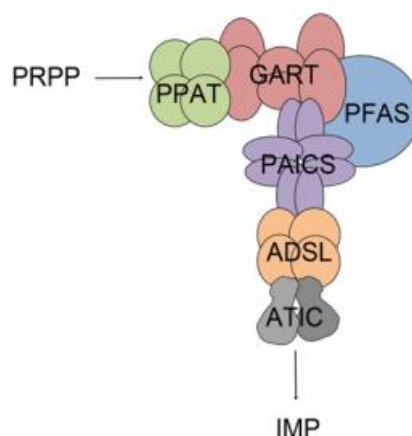


Figura 8. Representació esquemàtica del purinosoma (Baresova et al. 2018).

El metabolisme de folats s'encarrega de generar els donadors de carboni per diferents reaccions de síntesi de nucleòtids. Són necessaris per a la síntesi *de novo* de purines i per la generació de timidina en el metabolisme de pirimidines (**Figura 9**). Està format per reaccions tant mitocondrials com citoplasmàtiques (veure capítol 2 de resultats i discussió).

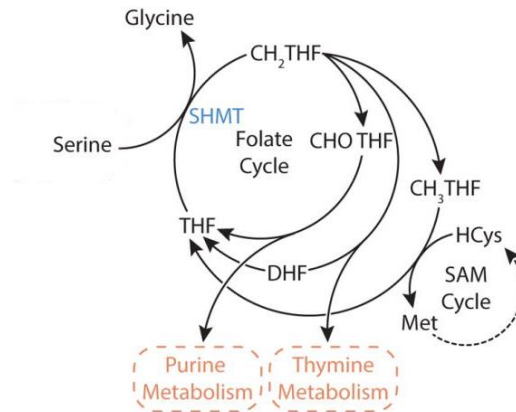


Figura 9. Elements del metabolisme dels folats necessaris per a la síntesi de novo de nucleòtids (Luengo, Gui, and Vander Heiden 2017).

5. Síntesi de desoxiribonucleòtids. Ribonucleòtid reductasa.

Per a la síntesi de DNA es generen desoxiribonucleòtids per l'acció de ribonucleòtid reductasa (RNR). Actua sobre els ribonucleòtids difosfat purínics i pirimidínics (Nordlund and Reichard 2006).

La RNR funcional és un heterotetràmer format per dues còpies de la subunitat llarga (R1) i dues de la subunitat curta (R2 o p53R2). R1 es tracta d'una proteïna amb una vida mitjana llarga i expressió constant. En canvi, R2 és degradada al proteasoma al final de la mitosi presentant nivells més alts d'expressió en la fase S, de manera que és la subunitat que limita l'activitat de la proteïna. Això fa que la síntesi *de novo* de desoxiribonucleòtids sigui específica de la fase S i es doni exclusivament en cèl·lules que cicleen. p53R2 està regulada per la proteïna supressora de tumors p53 i està implicada en la reparació del DNA després d'un dany (Tanaka et al. 2000). A més, juntament amb R1 permet que es doni síntesi *de novo* en cèl·lules que no estan en divisió, tot i que en menor mesura que en cèl·lules en divisió.

6. Regulació del metabolisme de nucleòtids

Degut a la importància del manteniment de l'equilibri dels *pools* de nucleòtids, el metabolisme d'aquests està altament regulat a diferents nivells. Depenent de les necessitats de la cèl·lula es regula tant el transport de nucleòsids com les vies de recuperació i de síntesi *de novo* de nucleòtids. En processos proliferatius la demanda de nucleòtids per sintetitzar DNA i RNA augmenta i s'afavoreixen les vies de síntesi *de novo* donat que la recuperació no és suficient per cobrir les necessitats de la cèl·lula.

Un mecanisme comú de regulació en una gran diversitat de vies metabòliques és la formació de homo- o hetero-oligòmers. Tant la formació o desacoblament de les subunitats com l'activitat d'aquestes proteïnes pot regular-se de forma al·lostèrica. Per a la regulació dels enzims també presenten canvis en els nivells d'mRNA, modificacions posttraduccionals i canvis depenent de la fase del cicle cel·lular en què es troben.

Trobam exemples de modulació al·lostèrica i canvis en l'expressió depenents de cicle cel·lular en diferents punts de les vies de síntesi de nucleòtids. Com és el cas de les quinases encarregades del primer pas de fosforilació de les vies de recuperació (Eriksson et al. 2002) i enzims de les vies de síntesi *de novo* de nucleòtids (Lane and Fan 2015). L'entrada dels nucleòsids a la cèl·lula també està regulada pel cicle cel·lular, tal i com s'ha descrit per als transportadors CNT1 i ENT1 (Baldwin et al. 2004; Valdes, Casado, and Pastor-Anglada 2002).

El fet de que es regulin de manera al·lostèrica fa que els canvis en algun dels elements d'aquestes vies puguin tenir efecte sobre els altres ja que s'estan variant els nivells de substrats o productes que poden regular els enzims implicats. Per això estan finament regulats. No s'explicarà en detall la regulació de tots els enzims que formen part del metabolisme de nucleòtids sinó que ens centrarem en l'exemple de dos enzims importants en la generació i degradació dels diferents desoxiribonucleòtids de manera que la seva regulació dona canvis importants en el contingut global de dNTPs de la cèl·lula. La RNR s'encarrega de la síntesi de dNTPs que es faran servir per a la replicació del DNA. Per aquesta raó, els seus nivells estan augmentats durant la fase S (Reichard 1988). Una vegada s'ha sintetitzat el DNA, SAMHD1 s'encarrega de disminuir els nivells de dNTPs que ja no són necessaris i podrien arribar a ser perjudicials si s'acumulen, per això els nivells de SAMHD1 augmenten en fase G1 (Franzolin et al. 2013). D'aquesta manera RNR i SAMHD1 es regulen de manera coordinada per així aconseguir els dNTPs necessaris per la cèl·lula. Un altre aspecte important és el manteniment dels nivells equilibrats de cada un dels dNTPs, per això tant RNR com SAMHD1 presenten un sistema de regulació al·lostèrica complex. Presenten un primer

lloc al·lostèric que permet l'activació de l'enzim i està involucrat en l'oligomerització de les diferents subunitats, s'activa per ATP en el cas de la RNR i per GTP o dGTP en el cas de SAMHD1 (**Figura 10**) (Ji et al. 2014; Hofer et al. 2012). També poseeixen un segon lloc al·lostèric amb diferent afinitat per cada un dels dNTPs que s'encarrega de mantenir l'equilibri entre els dNTPs. En el lloc catalític s'hi poden unir els diferents nucleòtids, en el cas de SAMHD1 es tracta també de dNTPs però amb afinitat inversa que en el segon lloc al·lostèric (Ji et al. 2014). En el cas de RNR, els substrats del lloc catalític són NDPs.

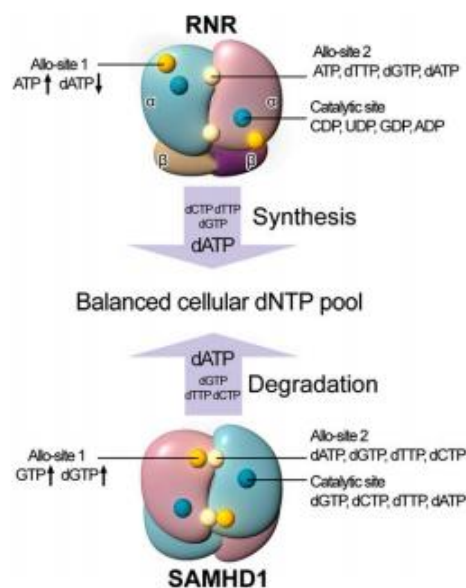


Figura 10. RNR i SAMHD1 regulen el *pool* cel·lular de dNTPs conjuntament. RNR i SAMHD1 són responsables de la producció i degradació de desoxinucleòtids trifosfat (dNTPs), respectivament. Les dues presenten tres llocs d'unió de nucleòtids: el primer lloc de regulació al·lostèrica (allo-site 1), el segon lloc de regulació al·lostèrica (Allo-site 2) i el lloc catalític. La concentració cel·lular de dNTPs es detecta i es regula pels dos enzims, dATP és el darrer que es genera per RNR i també és el darrer que es degrada per SAMHD1 (Ji et al. 2014).

Per altra banda, la regulació dels enzims d'aquestes vies es pot donar per senyals que provenen de fora de la cèl·lula. En concret, la síntesi *de novo* de nucleòtids s'activa en processos proliferatius per cobrir la demanda de síntesi de DNA i RNA. De la mateixa manera, diversos estudis mostren que la síntesi que es requereix per a la proliferació de cèl·lules canceroses està directament regulada per oncogens i supressors de tumors. La regulació pot ser ràpida implicant vies de senyalització o més lenta per canvis transcripcionals.

CAD, el primer enzim de la síntesi *de novo* de pirimidines es regula de manera ràpida per l'acció de quinases que han estat activades per factors de creixement i provoquen

canvis en la fosforilació de diferents residus. De manera que està altament regulat per modular l'activitat de la via. Així es fosforila la Thr456 del domini CPSII per la via de les MAPK. Aquesta fosforilació afavoreix la unió de l'activador al·lostèric PRPP i disminueix l'afinitat de CAD pel seu inhibidor UTP donant lloc a un augment de l'activitat de la proteïna (Graves et al. 2000). La proteïna quinasa C (PKC) modula l'activitat de MAPK modificant també la fosforilació de la Thr456 (Sigoillot et al. 2007), quan aquesta disminueix la Ser1406 és fosforilada per la proteïna quinasa A (PKA) que en conjunt donaran una disminució de l'afinitat per PRPP (Sigoillot, Evans, and Guy 2002). L'estimulació d'mTORC1 promou la fosforilació de la Ser1859 a través de S6K1 que promou l'oligomerització de la proteïna millorant l'activitat dihidroorotasa de CAD sense que es donin canvis en l'expressió de la proteïna (Ben-Sahra et al. 2013; Robitaille et al. 2013).

La regulació del metabolisme de nucleòtids per senyals extracel·lulars també pot implicar canvis en l'expressió de factors de transcripció que exerceixen una regulació més lenta. L'oncogen c-myc pot regular els nivells de diversos enzims del metabolisme de nucleòtids. En línies cel·lulars de melanoma on s'ha silenciada c-myc, s'ha pogut observar mitjançant un *microarray* la disminució de l'expressió de l'enzim fosforibosilpirofosfat sintetasa (PRPS) que és important tant en la síntesi *de novo* com en la recuperació de nucleòtids, PAICS, PPAT, GART i IMPDH2 de la via de síntesi *de novo* de purines, TS de la síntesi de pirimidines i TK1 de les vies de recuperació. En conjunt aquests canvis donen una disminució de dNTPs en aquestes cèl·lules. D'aquests enzims s'han estudiat en més detall els que presenten un més alt control de flux dins les seves vies metabòliques. S'ha confirmat el canvi d'expressió de TS, IMPDH2 i PRPS2 per la disminució de c-myc així com també la unió d'aquest a les regions reguladores dels gens que codifiquen aquests enzims (Mannava et al. 2008). Addicionalment, s'ha demostrat que myc coordina la producció de proteïnes i àcids nucleics en cèl·lules tumorals per l'augment de PRPS2 (Cunningham et al. 2014). En un altre estudi s'ha observat que la inducció de c-myc dona lloc a un augment de l'expressió d'enzims implicats en diferents vies de la síntesi de nucleòtids. Mitjançant assajos *in vivo* i *in vitro* s'han confirmat PPAT i DHODH com a enzims regulats per c-myc (Liu et al. 2008). Els nivells d'expressió de c-myc també s'han relacionat amb els nivells d'expressió d'enzims de recuperació del metabolisme de nucleòtids en diferents línies tumorals (Grane-Boladeras, Perez-Torras, et al. 2016).

La forma mutada del supressor de tumors p53 (mtp53) pot modular els nivells d'enzims del metabolisme de nucleòtids tant de la via *de novo* com de recuperació i aquest efecte no és tan clar en el cas de Wtp53 (Kollareddy et al. 2015). Els canvis modulats per

mtp53 impacten en els nivells d'rNTPs i dNTPs de la cèl·lula. En concret, s'ha estudiat l'efecte dels nivells de GTP en la invasió de les cèl·lules amb mtp53 degut a que aquest nucleòtid és necessari per a la funció de GTPases. Així s'ha vist que els canvis de GTP deguts a un augment de GMPS confereixen característiques oncogèniques (Kollareddy et al. 2015). A més, mtp53 crea dependència de dCK per al manteniment del pool de nucleòtids necessari per a la proliferació. D'aquesta manera, les cèl·lules amb mtp53 són més sensibles a gemcitabina degut a l'augment de dCK. A més, el canvi de dCK té efecte en l'estrès replicatiu en cèl·lules amb mtp53. També s'observa l'augment global d'enzims del metabolisme de nucleòtids en mtp53 en mostres de pacients de càncer de mama (Kollareddy et al. 2015). Això té un efecte en la recaiguda i desenvolupament de metàstasi en els pacients que presenten mutacions en p53.

mTORC1 pot regular les concentracions de purines i pirimidines a diferents nivells (Valvezan et al. 2017) integrant senyals extracel·lulars, per la disponibilitat d'altres tipus de macromolècules com aminoàcids. Més recentment també s'ha descrit que pot detectar els nivells de purines intracel·lulars però no els de pirimidines (Emmanuel et al. 2017; Hoxhaj et al. 2017). D'aquesta manera la regulació entre l'activitat d'mTORC1 i la biosíntesi de purines és bidireccional. Quan Rheb està unit a GTP, es dona un canvi conformacional a mTORC1 que en permet la seva activació, mentre que la disminució de GTP afecta negativament l'abundància de Rheb-GTP i així a l'activitat d'mTORC1 (Emmanuel et al. 2017). De forma més aguda també es regulen els nivells d'adenilat a través del complex TSC (Hoxhaj et al. 2017). Degut a que els nivells d'adenilat estan relacionats amb l'estat energètic de la cèl·lula i que són necessaris per la síntesi de guanilats i pirimidines la detecció d'aquests nivells pot servir com a mostra dels nivells totals dels nucleòtids de la cèl·lula.

La proteïna de retinoblastoma (pRB) modula la replicació a través de la modulació dels nivells de CDK2 i de dNTPs ja que pRB activa disminueix els nivells de TS, RNR i DHFR (Angus et al. 2002).

Tant en la regulació ràpida com en la regulació lenta, a part de donar-se un efecte directe sobre el metabolisme de nucleòtids també pot veure's afectada la disponibilitat de precursors afegint així un punt més de regulació (Villa et al. 2019; Zhu and Thompson 2019; Ben-Sahra et al. 2016).

6. Implicació del metabolisme de nucleòtids en patologia

Com s'ha vist, la cèl·lula presenta una gran quantitat d'enzims que modulen els nivells de nucleòtids depenent de l'estat de la cèl·lula i les seves necessitats. Es troben baix el

control de diferents punts de regulació per mantenir el balanç necessari per al correcte funcionament de la cèl·lula i així de l'organisme. Canvis en l'expressió i/o l'activitat d'aquests enzims generen malalties amb un gran espectre de manifestacions clíniques, generalment a edats primerenques. Es donen problemes en diferents sistemes: immunològic, hematològic, neurològic, musculo-esquelètic i renal (Jurecka 2009).

La primera malaltia que es va descriure per problemes en el metabolisme de nucleòtids va ser l'encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE) que es dona per mutacions en l'enzim del TP. Això es tradueix en una depleció de DNA mitocondrial (mtDNA) (Nishino, Spinazzola, and Hirano 1999). Mutacions en l'enzim de la síntesi *de novo* CAD provoquen alteracions neurològiques, en el desenvolupament, anèmia i convulsions (Koch et al. 2017). Per a la síntesi *de novo* de purines s'havien descrit pacients amb mutacions en ATIC i ADSL (Baresova et al. 2012) i més recentment s'ha descrit un fenotip sever per a la mutació de PAICS (Pelet et al. 2019). Tots ells provoquen problemes en la formació del purinosoma. Mutacions en TK2 causen una depleció dels dNTPs mitocondrials que generen miopatia (Saada et al. 2001). Problemes en la recuperació de nucleobases per mutacions en HPRT causen la síndrome de Lesch Nyhan que genera alteracions cognitives i tendència a autolesionar-se, arribant fins i tot a la mutilació (Torres and Puig 2007). També es donen problemes que afecten al sistema immunològic com són les mutacions en ADA que poden desenvolupar immunodeficiència (ADA-SCID) (Ochs et al. 1973) i mutacions en SAMHD1 causen la malaltia autoimmunitària síndrome d'Aicardi-Goutières (Rice et al. 2009) amb alteracions neurològiques i de desenvolupament.

Fins fa ben poc només es coneixia una malaltia causada per problemes en els transportadors de nucleòsids. Mutacions en ENT3 generen la síndrome H (Molho-Pessach et al. 2008; Huber-Ruano et al. 2012). Les principals manifestacions de la malaltia comparteixen la lletra H, ja que són hiperpigmentació, hipertricosi, hepatoesplenomegalia, alhora que els malalts també poden presentar anomalies cardíques, pèrdua auditiva, hipogonadisme, baixa estatura i hiperglucèmia. Recentment, en el nostre grup s'ha descrit la influència de mutacions en CNT1 en el fenotip d'un nen que també presentava mutacions en perforina i va morir als pocs mesos (Perez-Torras et al. 2019). La principal característica bioquímica d'aquesta disfunció era una pirimidinúria, la qual cosa lliga amb el paper descrit per a CNT1 com a recaptador tubular renal de nucleòsids de pirimidina, com la citidina i la uridina.

Com veiem, en general es tracta de malalties greus. Tanmateix, en alguns casos es pot donar una millora dels pacients mitjançant l'administració de precursors dels nucleòtids.

En les mutacions de CAD s'obté un benefici per l'administració d'uridina (Koch et al. 2017). En la miopatia que es causada per mutacions en TK2 s'han tractat pacients de manera compassiva amb desoxinucleòsids i desoxinucleòsids monofosfat amb una gran recuperació de les funcions dels pacients (Dominguez-Gonzalez et al. 2019), fet pel qual s'està treballant per a què es consideri un tractament per a aquesta malaltia. De fet, existeix la possibilitat que aquest tipus de suplementació de precursors pugui donar resultats clínics beneficiosos en malalties diverses que comporten depleció del DNA mitocondrial.

La modificació dels nivells de nucleòtids també pot implicar el desenvolupament de malalties a més llarg termini. Degut a la desregulació dels nivells de nucleòtids es pot arribar a una taxa major de mutacions, el que pot dur al desenvolupament de càncer (Mathews 2015). Es coneixen moltes mutacions en SAMHD1 i s'ha vist que poden causar diversos tipus de càncer com leucèmia limfàtica crònica (LLC), adenocarcinoma de pulmó i càncer de colon. D'altra banda també s'ha vist que SAMHD1 podria ser un supressor de tumors mitjançant l'eliminació de nucleòtids modificats abans de que siguin incorporats al DNA (Mauney and Hollis 2018). També s'ha de tenir en compte la rellevància de SAMHD1 en el tractament del càncer perquè pot inactivar la forma trifosforilada de l'Ara-C, fàrmac que s'utilitza pel tractament de leucèmia mieloide aguda (AML) (Schneider et al. 2017). La TP també presenta un paper en el desenvolupament de càncer i metàstasi així com en l'activació de fluoropirimidines que es fan servir en el tractament d'aquests tumors (Bronckaers et al. 2009). A més, també s'han relacionat els nivells de nucleòtids amb malalties metabòliques com la diabetis i l'obesitat (Buj and Aird 2018).

8. Antimetabòlits per al tractament del càncer

Per la influència del metabolisme de nucleòtids en la regulació de la proliferació i la seva relació amb el càncer s'han desenvolupat fàrmacs que interaccionen amb aquestes vies pel tractament, tots ells considerats com antimetabòlits (Luengo, Gui, and Vander Heiden 2017). El 1947 Sidney Farber va utilitzar antifolats per al tractament de leucèmia (Farber and Diamond 1948). Són molècules que intervenen en el metabolisme de folats inhibint la generació d'aquests i incidint sobre la formació de nucleòtids (**Figura 11**). En concret, els pacients tractats amb aminopterina, precursor dels antifolats que es fan servir avui en dia metotrexat i pemetrexed, van presentar una millora. Metotrexat inhibeix la dihidrofolat reductasa (DHFR) que permet la recuperació de tetrahidrofolat (THF) a partir de dihidrofolat (DHF) que es genera després d'haver estat substrat d'altres reaccions (**Figura 11B**). Pemetrexed inhibeix també aquest enzim i altres enzims

importants en el metabolisme de purines i pirimidines, GART i TS, de manera que aquestes molècules afecten a diferents punts de la síntesi *de novo* de purines i pirimidines.

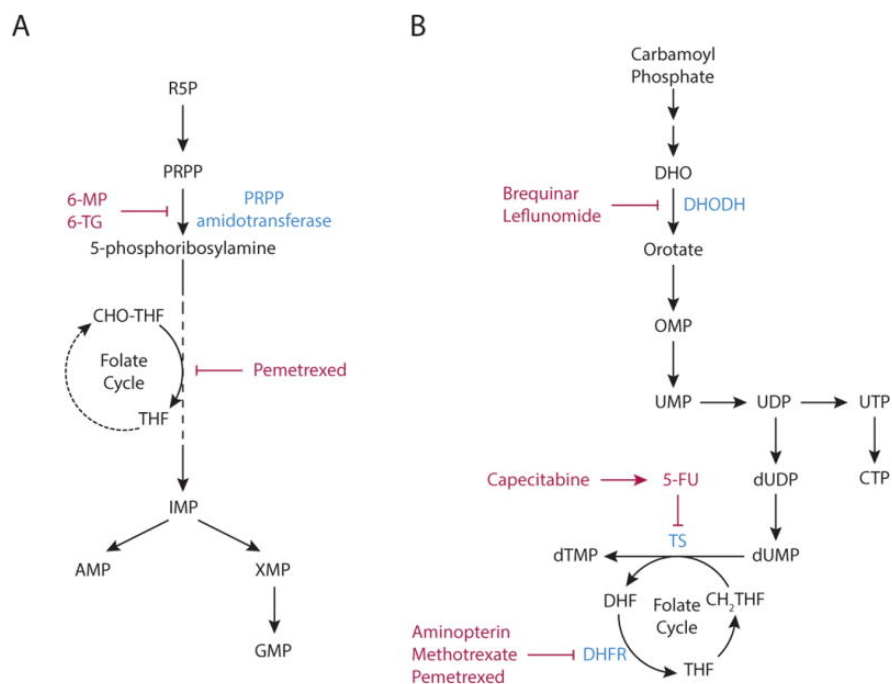


Figura 11. Exemple d'antimetabòlics que afecten la síntesi de novo de purines (A) i pirimidines (B). Els substrats i productes de les vies es mostren en negre, els enzims en blau i els antimetabòlics en vermell (Luengo, Gui, and Vander Heiden 2017).

Paral·lelament, es van desenvolupar antimetabòlics de purines com agents quimioterapèutics. Gertrude Elion i George Hitchings van desenvolupar la tioguanina (TG) i la 6-mercaptapurina (MP) per al tractament de la leucèmia. La 6-MP va ser aprovada com a tractament per la *US Food and Drug Administration* (FDA) el 1953. Aquest descobriment va ser reconegut amb el premi Nobel en fisiologia o medicina el 1988 (Elion 1989). Fins a dia d'avui s'han generat altres antimetabòlics de purines i pirimidines que s'utilitzen tant en tumors sòlids com en malalties limfoproliferatives. Es tracta de profàrmacs que aprofiten les vies de recuperació de nucleòsids per a l'entrada dins la cèl·lula i l'activació del fàrmac perquè pugui dur a terme la seva acció. Això també fa que hi hagi resistència a aquests fàrmacs per modificacions en aquests enzims, que es poden fer servir com biomarcadors. Els nucleòtids derivats d'aquests fàrmacs es poden incorporar als àcids nucleics i en molts casos poden inhibir enzims implicats en la síntesi de DNA causant dany en el DNA i inducció d'apoptosi. S'utilitzen també per intervenir en la replicació viral i pel tractament de malalties inflamatòries.

Actualment existeixen 15 antimetabòlits de purina i pirimidina aprovats per la FDA pel tractament del càncer. Fins al 2009 se n'havien descrit 14 (Parker 2009) i l'any 2015 es va aprovar la trifluridina (TFT) per al tractament de càncer colorectal que no respon a altres teràpies. Al llarg dels anys se l'hi ha afegit especificacions com el tractament del càncer gàstric. Els antimetabòlits de purina i pirimidina es poden classificar en tiopurines i anàlegs de nucleobases i nucleòsids.

8.1. Tiopurines

Les tiopurines inclouen la TG i la MP, anàlegs de les bases púriques guanina i hipoxantina, respectivament. Es fan servir per al tractament de leucèmies agudes. Interaccionen amb els transportadors ENT1 i ENT2 encara que en el rang mM (Yao et al. 2011). Són substrat de HPRT i el producte de la reacció és el nucleòtid monofosfat del fàrmac, tio-guanosina-monofosfat (T-GMP) i 6-tio-inosina-monofosfat (T-IMP). T-IMP és substrat d'IMPDH i es converteix en nucleòtids de guanina. En ambdós casos es forma el desoxinucleòtid (T-dGTP) per l'acció de RNR que es pot incorporar al DNA (Karran 2006). L'acció citotòxica no és immediata ja que T-dGTP és un bon substrat per a la polimerasa i tot i no inhibir-la es genera dany al DNA que finalment durà a la mort cel·lular. Tant T-GMP com T-IMP es poden metilar per acció de S-metiltransferases (Karran 2006), però només T-IMP té acció inhibidora de PRPP amidotransferasa, de manera que la MP, a més, inhibirà la síntesi de novo de nucleòtids (**Figura 11**).

8.2. Anàlegs de nucleòsids i nucleobases

L'anàleg de nucleobases 5-fluorouracil (5-FU) és el principal membre d'aquesta família. Tant capecitabina com floxuridina (F-dUrd) són profàrmacs que es converteixen en 5-FU una vegada dins la cèl·lula per dur a terme la seva acció citotòxica. L'entrada d'aquestes molècules depèn de la seva naturalesa. 5-FU entra per transportadors equilibratius ENT1 i ENT2 i floxuridina per tots els transportadors concentratius, si bé en el cas de la capecitabina no es coneix el mecanisme d'entrada (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). La TP catalitza l'últim pas de metabolització de floxuridina i capecitabina fins a 5-FU. Aquest enzim es sobreexpressa en tumors, conferint-li un avantatge en quant a la selectivitat pel tumor a la capecitabina respecte 5-FU. 5-FU es converteix en diferents metabòlits amb acció citotòxica sent el principal F-dUTP que es pot incorporar al DNA. El que és detectat com a dany pels mecanismes d'acció que actuen inhibint la síntesi de DNA causant mort cel·lular. A més, F-dUMP és un inhibidor potent de TS. TFT és l'anàleg de nucleòsids aprovat més recentment per la FDA. L'any 2015 es va aprovar per a l'ús en metàstasi de càncer colorectal. Presenta un flux vectorial en epitelis polaritzats per l'acció de CNT1 i ENT1 (Takahashi et al. 2018). El

seu mecanisme d'acció es diferencia del 5-FU ja que la inhibició de TS no és suficient per al seu efecte. En canvi, la seva forma trifosfat s'incorpora al DNA donant així l'efecte citotòxic. S'administra juntament amb tipiracil que inhibeix TP (Burness and Duggan 2016), enzim que degrada la trifluridina, allargant així la seva acció.

Pels tots els altres anàlegs de nucleòsids, el mecanisme d'acció és bastant similar entre ells. En termes generals, entren a la cèl·lula per transportadors de nucleòsids i per l'acció de quinases són convertits als seus respectius anàlegs de nucleòtids que inhibeixen la síntesi de DNA per la inhibició de les DNA polimerases i/o RNR. Hi ha algunes diferències d'interacció d'aquests agents i els seus metabòlits amb alguns enzims que els donen propietats característiques i que resulta en activitat clínica específica per cada un d'ells. Es fan servir en malalties hematopoètiques a excepció de la gemcitabina que es fa servir en tumors sòlids.

Els anàlegs de purina són substrats d'ENT1, ENT2, CNT3 i CNT2. En canvi, els anàlegs de pirimidines en general són transportats per CNT1, ENT1, ENT2 i CNT3 (**Taula 2.**) (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). Citarabina (Ara-C), fludarabina (F-AraA) i nelarabina presenten un mecanisme d'acció similar ja que comparteixen la mateixa ribosa, l'arabinòsid. La seva acció principal és la incorporació de la forma trifosforilada al DNA i la posterior inhibició de la DNA polimerasa degut a què no pot seguir allargant la cadena de DNA després de la incorporació d'aquests anàlegs (Grant 1998). Addicionalment, F-araATP és un inhibidor feble de RNR. La gemcitabina (dFdC) és un anàleg de desoxicitidina com l'Ara-C i s'incorpora al DNA però inhibeix la polimerasa de forma més atenuada. En canvi, els mecanismes de reparació no tenen capacitat d'escindir la gemcitabina i, a més, la forma difosfat inhibeix la RNR (Ostruszka and Shewach 2003).

Decitabina (aza-dCyd) i azacitidina (aza-Cyd), s'incorporen al DNA i en aquests casos la polimerasa pot seguir realitzant la seva acció. No obstant, és citotòxica degut a la inestabilitat química de Aza-dCyd. A més, aquests fàrmacs inhibeixen la DNA metiltransferasa i disminueixen la metilació del DNA (Bouchard and Momparler 1983) afavorint l'expressió de gens *a priori* reprimits o silenciats en les cèl·lules filles. La cladribina una vegada activada s'incorpora al DNA tot i que això no afecta a la replicació. En canvi, el seu efecte es dona per la inhibició de la RNR. La clofarabina (Cl-F-Ara-A) comparteix aquest efecte i a diferència de cladribina també pot acabar la síntesi de DNA per la seva incorporació en la cadena (Parker et al. 1991).

A diferència de tots els anteriors, la pentostatina no necessita ser activada per enzims del metabolisme. És un inhibidor d'ADA i augmenta els nivells de desoxiadenosina

circulant. S'acumula dATP que inhibeix l'activitat de RNR de manera al·lostèrica i s'inhibeix la síntesi de DNA per la disminució dels nivells de desoxinucleòtids.

	Nom	Aprovat FDA	Ús terapèutic	Transportadors de nucleòsids
Purines	Mercaptopurina	1953	Malalties limfoproliferatives	CNT3; ENT1 i 2
	Fludarabina	1991	Malalties limfoproliferatives	CNT2 i 3; ENT1 i 2
	Pentostatina	1991	Malalties limfoproliferatives	ENT1 i 2
	Cladribina	1993	Malalties limfoproliferatives	CNT2 i 3; ENT1 i 2
	Clofarabina	2004	Malalties limfoproliferatives	CNT2 i 3; ENT1 i 2
	Nelarabina	2005	Malalties limfoproliferatives	
Pirimidines	Floxuridina	1970	Tumors sòlids	CNT1, 2 i 3
	Citarabina	1969	Malalties limfoproliferatives	CNT1, ENT1 i 2
	Gemcitabina	1996	Tumors sòlids	CNT1 i 3; ENT1, 2 i 3
	Capecitabina	1998	Malalties limfoproliferatives	
	5-fluorouracil	1998	Tumors sòlids	ENT1 i 2; OAT2
	Azacitidina	2004	Malalties limfoproliferatives	CNT1-3; ENT1- 4
	Decitabina	2006	Malalties limfoproliferatives	ENT1 i 2
	Trifluridina	2015	Tumors sòlids	CNT1 i ENT1

Taula 2. Anàlegs de purines i pirimidines aprovats per la FDA per al tractament del càncer. En els casos en que es coneix es detalla el mecanisme d'entrada a la cèl·lula de cada un dels fàrmacs. Adaptat de (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015).

Tots els anàlegs que s'activen per desoxicitidina quinasa són bons substrats per ADA, important en la destoxicació d'aquests fàrmacs. F-araA, cladribina i clofarabina són modificades per a què no puguin ser inactivades per CDA. En canvi, nelarabina necessita l'acció de CDA per a la seva activació.

Hem pogut veure que els enzims del metabolisme de nucleòtids són necessaris per a l'acció dels anàlegs de nucleòsids. Per això, canvis en els nivells i/o l'activitat d'aquests enzims poden modular l'efecte dels anàlegs de nucleòsids en el tractament del càncer

donant lloc a resistència (Tsesmetzis et al. 2018). A més, s'ha de tenir en compte que el càncer en molts casos requereix teràpies combinades que eventualment poden tenir efecte sobre la metabolització dels anàlegs de nucleòsids. Hi ha evidències de que receptors tirosina quinasa que senyalitzen per l'acció de factors de creixement, transportadors de nucleòsids, enzims del metabolisme de nucleòtids i enzims de reparació del DNA formen xarxes en línies cel·lulars de tumors gastrointestinals (Grane-Boladeras, Perez-Torras, et al. 2016). De manera que teràpies que impliquin la modulació de receptors tirosina quinasa podrien modificar elements del metabolisme de nucleòtids que afectarien al tractament combinat amb anàlegs de nucleòsids. Aquest aspecte no ha estat molt estudiat fins ara. Un cas concret que s'ha descrit en el nostre grup és la disminució d'ENT1 per la inhibició del receptor tirosina quinasa FLT3 en leucèmia pediàtrica aguda (Catala et al. 2016). Això implica que la combinació d'aquest inhibidor amb l'anàleg de nucleòsids Ara-C pot crear quimioresistència per falta d'entrada del segon.



OBJECTIUS



OBJECTIUS

Els elements del metabolisme que estan implicats en la generació i manteniment dels *pools* de nucleòsids i nucleòtids de la cèl·lula: el transport de nucleòsids i les vies de síntesi *de novo* i de recuperació, estan relacionats entre ells i es poden regular. En alguns casos aquesta regulació implica la formació de complexos multienzimàtics que permeten la millor eficiència de les reaccions. En el nostre grup, mitjançant aproximacions experimentals complementàries, s'han identificat recentment proteïnes d'interacció amb el transportador concentratiu de nucleòsids 3 (CNT3). Algunes d'aquestes proteïnes estan relacionades amb el metabolisme de nucleòtids. Així doncs, CNT3 podria ser un element més que regulés la funció de complexos enzimàtics tot modulant alhora el metabolisme de nucleòtids. El coneixement d'aquests complexos pot ser rellevant per entendre millor la patogènesi de malalties diverses, com les neoplàsies, alhora que també poden condicionar el tractament amb anàlegs de nucleòsids. Per altra banda, en leucèmia pediàtrica aguda s'ha demostrat recentment que el receptor tirosina quinasa FLT3 regula el transportador equilibratiu de nucleòsids 1 (ENT1), la qual cosa obre la possibilitat que aquest receptor tirosina quinasa implicat en hematopoesi pugui també modular altres elements de la complexa xarxa que inclou les vies de recuperació de nucleòsids. En tant que el propi receptor FLT3 és una diana terapèutica, aquesta possibilitat pot esdevenir molt rellevant per a comprendre millor quadres de quimioresistència en l'ús de teràpies combinades per a la leucèmia que comporten l'administració de derivats de nucleòsids.

En base a tots aquests antecedents ens vam plantejar com a objectiu general l'estudi de la relació entre els transportadors de nucleòsids i altres elements del metabolisme de nucleòtids.

Per aconseguir aquest objectiu es van proposar els següents objectius concrets:

1. Validar i caracteritzar la interacció de CNT3 amb les proteïnes candidates ADK, SAMHD1 i QDPR, totes elles implicades en el metabolisme de nucleòtids.
2. Estudiar la regulació dels elements del metabolisme de nucleòtids per FLT3 en la leucèmia aguda pediàtrica.



RESULTATS I DISCUSSIÓ



RESULTATS I DISCUSSIÓ

Bloc 1. Estudi de proteïnes d'interacció amb el transportador concentratiu de nucleòsids CNT3.

Els transportadors concentratius de nucleòsids són importants per a la internalització de nucleòsids i els seus anàlegs. L'acció transportadora resideix en els vuit dominis transmembrana que es conserven tant en els CNTs procariotes com eucariotes. Els eucariotes, a més, presenten tres dominis transmembrana addicionals i una cua N-terminal intracel·lular. La cua N-terminal determina la localització a membrana plasmàtica de la proteïna i no està implicada en la translocació de substrat (Errasti-Murugarren, Casado, and Pastor-Anglada 2010). Això ens porta a pensar que els CNTs eucariotes podrien tenir algun punt més de regulació o altres funcions a part de la translocació de substrats. Una hipòtesi és que la cua N-terminal serveixi com a estructura d'unió per altres proteïnes. D'aquesta manera s'han desenvolupat diversos projectes en el grup per caracteritzar l'interactoma dels CNTs. En aquesta tesi s'ha estudiat la validació bioquímica i funcional de proteïnes d'interacció amb CNT3, el transportador més antic evolutivament i que transloca purines i pirimidines, a diferència dels altres transportadors de la família que tenen especificitat per un tipus de nucleòsids: CNT1 per pirimidines i CNT2 per purines. Fins a dia d'avui s'ha validat la interacció de CNT3 amb galectina 4 que permet un increment de la presència del transportador a membrana plasmàtica que es tradueix en una major activitat en aquesta localització (Fernandez-Calotti et al. 2016).

Per seguir amb l'estudi de proteïnes que interaccionen amb CNT3 s'han desenvolupat diferents tècniques. Per una banda, la Dra. Paula Fernández-Calotti va dur a terme un *GST-pull down* amb la cua N-terminal del transportador. Per altra banda, en la tesi doctoral del Dr. Albert Viel es va realitzar el *membrane yeast two hybrid* (MYTH) en el que es fa servir la proteïna sencera amb la seva conformació nadiua a membrana. En ambdós projectes es van aconseguir identificar proteïnes candidates per a la interacció amb CNT3 i en aquesta tesi s'han seguit estudiant adenosina quinasa (ADK) i SAMHD1 obtingudes en el *GST-pull down* i *quinoid dihidropteridin reductase* (QDPR) descrita per MYTH, que es desenvoluparan en els dos capítols següents.

Capítol 1. Relació bioquímica i funcional entre CNT3 i els enzims del metabolisme de nucleòtids ADK i SAMHD1

CNT3 és una proteïna que presenta dominis transmembrana hidrofòbics fet que fa que sigui una proteïna complicada per desenvolupar un *GST-pull down*, tècnica en la que és necessari que la proteïna sigui soluble. Per això, només es va fer servir la cua N-terminal del transportador que és la part més soluble i, a més, és la que està més exposada al medi intracel·lular on pot estar en contacte amb altres proteïnes. L'assaig de *GST-pull down* permet fer un cribratge de proteïnes que podrien estar interaccionant. La proteïna d'interès (*bait*) fusionada a glutatió S transferasa (GST) es posa en contacte amb un extracte de proteïnes i es precipiten els complexos formats amb l'ajut d'un anticòs contra GST. Després s'identifiquen les proteïnes que s'han unit a la proteïna d'interès mitjançant electroforesi 2D i espectrometria de masses MALDI-TOF comparant amb un control on s'ha fet servir GST sola com a control. Com a font de proteïnes per l'estudi d'interacció es van utilitzar extractes proteics de cèl·lules primàries de pacients d'LLC. Una avantatge de l'estudi d'aquest tipus de càncers és que l'obtenció de la mostra és un procés poc invasiu.

El 1991 l'anàleg de nucleòsids fludarabina va ser aprovat per la FDA per al tractament d'LLC (Elter, Hallek, and Engert 2006). Avui en dia aquest tractament segueix vigent i permet la millora dels pacients. Les cèl·lules d'LLC presenten expressió a nivell d'mRNA dels transportadors ENT1, ENT2, CNT2 i CNT3. Però, a nivell funcional pràcticament tot el transport de nucleòsids i els seus anàlegs, com la fludarabina, el duen a terme els transportadors equilibratius (Molina-Arcas et al. 2003). A nivell de proteïna, s'ha observat que CNT3 es troba al citosol d'aquestes cèl·lules i mitjançant l'acció d'ATRA es pot promoure el tràfic del transportador a la membrana plasmàtica (Fernandez-Calotti and Pastor-Anglada 2010). D'aquesta manera CNT3 pot dur a terme la seva funció en aquesta localització i s'ha pogut observar un increment de la citotoxicitat de la fludarabina quan es combina amb ATRA, tant en línies cel·lulars com en cèl·lules primàries d'LLC (Fernandez-Calotti and Pastor-Anglada 2010; Fernandez-Calotti et al. 2012).

L'estudi de l'interactoma de CNT3 pot donar informació important per al tractament de la malaltia ja que podria influir en el tràfic i/o activitat del transportador fent que moduli l'efecte de la fludarabina. També pot servir per conèixer mecanismes que duguin al desenvolupament o progressió de la malaltia ja que els transportadors de nucleòsids podrien tenir altres funcions com s'ha pogut descriure en el cas de CNT1 (Perez-Torras et al. 2013).

Com a resultat d'aquest estudi proteòmic es van obtenir una gran varietat de candidates i va ser necessari seleccionar les que podien tenir un sentit biològic. En concret, s'han estudiat les que estan implicades en el metabolisme de nucleòtids: ADK, PAICS, VDAC1 i SAMHD1. El fet de que siguin proteïnes que formen part de diferents vies implicades en la síntesi o recuperació de nucleòtids ens porta a pensar que hi pugui haver una relació funcional entre elles i el transportador i que aquesta es tradueixi en una regulació fina dels nivells de nucleòtids de la cèl·lula. La hipòtesi general és que CNT3 pugui actuar com un sensor dels nivells de nucleòtids i modular l'acció dels elements del metabolisme dependent de les necessitats de la cèl·lula.

En primer lloc, en aquest projecte es va treballar amb la porina mitocondrial VDAC1 (en l'estudi proteòmic també es van identificar VDAC2 i VDAC3). L'expressió d'aquesta proteïna també s'havia descrit en membrana plasmàtica (De Pinto et al. 2010), tot i que aquesta idea és controvertida. De totes maneres vam decidir estudiar la interacció ja que podria donar-se a membrana plasmàtica o de manera intracel·lular en tant que s'ha descrit que una variant de CNT3 pot quedar retinguda a reticle endoplasmàtic (Errasti-Murugarren et al. 2009) i es coneix que el mitocondri pot interaccionar amb aquest orgànul (Xia et al. 2019). Es van realitzar coimmunoprecipitacions però no es va poder validar la interacció entre CNT3 i VDAC1, a més, vam tenir problemes amb l'anticòs de VDAC1 per realitzar immunofluorescències de manera que tampoc es van obtenir imatges clares de la quina localització es podria donar la interacció en cas de que existís. Degut a les limitacions d'aquestes tècniques vam descartar seguir estudiant aquesta interacció ja que podia ser que fos un fals positiu o que la interacció fos transitòria i que no sabíem en quin moment es podia donar.

1. Estudi de la interacció amb ADK

L'adenosina quinasa és un enzim que s'encarrega de la regulació dels nivells d'adenosina mitjançant la seva fosforilació, de manera que disminueixen els nivells d'adenosina lliure. Aquesta funció és rellevant ja que aquest nucleòtid és una molècula amb un poder senyalitzador important, essent clau en la regulació purinèrgica. Quan les concentracions d'adenosina són excessives, els nivells d'aquest nucleòtid també es poden regular per l'adenosina desaminasa (ADA) extracel·lular generant inosina. Els nivells d'adenosina de la cèl·lula venen determinats per la degradació de nucleòtids a partir de la desfosforilació d'AMP via 5'-nucleotidasa o pel trencament d'S-adenosilhomocisteïna (SAH), que es genera en reaccions de metilació, via SAH-hidrolasa (SAHH) (**Figura 12**). En aquest últim cas, una acumulació d'adenosina pot canviar el sentit de la reacció que és reversible i així inhibir les reaccions de

transmetilació com s'ha pogut observar en pacients que presenten mutacions d'ADK i desenvolupen problemes en el fetge i encefalopatia (Bjursell et al. 2011). L'AMP que es desfosforila donant adenosina pot ser de la mateixa cèl·lula, d'altres cèl·lules o de la dieta. Quan l'adenosina prové de fonts externes és necessària la internalització dins la cèl·lula gràcies als transportadors de nucleòsids. Es podrà donar l'entrada tant per CNTs com per ENTs (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2018b). Els segons presenten un transport bidireccional a favor de gradient però només transporten el nucleòsid de manera que una vegada l'adenosina ha estat fosforilada per ADK deixa de ser substrat pel transportador i romandrà dins la cèl·lula.

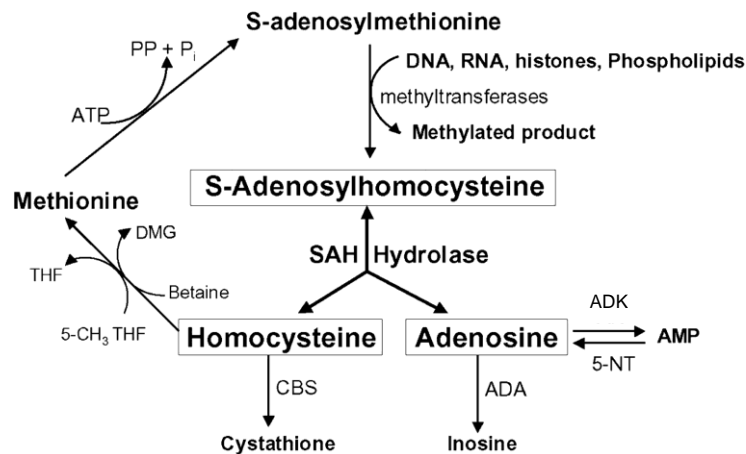


Figura 12. Cicle de la metionina com a font d'adenosina. Cicle de la metionina que genera els grups metil necessaris per a les reaccions de metilació que es duen a terme en la cèl·lula. Com a producte d'aquestes reaccions es genera adenosina, en una reacció reversible pel que l'acumulació d'adenosina podria inhibir les reaccions de metilació. 5-CH₃ THF, 5-metil-tetrahidrofolat (5-MTHF); 5-NT, 5'-nucleotidasa; ADA, adenosina desaminasa; ADK, adenosina quinasa; ATP, adenosina trifosfat; DMG, dimetilglicina; P_i, fosfat inorgànic; PP, pirofosfat; THF, tetrahidrofolat; CBS, cistatina β-sintasa. (James et al. 2002).

ADK duu a terme la seva funció en forma de monòmer. La reacció de fosforilació és adenosina + ATP → AMP + ADP. És una reacció poc comú degut a que tant el donador del grup fosforil com l'acceptor comparteixen el mateix grup estructural, l'anell d'adenina. Això fa que la regulació d'aquest enzim sigui complicada així com també la interpretació dels resultats d'assajos d'activitat. ADK s'inhibeix per adenosina, el seu substrat (Fisher and Newsholme 1984), la magnitud de la inhibició incrementa amb concentracions creixents de magnesi. La inhibició per substrat pot ser important com a mecanisme fisiològic per potenciar la resposta a adenosina baix condicions d'estrès que poden arribar a concentracions en el rang micromolar (Fredholm 2007), ja que aquesta inhibició no es dona amb concentracions fisiològiques d'adenosina (25-300 nM). ADK presenta dues isoformes que presenten les mateixes característiques catalítiques i diferent localització subcel·lular. Mentre que la isoforma curta (ADK-S) es localitza al citoplasma,

la isoforma llarga (ADK-L) es troba al nucli degut a que presenta un senyal de localització nuclear (Cui et al. 2009). Les dues isoformes estan regulades per diferents promotors i es generen per *splicing* (Cui et al. 2011). Depenent dels teixits i tipus cel·lulars s'expressa ADK-S, ADK-L o ambdues (Boison 2013).

Els nivells extracel·lulars d'adenosina es poden modular per l'acció dels transportadors de nucleòsids ENT1, ENT2, CNT2 i CNT3 de manera que són importants per a la regulació purinèrgica (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2018b). ENT1 és el més estudiat però els transportadors concentratius també hi poden tenir un paper rellevant, sobretot CNT3 per la seva alta afinitat per adenosina i per la seva estequiometria 1:2 adenosina:sodi. A més, en un model de colangiòcits de rata s'ha pogut observar que rCNT2 i rCNT3 estan modulats per receptors purinèrgics. En concret, rCNT3 es localitza a la membrana apical que és la que està en contacte amb el lumen. Els nivells d'adenosina d'aquest compartiment activen el receptor d'adenosina A_{2A} i fa que augmenti l'activitat d'rCNT3 degut a la mobilització cap a membrana plasmàtica d'rCNT3 (Godoy et al. 2014).

Tant CNT3 com ADK permeten la regulació dels nivells d'adenosina pel que la interacció entre les dues podria portar a una regulació més fina. La interacció entre CNT3 i ADK pot ser rellevant per la regulació purinèrgica, modulant els nivells d'adenosina extracel·lulars i intracel·lulars. S'hipotetitzava que la interacció de CNT3 i ADK pugui generar una millor eficiència d'entrada d'adenosina ja que just després de la translocació per part de CNT3 podria ser fosforilada per ADK generant AMP, de manera que l'adenosina no sortiria a favor de gradient pels ENTs ni tampoc es generaria un excés d'adenosina intracel·lular.

La Dra. Olga Casulleras va validar la interacció d'aquestes dues proteïnes mitjançant la coimmunoprecipitació (coIP) de la proteïna endògena en la línia cel·lular d'LLC MEC1 i mitjançant la sobreexpressió de CNT3-HA i ADK-myc en cèl·lules HEK293. La colocalització d'ambdues proteïnes es va estudiar per immunofluorescència en HEK293. A nivell funcional es van realitzar assajos d'electrofisiologia en oòcits de *Xenopus laevis* tal com s'havia fet anteriorment en el grup (Larrayoz et al. 2004; Gorraitz, Pastor-Anglada, and Lostao 2010) on s'aprofita la capacitat electrogènica de la translocació de Na^+ o H^+ per mesurar l'activitat del transportador. Comparant la condició on s'expressa el transportador sol o en combinació amb ADK, es va poder observar una disminució de la constant d'afinitat aparent ($K_{0.5}$) (**Figura 13**), concentració de substrat a la que s'arriba a la meitat de la màxima intensitat de corrent, de CNT3 per adenosina quan ADK està present. El que indica que ADK afavoreix un augment de l'afinitat del transportador per

adenosina. Aquest canvi és específic del nucleòsid ja que no es dona si el substrat del transportador és citidina (**Figura 13**).

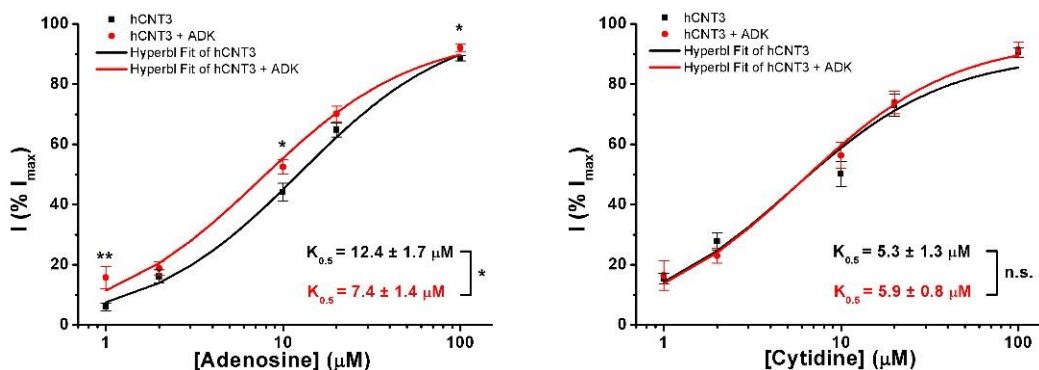


Figura 13. Influència del potencial de membrana en la I_{\max} en corrents induïts per adenosina o citidina en cèl·lules de *Xenopus* que expressen CNT3 o CNT3 + ADK. Corrents d'adenosina i citidina de les condicions CNT3 (n=14) i CNT3 + ADK (n=13) en oòcits de *Xenopus laevis*. Mitjana \pm SD * $p < 0.05$. (Figura 58 tesi doctoral Olga Casulleras).

1.1. Efecte de la interacció CNT3-ADK en l'activitat del transportador

Es considera que les corrents estudiades per electrofisiologia es donen quan hi ha internalització del substrat. Per estudiar-ho més en detall es van dur a terme assajos de transport del substrat radioactiu en cèl·lules HEK293 amb la transfecció d'ADK i/o CNT3. Les condicions del transport per poder detectar canvis en l'afinitat de CNT3 pel substrat en presència d'ADK també es van posar a punt en la tesi de la Dra. Olga Casulleras. Es va realitzar el transport durant 10 s per estar dins la velocitat inicial i no estar mesurant acumulació del substrat i els seus metabòlits. Els transports es van realitzar amb només substrat radioactiu (concentració d'aproximadament 50 nM) perquè la concentració de substrat no saturàs o fins i tot arribàs a inhibir ADK una vegada dins la cèl·lula.

L'activitat dels CNTs es mesura mitjançant la diferència (Na-dependència -Na-dep-) entre l'activitat dels transportadors del medi sodi (Na), on són actius tant els ENTs com els CNTs, i el medi colina (CHO) on només presenten activitat els ENTs. La línia cel·lular HEK293 no presenta activitat dels CNTs de manera endògena així que el transport concentratiu que podem observar ve determinat pel transportador que s'ha transfectat, en aquest cas CNT3. Com era d'esperar es va observar activitat per part del CNT3 transfectat (Na i Na-dep) tant amb adenosina com en citidina com a substrats (**Figura 14**). En el cas de citidina, a més, es va observar un augment significatiu de l'activitat dels transportadors equilibratius (CHO) en els punts on hi havia transfecció de CNT3, mentre que en adenosina es veia la mateixa tendència sense arribar a ser estadísticament significativa. Aquest canvi podria ser unió inespecífica a la placa o a la

matriu cel·lular en cas de que les cèl·lules haguessin quedat tocades per la transfecció. Tampoc es pot descartar que aquesta variació vengui donada per un canvi en l'activitat dels ENTs degut a la presència de CNT3 o que s'hagi donat activitat de CNT3 en absència de sodi ja que cal recordar que CNT3 també pot dur a terme la seva funció en presència de protons. Per determinar si l'acció és donada pels ENTs o per CNT3 es podria repetir el mateix experiment afegint la condició d'inhibició amb NBTI o dipiridamol. No es van poder observar diferències significatives en l'activitat de CNT3 (Na-dep) per la presència d'ADK ni amb adenosina ni amb citidina (**Figura 14**). En el cas d'adenosina es va observar una tendència a disminuir sense arribar a ser aquest canvi significatiu (**Figura 14**), efecte contrari del que s'havia observat per electrofisiologia (**Figura 13**).

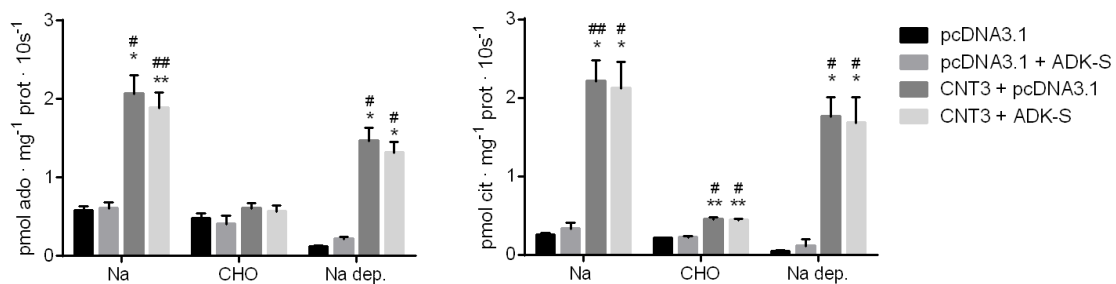


Figura 14. Influència d'ADK en el transport de CNT3. Les cèl·lules HEK293 es van transfectar amb ADK, CNT3 o la combinació d'ambdós durant 48 h. Es va mesurar el transport d'adenosina (ado) o citidina (cit) (50 nM, 1 µCi) durant 10 s. En el medi sodi (Na) hi ha activitat d'ENTs i CNTs, en el medi colina (CHO) d'ENTs i la diferència (Na-dep.) és l'activitat dels CNTs. n= 4. Les dades s'han analitzat mitjançant one-way ANOVA (Tuckey), * indica significança respecte pcDNA3.1 i # respecte pcDNA3.1 + ADK-S.

Hem de tenir en compte que es tracta de dos sistemes diferents. Per una banda, en electrofisiologia es mesura capacitat electrogènica i en les mesures de transport es mesura la unió al transportador o internalització del substrat. En els oòcits es podria generar alguna corrent que no impliqui transport sinó algun tipus de senyalització. S'ha de tenir en compte que es mesura l'activitat 48 h després de la transfecció, temps en el que s'ha pogut dur a terme la traducció de la proteïna, el seu efecte i una adaptació per part de la cèl·lula. A més, s'ha estudiat una sola concentració de nucleòsid amb la que esperàvem veure canvis ja que els hem pogut observar en totes les concentracions estudiades per electrofisiologia. Però podria ser que en el punt estudiat no s'apreciï el canvi. Per acabar de confirmar que no hi ha canvis s'hauria de fer una corba amb diferents concentracions.

1.2. Caracterització de la interacció de CNT3 amb la isoforma llarga d'ADK (ADK-L) i identificació dels residus de CNT3 implicats en la interacció.

Paral·lelament a l'estudi de la interacció d'ADK i CNT3, en la tesi de la Dra. Liska Caviedes, es va estudiar la interacció entre ADK i PAICS. En conjunt, la interacció CNT3/ADK/PAICS podria donar lloc a un sensor de purines. S'hipotetitzava que la interacció CNT3/ADK pot ser sensible als nivells d'adenosina. Si la demanda de nucleòtids de purina és superior als que es poden obtenir per mitjà de la internalització i fosforilació d'adenosina s'alliberaria PAICS, fins al moment inactivada per la unió amb ADK, que podria formar part del purinosoma i així afavorir la síntesi *de novo* de nucleòtids de purina. Un resultat interessant és que en assajos amb proteïna endògena s'ha pogut observar que la isoforma d'ADK que coimmunoprecipita amb PAICS és la llarga (tesi Dra. Liska Caviedes). Això ens porta a pensar que aquesta isoforma podria ser la que interacciona amb CNT3, tot i la diferència de localització. La Dra. Liska Caviedes va clonar l'ADK-L a partir de cDNA de la línia cel·lular Huh7 i es va introduir al vector pcDNA3.1 (+) entre les dianes BamHI i XbaI. S'ha aprofitat en aquest treball per estudiar la interacció entre CNT3 i ADK.

En primer lloc, es va estudiar la colocalització de CNT3 amb les dues isoformes d'ADK transfectant-les en HEK293. Per immunofluorescència (IF) es va observar la diferent localització de cada una de les isoformes d'ADK, ADK-S es localitzava al citoplasma i ADK-L al nucli (**Figura 15**). CNT3 es localitzava a membrana plasmàtica i al voltant del nucli. La distribució de CNT3 semblava que canviava depenent de la isoforma d'ADK amb la que es treballava, CNT3 presentava una major tendència a estar proper al nucli quan es combinava amb ADK-L (**Figura 15**). Per confirmar aquest canvi s'haurien d'obtenir més imatges i quantificar la distribució de CNT3. Es va observar colocalització de CNT3 i ADK en la zona propera al nucli tant amb ADK-S com amb ADK-L (**Figura 15**). ADK-S es trobava proper a la membrana plasmàtica on hi havia CNT3 però no s'observava colocalització sinó que es veia com ADK-S es trobava per davall de la membrana plasmàtica (**Figura 15**). Aquest resultat podria explicar el fet de que en assajos d'electrofisiologia es doni un canvi d'afinitat pel substrat (**Figura 13**) però que no es tradueixi en un canvi de l'activitat a membrana plasmàtica (**Figura 14**) donat que la interacció, en la condició estudiada de cèl·lules en monocapa, no es donaria en aquesta localització. També s'ha de tenir en compte que CNT3 es localitza en epitelis polaritzats i s'expressa específicament en la membrana apical pel senyal que es troba entre els aminoàcids 11 i 25 (Errasti-Murugarren, Casado, and Pastor-Anglada 2010). El fet de treballar amb cèl·lules no polaritzades ens pot portar a la pèrdua de la localització específica del transportador i que per aquest motiu es vegi expressió

intracel·lular de manera que per acabar de validar aquests resultats s'hauria d'estudiar la interacció d'ADK-S i ADK-L amb CNT3 en cultius polaritzats.

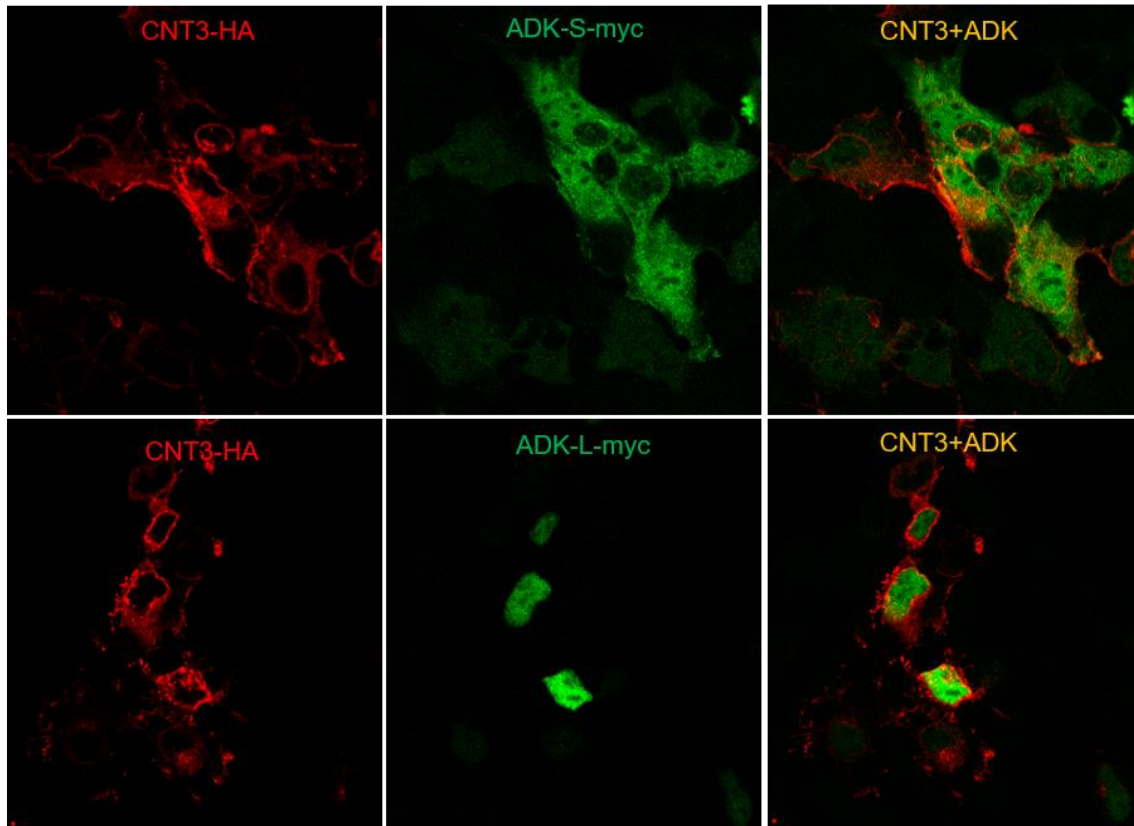


Figura 15. Colocalització de CNT3 i cada una de les isoformes d'ADK. Es van transfectar CNT3-HA i la isoforma curta d'ADK (ADK-S-myc) o la isoforma llarga d'ADK (ADK-L-myc) en HEK293. Es van marcar amb anticossos anti-HA i anti-myc amb els seus respectius anticossos secundaris, HA amb Alexa 647 (vermell) i myc amb Alexa 488 (verd). La colocalització s'observa de color groc. Imatges obtingudes amb el microscopi confocal SP2 a 63x.

Per aprofundir en l'estudi de la interacció entre CNT3 i ADK-L també es van realitzar co-IPs i assajos funcionals. Addicionalment, en aquests assajos, es va treballar per acotar la zona de la cua N-terminal de CNT3 que podria estar interaccionant amb ADK. Per això es va treballar amb diferents proteïnes CNT3 truncades, en concret amb construccions on falten 10 aminoàcids (CNT3 Δ 10) o 49 (CNT3 Δ 49) d'aquesta cua (Errasti-Murugarren, Casado, and Pastor-Anglada 2010). Es van fer servir aquests perquè mantenen la localització a la membrana plasmàtica, altres truncats més llargs queden retinguts al reticle endoplasmàtic a cèl·lules HeLa (Errasti-Murugarren, Casado, and Pastor-Anglada 2010) i queden a l'interior cel·lular en HEK293 (tesi Dra. Olga Casulleras). El primer que es va poder observar va ser que ADK-L també coimmunoprecipitava amb CNT3 (**Figura 16**), el que reforça la idea de que la interacció d'ADK amb CNT3 i amb PAICS poden estar relacionades ja que la mateixa isoforma

d'ADK interacciona amb les dues proteïnes. ADK-S i ADK-L es comportaven de la mateixa manera amb les diferents proteïnes CNT3 truncades. Es mantenia la interacció d'ADK amb CNT3 $\Delta 10$ i, en canvi, la interacció amb CNT3 $\Delta 49$ no es veia tan clara (**Figura 16**). El darrer presentava una banda més tènue però també disminuïa en la proteïna total, pel que semblava que hi hagués menys expressió d'aquest truncat. S'hauria de comprovar aquesta interacció. Actualment, s'estan realitzant estudis d'electrofisiologia en oòcits amb el CNT3 $\Delta 49$ per veure si es produeix la interacció i d'aquesta manera es dona el canvi d'afinitat per adenosina que s'havia observat en CNT3 per la presència d'ADK. Per poder acotar millor el lloc d'interacció s'haurien d'estudiar altres proteïnes truncades amb una major deleció de la cua N-terminal. Una opció seria que ADK estigui interaccionant amb la zona d'exportació del reticle endoplasmàtic a membrana plasmàtica (aminoàcids 57-59) (Errasti-Murugarren, Casado, and Pastor-Anglada 2010) fent possible el canvi de localització que s'ha observat per IF (**Figura 15**). Una vegada es trobat el punt on es perdés la interacció de manera clara es podrien deletar regions concretes mantenint la resta de la cua N-terminal per així acotar els aminoàcids implicats en la interacció.

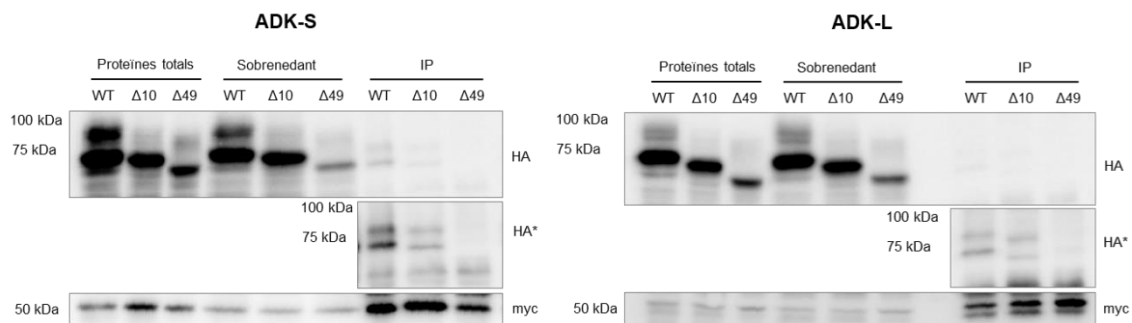


Figura 16. Interacció de les dues isoformes d'ADK amb diferents proteïnes truncades de CNT3. Es van transfectar HEK293 amb combinacions d'ADK-myc (ADK-S o ADK-L) i CNT3-HA (WT i truncat de 10 ($\Delta 10$) o 49 ($\Delta 49$) aminoàcids de la cua N-terminal) durant 48 h. Seguidament, es va realitzar la immunoprecipitació d'ADK amb l'anticòs α -myc i es va detectar la coimmunoprecipitació de CNT3 amb α -HA. En el revelat del WB podem observar HA (CNT3), HA* (més exposició del revelat HA), myc (ADK).

Com s'havia pogut observar (**Figura 14**), la interacció amb ADK-S no modificava l'activitat de CNT3 durant 10 s sense substrat fred, ni amb adenosina ni amb citidina com a substrats. Degut a que també s'observava interacció de CNT3 amb ADK-L es va estudiar l'activitat del transportador amb aquesta isoforma d'ADK. Per la coexpressió d'ADK-L amb CNT3 es va apreciar una disminució d'activitat de CNT3 respecte al transportador sol i en combinació amb ADK-S (**Figura 17**). El canvi no era específic del substrat ja que estava present quan el substrat era adenosina o citidina (**Figura 17**). Aquest resultat preliminar juntament amb la colocalització suggereixen una retirada de

CNT3 de membrana plasmàtica quan interacciona amb ADK-L. Per quantificar els canvis de localització s'haurien de fer fraccionaments cel·lulars per separar la membrana plasmàtica de les altres i així veure l'impacte real d'aquest canvi. Addicionalment, també s'hauria d'estudiar l'efecte de la combinació de CNT3 i ADK-L per electrofisiologia per veure si el comportament és el mateix que amb ADK-S o si aquest depèn de la isoforma.

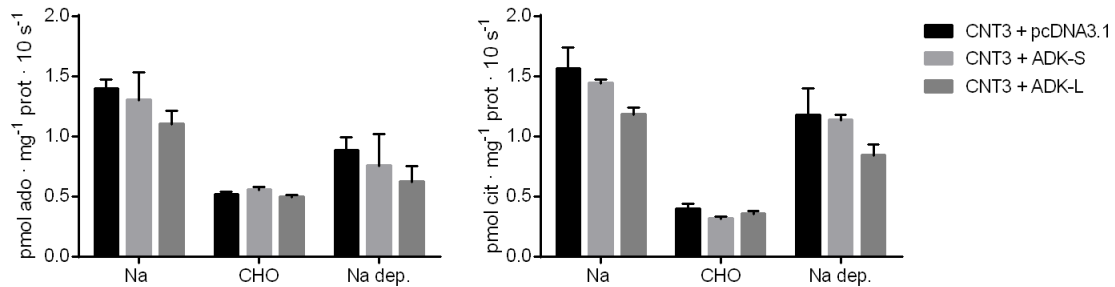


Figura 17. Influència de les diferents isoformes d'ADK en el transport de CNT3. Les cèl·lules HEK293 es van transfectar amb CNT3 sol i en combinació amb ADK-S o ADK-L durant 48 h. Es va mesurar el transport d'adenosina (ado) o citidina (cit) (50 nM, 1 µCi) durant 10 s. En el medi sodi (Na) hi ha activitat d'ENTs i CNTs, en el medi colina (CHO) d'ENTs i la diferència (Na-dep.) és l'activitat dels CNTs. Es representen quadruplicats d'un experiment.

També es va considerar interessant estudiar l'impacte de la interacció de les diferents proteïnes de CNT3 truncades amb les isoformes d'ADK ja que tot i què les dues isoformes es comporten igual en la colIP (**Figura 16**) podria ser que l'efecte funcional fos diferent. En primer lloc, es va estudiar l'activitat dels truncats amb les condicions de transport que s'havien fet servir en aquest estudi (només substrat radioactiu durant 10 s). Els diferents truncats no es van comportar igual ja que hi havia una disminució del transport quan es deleccionava la cua N-terminal tant amb adenosina com amb citidina, especialment en CNT3 $\Delta 10$ (**Figura 18**). Aquestes proteïnes truncades es poden localitzar a la membrana plasmàtica (tesi Dra. Olga Casulleras). Prèviament, s'havia observat canvi en l'activitat amb els truncats CNT3 $\Delta 35$ i CNT3 $\Delta 49$ en altres condicions de transport (24 h posttransfecció en HeLa, 1 µM d'uridina, 1 min) (Errasti-Murugarren, Casado, and Pastor-Anglada 2010). El canvi podria venir determinat per la regulació per proteïnes d'interacció amb la cua N-terminal o per canvis posttraduccional que podrien modificar l'activitat del transportador, com s'ha pogut observar per la glicosilació de CNT1 (Perez-Torras et al. 2019). De fet, en les proteïnes totals dels WB de la **Figura 16** es podia observar una banda de pes molecular superior que podria ser el transportador amb modificacions posttraduccional. La intensitat d'aquesta banda concordava amb els canvis d'activitat que s'havien observat amb les proteïnes truncades (**Figura 16**) pel que aquesta banda podria correspondre al transportador que presenta activitat. És curiós

que CNT3 Δ 49 conservi més activitat que no el truncat més curt CNT3 Δ 10. Això podria ser degut a que canvis en la conformació estructural de la cua N-terminal alterin la possibilitat de dur a terme modificacions posttraduccional. A partir d'aquests resultats es podria estudiar l'activitat de transport combinant cada un dels transportadors truncats amb les isoformes d'ADK per veure si els canvis de transport que s'observen per separat tenen relació amb la interacció de CNT3 i ADK.

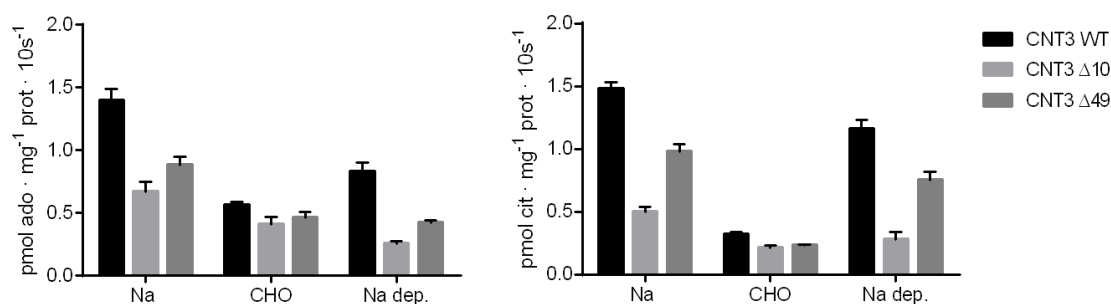


Figura 18. Activitat de CNT3 i els seus truncats. Les cèl·lules HEK293 es van transfectar amb CNT3 WT, CNT3 Δ 10 o CNT3 Δ 49 durant 48 h. Es va mesurar transport d'adenosina (ado) o citidina (cit) ($.50$ nM, 1 μ Ci) durant 10 s. En el medi sodi (Na) hi ha activitat d'ENTs i CNTs, en el medi colina (CHO) d'ENTs i la diferència (Na-dep.) és l'activitat dels CNTs. $n=2$ ado (el gràfic representa la mitjana dels dos experiments independents); $n=1$ cit (el gràfic representa la mitjana dels quadruplicats d'un experiment).

Amb els resultats de la interacció entre CNT3 i ADK que s'han generat en aquest treball es suggereix que aquesta interacció es podria donar de forma intracel·lular. Tot i així, en el cas de la interacció amb ADK-L es podria modificar l'activitat del transportador a membrana plasmàtica degut a la retenció intracel·lular del transportador. Aquesta nova informació ens porta a replantejar la hipòtesi dependent de la isoforma d'ADK que està interaccionant. El fet de que s'estigui unint amb la isoforma llarga podria relacionar l'activitat de CNT3 amb les reaccions de metilació i el cicle de la metionina. En pacients, les mutacions d'ADK estan relacionades amb modificacions en aquestes vies i presenten problemes en el cicle de la metionina que donen hipermetioninèmia, inhibició de la transmetilació i patologia del fetge severa (Bjursell et al. 2011). Els ratolins *Adk*^{-/-} presenten dèficits en la termoregulació, desenvolupen períodes d'apnea intermitents i pateixen esteatosi hepàtica microvesicular (Boison et al. 2002). Amb l'anàlisi dels metabòlits del fetge d'aquests ratolins s'observa un augment de SAH i SAM que indiquen una disrupció de les vies de transmetilació, alhora que també s'observa un augment d'ATP (Boison et al. 2002).

El fenotip que presenten tant els malalts amb mutacions d'ADK com el ratolí KO ens porta a pensar que seria interessant estudiar la interacció en el fetge on podria tenir una repercussió important. El fetge presenta els nivells més elevats d'ADK i s'hi expressen

les dues isoformes (Cui et al. 2011), és l'òrgan on es dona el 80% de les reaccions de transmetilació (Cui et al. 2011). Tant CNT3 com ADK s'expressen en fetge (Human Protein Atlas) però s'ha de tenir en compte que han de coincidir en el mateix tipus cel·lular. ADK es localitza en hepatòcits però, en canvi, CNT3 no s'expressa en aquestes cèl·lules pel que no poden estar interaccionant en hepatòcits. Però, en canvi, ambdues proteïnes s'expressen en el conducte biliar i és important remarcar que la secreció biliar està sota regulació purinèrgica (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2018b). És per això que podria ser interessant estudiar la interacció en colangiòcits on s'ha vist que hi pot haver una redistribució de rCNT3 per efecte de l'adenosina (Godoy et al. 2014).

L'estudi es podria ampliar a altres òrgans on es co-expressen les dues proteïnes tenint en compte que quines isoformes d'ADK presenta cada teixit ja que la distribució no és uniforme en tots ells (Boison 2013). Tant ADK com CNT3 presenten nivells considerables de proteïna en el tracte gastrointestinal (Human Protein Atlas). CNT3 presenta un paper important en l'absorció dels nucleòsids de la dieta i en la regulació dels nivells d'adenosina del tracte gastrointestinal (Antonioli et al. 2013; Pastor-Anglada, Urtasun, and Perez-Torras 2018). La interacció del transportador amb ADK en aquesta localització podria modificar l'afinitat del transportador pels seus substrats i tenir un impacte en l'absorció de nutrients i la senyalització purinèrgica. La senyalització purinèrgica en l'intestí pot regular la motilitat, les funcions secretores i absortives i la sensibilitat (Antonioli et al. 2013). La senyalització dependrà de la distribució de receptors, transportadors i enzims relacionats amb la metabolització d'adenosina de cada regió de l'intestí de manera que es tracta d'una regulació molt complexa (Antonioli et al. 2013). La desregulació d'aquest sistema juga un paper important en la fisiopatologia de desordres del sistema gastrointestinal com malalties inflamatòries, dolor i diarrea. El coneixement de la base d'aquestes patologies pot portar a l'aparició de nous tractaments i es podrien introduir moduladors de la senyalització purinèrgica tot i que s'ha d'anar amb cura ja que els receptors purinèrgics poden afectar a un gran nombre de processos fisiològics (Antonioli et al. 2013).

També es pot aprofundir en l'estudi de la interacció en LLC on s'ha vist que l'activitat d'ADK està augmentada (Dietz and Czebotar 1977) i és el model on es va realitzar l'aproximació proteòmica. Seria interessant mirar quina isoforma s'expressa en aquestes cèl·lules i en quina localització es produeix la interacció ja que en aquest cas no es tracta de cèl·lules polaritzades i s'hauria d'observar en la localització on es dona de manera natural. En aquest tipus de cèl·lules també s'ha vist que la localització de CNT3 és intracel·lular el que és un problema pel tractament de la malaltia ja que es crea resistència a la fludarabina que, en part, s'internalitza per aquest transportador

(Fernandez-Calotti and Pastor-Anglada 2010) i podria ser que la localització estigui modificada per la interacció amb ADK. També es podria estudiar per electrofisiologia si el canvi que s'ha observat sobre l'afinitat de CNT3 per adenosina també es donaria quan el substrat fos fludarabina i estudiar com es podria modificar la interacció per afavorir l'entrada del fàrmac.

2. Estudi de la interacció amb SAMHD1

SAMHD1 és una proteïna amb funció trifosfohidrolasa i nucleasa implicada en la restricció viral, essent un factor de resistència rellevant en la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) (Laguet et al. 2011). Mutacions en aquest gen provoquen la malaltia autoimmunitària anomenada síndrome d'Aicardi-Goutières (Rice et al. 2009). Per la seva funció trifosfohidrolasa regula els nivells de dNTPs de la cèl·lula i, per la similitud estructural, també pot interferir en els nivells dels anàlegs de nucleòsids, com és el cas de la citarabina (Schneider et al. 2017). A més, també s'ha demostrat que SAMHD1 pot ser un gen supressor de tumors (Schaller and Herold 2019) ja que una desregulació dels nivells de nucleòtids porta a un perfil mutagènic que afavoreix el desenvolupament de càncer (Kumar et al. 2011; Mathews 2015). De fet, s'han detectat mutacions en SAMHD1 en varietat de tumors, entre ells diferents tipus de leucèmia com és el cas d'LLC i leucèmia prolimfocítica de cèl·lules T (T-PLL) (Clifford et al. 2014; Johansson et al. 2018).

Degut a la relació que hi ha entre SAMHD1 i LLC ens va semblar interessant estudiar la interacció de CNT3 i SAMHD1, ja que aquest enzim es va identificar precisament utilitzant cèl·lules primàries d'aquesta malaltia. La possible limitació a l'hora de plantejar inicialment l'estudi de la interacció d'aquestes dues proteïnes era que, en principi, CNT3 es localitza a membrana plasmàtica i SAMHD1 a nucli, tot i que com ja s'ha discutit en l'apartat anterior la ubicació subcel·lular de CNT3 potser sigui més "flexible" en funció de proteïnes reguladores i del propi model cel·lular estudiat. En aquest sentit, cal recordar que en LLC es va veure que CNT3 es troba en vesícules intracel·lulars (Fernandez-Calotti and Pastor-Anglada 2010) properes al nucli. Per altra banda, a nivell funcional, tant CNT3 com SAMHD1 permeten regular els nivells de nucleòtids dins la cèl·lula i podrien estar actuant de manera coordinada.

2.1. Interacció de CNT3 i SAMHD1 en fase G2/M

Com a primera aproximació per estudiar la interacció es va fer servir la línia cel·lular HEK293 amb la transfecció estable de CNT3 (HEK-CNT3) ja que els CNTs estan relacionats amb l'estat de diferenciació i en les línies cel·lulars no se'n manté l'expressió,

el que limita el seu estudi. En canvi, els nivells de SAMHD1 que es van mesurar eren els endògens.

Per estudiar la colocalització de les dues proteïnes es van realitzar IFs de CNT3 i SAMHD1. En la línia cel·lular HEK-CNT3 es va observar una gran expressió de CNT3, amb major senyal a la membrana plasmàtica. SAMHD1 es trobava a nucli i de manera basal no s'apreciava colocalització de les dues proteïnes (**Figura 19** panell superior). En canvi, quan la cèl·lula s'estava dividint, SAMHD1 sortia del nucli i podia interaccionar amb CNT3 de manera intracel·lular i també a prop la membrana plasmàtica (**Figura 19** panell inferior). Això ens va portar a pensar que la interacció no existia de manera constitutiva sinó que es donava en un moment concret del cicle cel·lular per regular els nivells de nucleòtids. Quan la cèl·lula s'està dividint ja ha acabat de dur a terme la replicació del DNA i SAMHD1 s'encarrega de desfosforilar els dNTPs sobrants (Franzolin et al. 2013). En vista d'aquestes imatges podria ser que en aquest punt també hi tingués un paper rellevant CNT3.

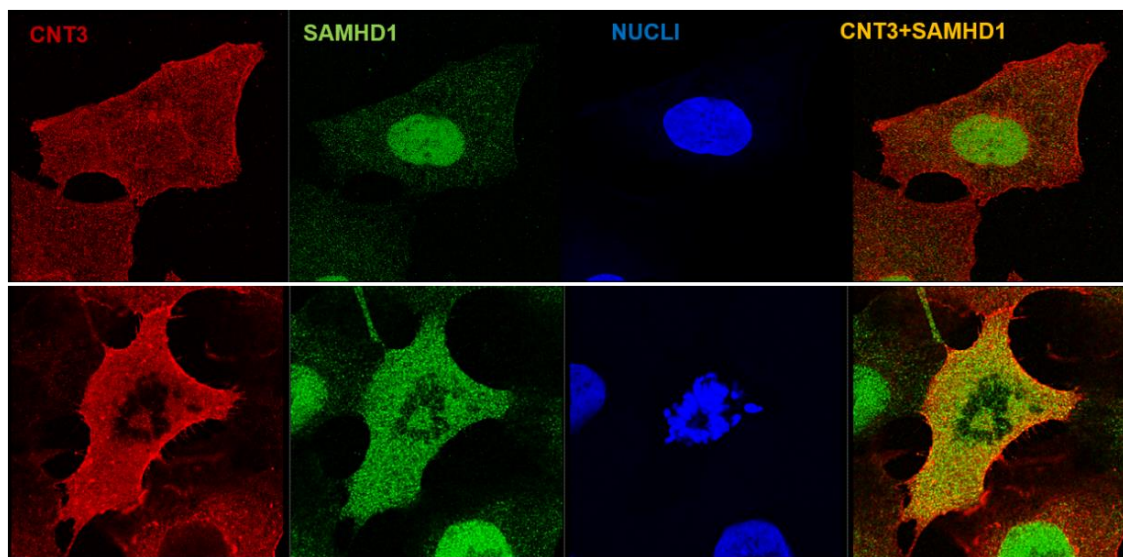


Figura 19. Immunofluorescència de CNT3 i SAMHD1 en HEK-CNT3. Es van fer servir anticossos α -CNT3 i α -SAMHD1 i els anticossos secundaris corresponents per marcar CNT3 en vermell i SAMHD1 en verd. El color groc representa colocalització. Els nuclis es van marcar amb Hoescht. En la imatge inferior la cèl·lula està en fase de divisió. Imatges de microscòpia confocal realitzades per la Dra. Nerea Urtasun amb el microscopi Leica TCS SP8.

Per seguir amb l'estudi de la interacció en aquest punt del cicle cel·lular es va treballar amb l'enriquiment del cultiu cel·lular en fase G2/M. Per això, es va fer servir el tractament amb nocodazol 25 ng/mL durant 12 h, condicions que es van posar a punt avaluant el cicle cel·lular i aquesta va ser la condició on es va aconseguir un major enriquiment sense que es donàs una gran mort cel·lular. Es va observar colocalització de les dues

proteïnes a nivell intracel·lular i a prop de la membrana plasmàtica (**Figura 20**). Les cèl·lules presentaven forma arrodonida (**Figura 20**) degut a que el tractament amb nocodazol interfereix en la polimerització dels microtúbuls i les cèl·lules perden la seva estructura. Tanmateix, això podria donar lloc a colocalitzacions inespecífiques. S'hauria d'estudiar alguna estratègia per afavorir l'enriquiment en fase G2/M, tot i que és complicat ja que altres mètodes, com la privació de sèrum, modifiquen els nivells de nucleòtids disponibles i aquest és un factor que de *per se* ja podria afectar la interacció. Una altra aproximació possible és realitzar el bloqueig per timidina que sincronitza les cèl·lules en fase G1/S i es podrien deixar avançar fins a G2/M. En aquest cas però es fa servir un nucleòsid per a la sincronització, de manera que la interpretació dels resultats també seria complicada per l'efecte sobre el metabolisme de nucleòtids que pot tenir aquest tractament.

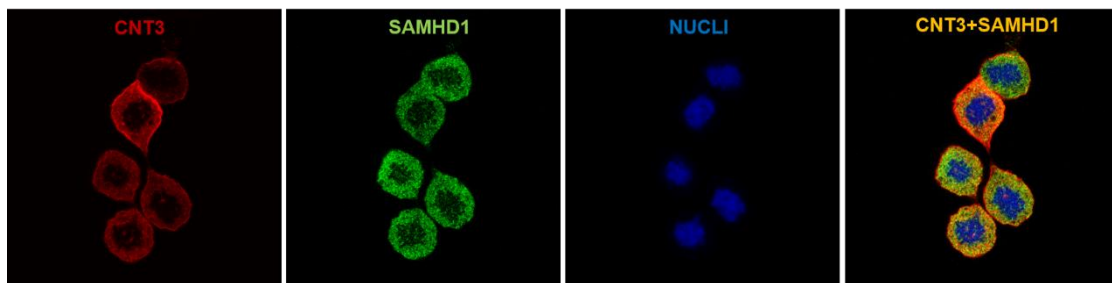


Figura 20. Colocalització CNT3 i SAMHD1 en HEK-CNT3 amb tractament de nocodazol. La línia cel·lular HEK-CNT3 es va tractar amb nocodazol 25 ng/ml durant 12 h. Es van fer servir els anticossos α -CNT3 i α -SAMHD1 i els anticossos secundaris corresponents per marcar CNT3 amb Alexa 647 (vermell) i SAMHD1 amb Alexa 488 (verd). El color groc representa colocalització. Els nuclis es van marcar amb Hoescht. Imatges de microscopia confocal 63x amb el microscopi Leica SP2.

Es van realitzar colIPs baix les mateixes condicions que les immunofluorescències. CNT3 va coimmunoprecipitar amb SAMHD1 (**Figura 21A**) i la interacció semblava millorar amb el tractament amb nocodazol (**Figura 21B**). El que reafirma que aquesta interacció es podria donar quan la cèl·lula s'està dividint.

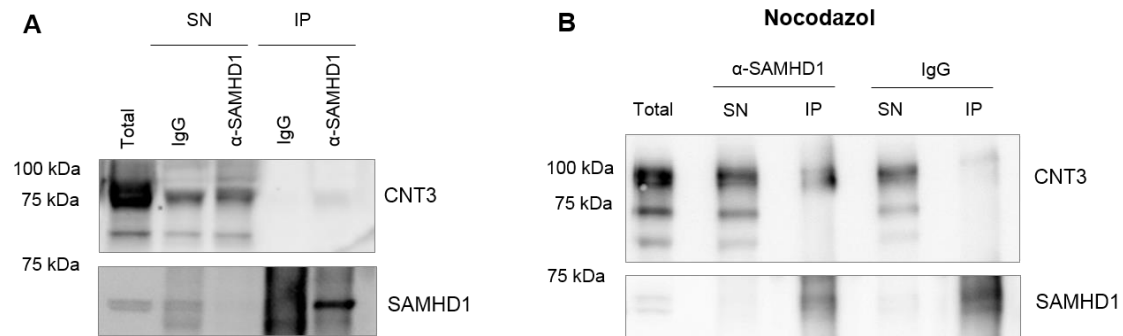


Figura 21. Efecte del nocodazol en la coimmunoprecipitació de CNT3 i SAMHD1. Es va realitzar la immunoprecipitació de SAMHD1 i es van detectar CNT3 i SAMHD1 en A) cèl·lules HEK-CNT3 (experiment realitzat per la Dra. Nerea Urtasun) i B) cèl·lules HEK-CNT3 tractades amb nocodazol 25 ng/ml durant 12 h.

Per estudiar la co-IP en l'altre sentit es va fer servir la transfecció de CNT3-HA en la línia cel·lular HEK293. En aquest cas no es va immunoprecipitar directament el transportador perquè no hi ha cap anticòs que funcioni bé per aquesta aplicació. Amb aquesta aproximació no es va aconseguir coimmunoprecipitar SAMHD1 (**Figura 22**). En el grup s'havia afegit el tag HA a CNT3 en la zona C-terminal ja que s'estudiaven interaccions amb la cua N-terminal del transportador pel que no hauria d'influenciar la interacció de les proteïnes que s'uneixen a aquesta cua. Tot i així, no es pot descartar que pugui estar donant algun canvi conformacional al transportador que pugui fer que es perdi la interacció amb SAMHD1. Per això, es va deixar de fer servir aquesta aproximació per a l'estudi de la interacció CNT3-SAMHD1.

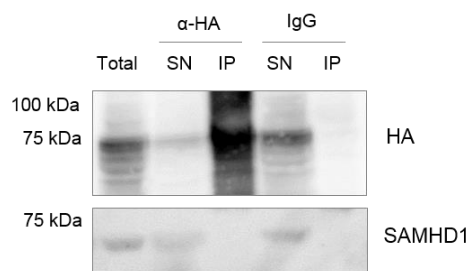


Figura 22. Coimmunoprecipitació de CNT3-HA i SAMHD1. Es va transfectar la línia cel·lular HEK293 amb CNT3-HA durant 48 h. Es va immunoprecipitar HA i es van detectar SAMHD1 i HA.

2.2. Efecte de la disminució de SAMHD1 en l'expressió i activitat dels transportadors de nucleòsids.

Per estudiar la repercussió dels canvis en els nivells de SAMHD1 en HEK-CNT3 es va silenciar SAMHD1 a diferents temps. En primer lloc, es va estudiar l'efecte del silenciament de SAMHD1 durant 24, 48 i 72 h sobre el cicle cel·lular. No es van observar canvis (**Figura 23A**) tot i que aquest efecte sí que s'ha vist en un estudi anterior on la cèl·lula presentava nivells massa alts de nucleòtids, sobretot de dGTP. Això provocava un canvi en la proporció de cada un dels nucleòtids. De manera que en les cèl·lules en proliferació, el silenciament de SAMHD1 interferia en la regulació de la mida dels *pools* de dNTPs el que causava un retard en la fase G1 del cicle cel·lular (Franzolin et al. 2013). La diferència amb els nostres resultats pot ser pel tipus cel·lular utilitzat, ja que ells fan servir fibroblasts immortalitzats i fibroblasts de pulmó. En canvi, en aquest cas s'ha fet servir una línia cel·lular que podria tenir alguna modificació en el control del cicle i que, a més, presenta una sobreexpressió del transportador CNT3 que presumiblement també deu estar modificant els nivells de nucleòtids. Es podria repetir aquest experiment en HEK293 sense expressió del transportador o en algun tipus cel·lular que expressi de manera endògena ambdues proteïnes, com podrien ser els macròfags o cèl·lules d'LLC.

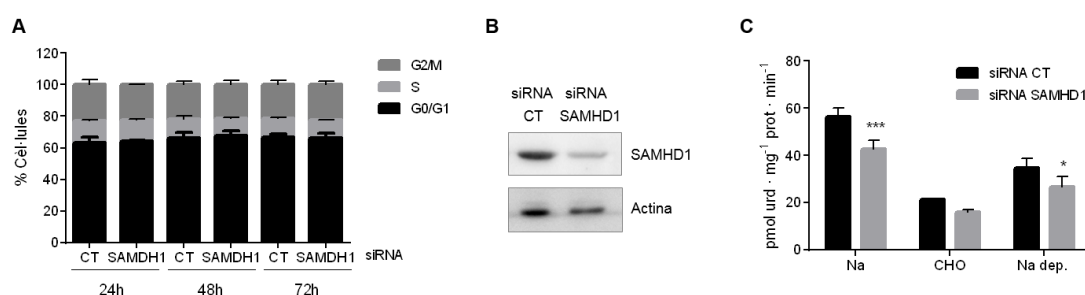


Figura 23. Efecte del silenciament de SAMHD1 en el cicle cel·lular i l'activitat de CNT3. Es va silenciar SAMHD1 a la línia HEK-CNT3 i A) es va analitzar el cicle cel·lular a les 24 h (n=2), 48 h (n=3) i 72h (n=2). B) es va mesurar l'expressió de proteïna de SAMHD1 per WB a les 48 h de silenciament C) es va mesurar l'activitat dels transportadors de nucleòsids (1 μ M d'uridina, 1 μ Ci 1 min) a les 48h. Les dades representades corresponen a la mitjana \pm SEM de 3 experiments independents. L'estadística representa t-test de dades aparellades * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

A les 48h de silenciament es va apreciar una disminució rellevant dels nivells de SAMHD1, tot i que el silenciament no arribava a ser complet (**Figura 23B**). Baix aquestes condicions es va observar una disminució en el transport global (Na) i Na-dep (**Figura 23C**) que podria estar regulant els nivells d'entrada de nucleòsids el que ens porta a pensar que hi podria haver un lligam funcional entre els nivells de

nucleòsids/nucleòtids de dins la cèl·lula, que en aquest cas han variat per la disminució dels nivells de SAMHD1, i l'activitat de CNT3.

Degut a les limitacions que es van poder observar per la sobreexpressió de CNT3 es va voler estudiar aquesta regulació de manera més fisiològica. SAMHD1 presenta expressió ubícua així que l'expressió endògena limitant del nostre model era CNT3. Els macròfags derivats de monòcits l'expressen (Minuesa et al. 2008) i la funció de SAMHD1 és rellevant en aquestes cèl·lules com a factor de restricció viral (Laguette et al. 2011). Per aquesta raó es van fer servir aquestes cèl·lules com a model. Gràcies a una col·laboració amb la Dra. Ester Ballana es va tenir accés a macròfags derivats a partir de monòcits de donants de sang sans. Per dur a terme el silenciament de SAMHD1 en aquests cultius primaris es va fer servir la proteïna viral X (Vpx) que permet la degradació de SAMHD1 a proteasoma (Laguette et al. 2011).

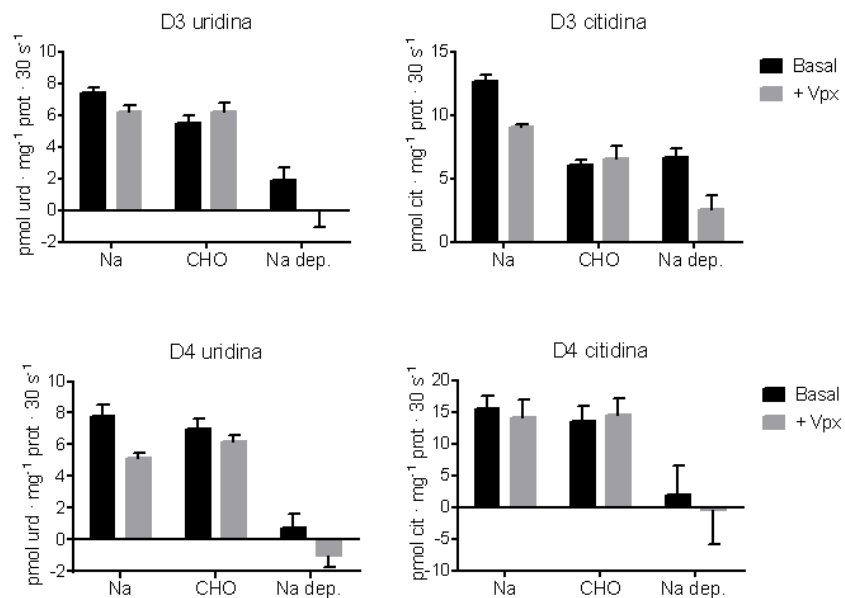


Figura 24. Efecte en l'activitat de transport per la disminució dels nivells de proteïna de SAMHD1 per Vpx en macròfags de donants sans. Es va estudiar el transport d'uridina (urd) i citidina (cit) (1 μ M, 2 μ Ci, 30 s) en medi Na (transport equilibratiu i concentratiu) i medi colina (CHO) (transport equilibratiu). La diferència (Na-dep) correspon al transport concentratiu. Es representa la mitjana \pm SEM de sextuplicats d'un experiment.

En una primera aproximació es van fer servir les cèl·lules de dos donants diferents i com a substrats es van fer servir uridina i citidina. Uridina és substrat de tots els transportadors de nucleòsids i permet tenir una idea general de si es donen canvis en el transport global. En el cas de citidina és substrat d'ENT1, ENT2, CNT1 i CNT3 el que ens permet acotar una mica quin transportador és responsable dels canvis. Les cèl·lules es van incubar amb el medi de transport durant 30 segons per assegurar que s'estava

mesurant la velocitat inicial ja que sinó es podria estar mesurant acumulació del nucleòsid i els seus derivats i no l'activitat de transport. Els donants D3 i D4 presentaven transport equilibratiu (CHO) tant per uridina com per citidina que no variava pel fet de disminuir els nivells de SAMHD1 (**Figura 24**). El donant D3 presentava transport concentratiu (Na-dep.) d'uridina que desapareixia amb Vpx i una disminució del transport concentratiu de citidina, sense que arribàs a desaparèixer (**Figura 24**). Aquest resultat sembla incoherent ja que si no hi ha transport Na-dep d'uridina que s'internalitza per tots els transportadors, en principi tampoc n'hi hauria d'haver de citidina. Això es podria explicar perquè l'activitat d'algun dels CNTs augmenti i d'algun altre disminueixi i l'entrada global sigui 0 o també es podria explicar per l'afinitat dels transportadors per cada un dels nucleòsids. L'afinitat per uridina difereix entre els diferents transportadors (CNT1: 38 μM , CNT2: 116 μM , CNT3: 5.3 μM). En canvi, l'afinitat per citidina és pràcticament igual (CNT1: 3.1 μM , CNT3: 3.5 μM). D'aquesta manera, en el cas d'uridina el transport que observem podria ser degut a la contribució de CNT3 (**Figura 24**) que és el que presenta més afinitat i desapareixia per la disminució de SAMHD1. En el cas de citidina la disminució també es podria donar per CNT3 tot i que s'observava que també hi hauria transport de CNT1, que no es podia apreciar en el cas d'uridina (**Figura 24**). De ser així s'estaria demostrant la disminució de transport de CNT3 quan es disminueixen els nivells de SAMHD1 com havíem vist en la línia cel·lular HEK-CNT3 (**Figura 23C**).

Per confirmar que aquest transport era degut a CNT3 s'havien de fer inhibicions creuades. Pel fet de treballar amb cèl·lules primàries no es va tenir accés a cèl·lules dels mateixos donants però es va fer un nou experiment amb altres donants. A més, un altre factor que pot afectar als nivells de transport és el patró d'expressió de cada un dels transportadors. Aquest pot ser diferent en cada donant i es podria veure afectat per la disminució de SAMHD1. Per això, en aquest segon experiment també es van mesurar els nivells d'mRNA dels diferents transportadors.

En aquest cas es van estudiar tres donants diferents. A nivell d'mRNA es va observar variabilitat en l'expressió dels diferents transportadors entre els donants (**Figura 25**), pel que podem dir que el patró d'expressió dels transportadors de nucleòsids és específic per cada un d'ells. Un punt que podria estar afectant a això és el nivell de diferenciació de cada un dels cultius, al marge de la inherent variabilitat interindividual com ja s'havia descrit en estudis d'expressió d'ENTs i CNTs en cèl·lules primàries d'LLC (Molina-Arcas et al. 2003). L'efecte de la disminució dels nivells proteics de SAMHD1 va variar l'expressió d'mRNA dels transportadors tot i què de manera diferent depenent de cada donant (**Figura 25**). L'expressió de CNT3 basal era la més homogènia de tots els

transportadors. L'expressió de CNT2 era la que, per l'acció de Vpx, es va mantenir més estable respecte al seu basal. L'efecte de la disminució de SAMHD1 sobre CNT1 i CNT3 era variable entre donants, es mantenien iguals, augmentaven o disminuïen. En canvi, ENT1 i ENT2 es mantenien o augmentaven però no es veia disminució en cap dels casos.

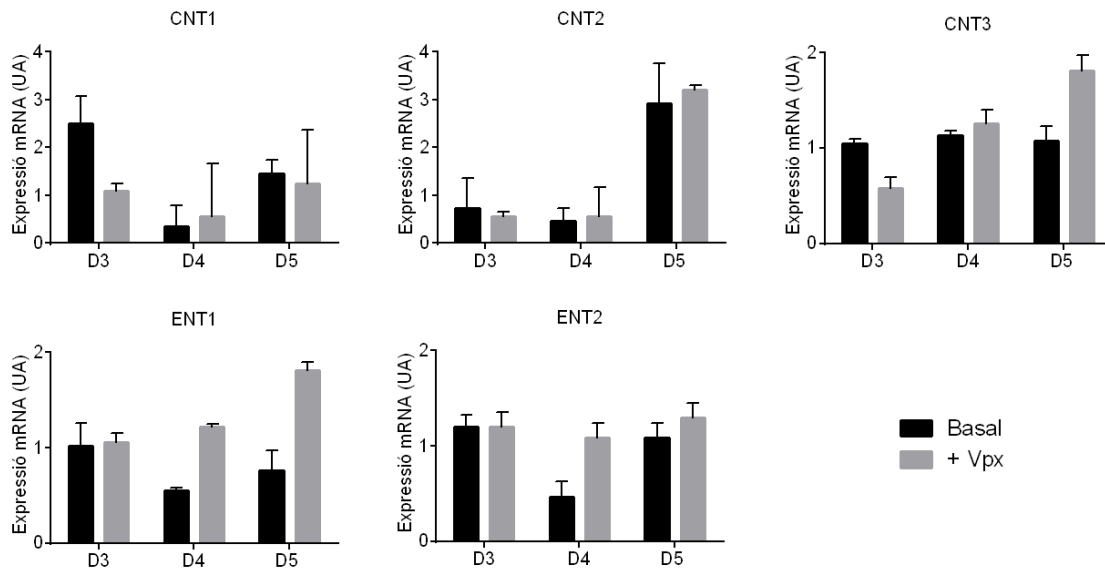


Figura 25. Modulació dels nivells d'mRNA dels transportadors concentratius i equilibratius per la degradació de SAMHD1. Monòcits de donants sans es van diferenciar a macròfags i es van tractar amb la partícula viral Vpx durant 48 h per disminuir els nivells proteics de SAMHD1. Per RT-PCR es van analitzar els nivells relatius d'mRNA de cada un dels transportadors. Les dades representen la mitjana \pm SEM dels duplicats d'un experiment. Les dades s'expressen en unitats arbitràries (UA) respecte a la mitjana de l'expressió dels tres donants.

Per poder definir la participació de cada un dels transportadors concentratius de nucleòsids a nivell funcional, es van fer servir com a substrats citidina i guanosina que permeten distingir entre els transportadors de pirimidines (CNT1 i CNT3) i de purines (CNT2 i CNT3). Degut a què CNT3 transloca ambdós substrats també es van fer inhibicions creuades amb concentracions saturants de nucleòsid sense marcar. És a dir, per veure la contribució de CNT2 es va fer servir guanosina tritiada i 100 μ M de citidina sense marcar i per estudiar CNT1 es va utilitzar citidina tritiada i 100 μ M de guanosina sense marcar. D'aquesta manera el substrat marcat no entra per CNT3 perquè està internalitzant l'altre substrat que es troba en major concentració. En aquest cas la incubació amb el substrat radioactiu va ser d'un minut en els experiments de citidina i dos minuts en els de guanosina.

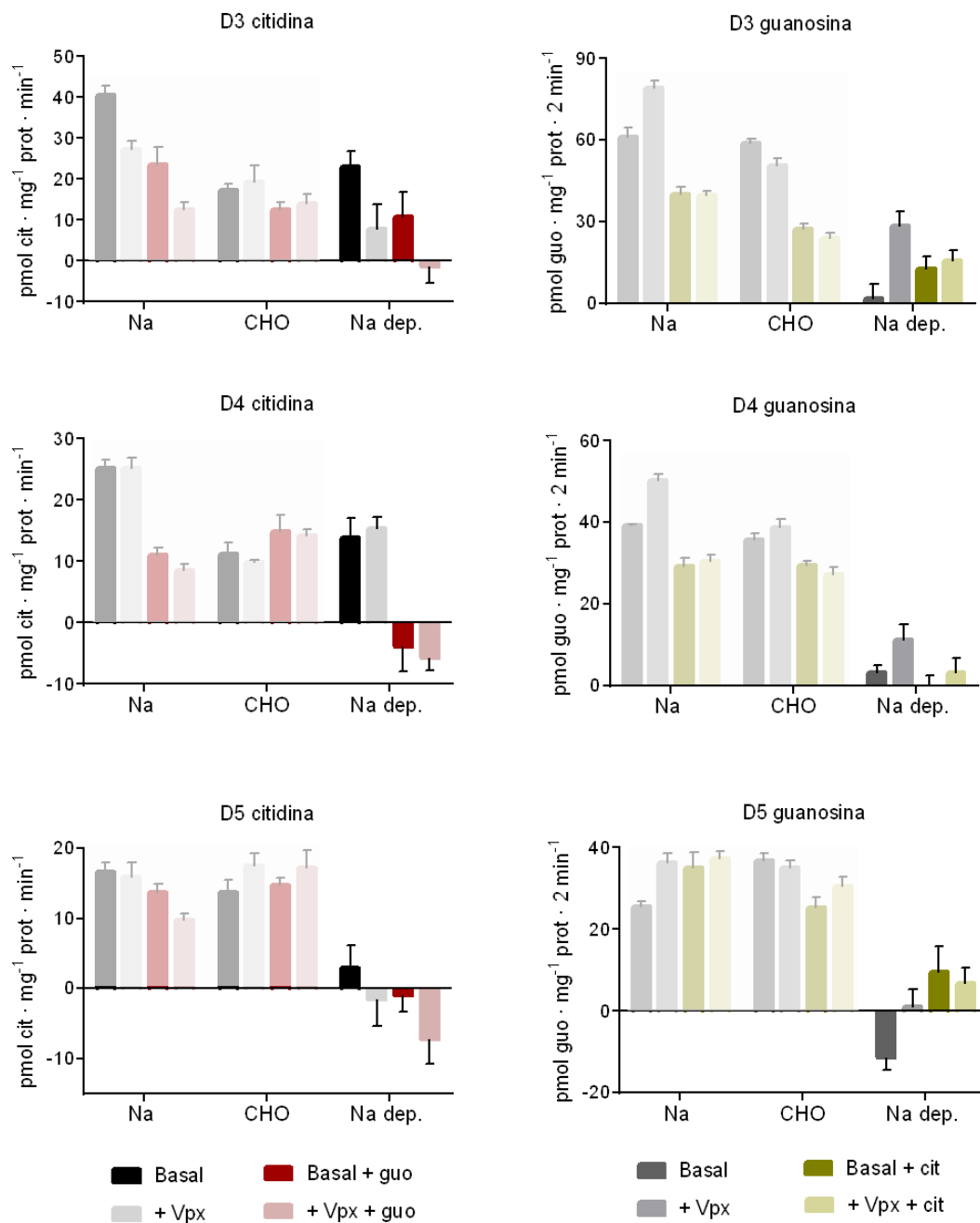


Figura 26. Efecte en l'activitat de transport per la disminució dels nivells de proteïna de SAMHD1 per Vpx en macròfags de donants sans. Es va estudiar el transport de citidina (1 μM , 2 μCi) durant 1 minut i de guanosina durant 2 minuts en medi Na (transport equilibratiu i concentratiu) i medi colina (transport equilibratiu). La diferència (Na-dep) correspon al transport concentratiu. També es van realitzar inhibicions creuades amb excés de nucleòsids per diferenciar entre els diferents transportadors concentratius. CNT1 transporta pirimidines, CNT2 purines i CNT3 ambdós tipus de nucleòsids. Amb citidina amb excés de guanosina (100 μM) es pot veure el transport d'aquest nucleòsid per part de CNT1. En canvi, amb guanosina amb excés de citidina (100 μM) s'observa el transport de CNT2. Es representa la mitjana \pm SEM de sextuplicats d'un experiment.

En el transport de citidina, D3 presentava una disminució del transport concentratiu (Na-dep) per la disminució de SAMHD1 (barra negra) (**Figura 26**). Amb la inhibició per guanosina es va observar que disminuïa el transport respecte al basal però no desapareixia, el que indica que hi havia contribució tant de CNT1 (barra vermella) com de CNT3 (diferència entre barra negra i vermella) en el transport de citidina. Per l'acció de Vpx desapareixia el transport concentratiu (Na-dep.) de citidina (**Figura 26**). Els canvis observats en el transport coincidien amb els canvis d'mRNA ja que s'expressaven tant CNT1 com CNT3 i disminuïen els nivells d'ambdós (**Figura 25**). D4 només presentava transport concentratiu de citidina per part de CNT3 ja que amb la inhibició per guanosina no hi ha activitat Na-dep. A més, CNT3 no presentava canvis per Vpx. Aquest resultat diferia amb el del donant D3 però es podia explicar per l'absència de canvis en els nivells d'mRNA de CNT3 i pels nivells d'mRNA de CNT1 al límit de detecció. El transport equilibratiu (CHO) de citidina es mantenia bastant constant per l'acció de Vpx encara que, en alguns casos, hi havia canvis importants en els nivells d'mRNA (**Figura 26**). L'activitat equilibrativa no es veia modificada per la inhibició per guanosina. Tanmateix això es pot explicar ja que la concentració de guanosina que es va fer servir és inferior a l'afinitat dels ENTs per aquest nucleòsid (ENT1: 140 μM , ENT2: 2700 μM). Els macròfags del donant D5 pràcticament no presentaven transport concentratiu (**Figura 26**) tot i què es detectaven els mRNA dels tres CNTs, amb els nivells de CNT2 més alts dels donants (**Figura 25**).

En el transport de guanosina, es van observar canvis que es repetien en els tres donants (**Figura 26**) i eren independents de les alteracions en l'expressió d'mRNA dels transportadors (**Figura 25**). En aquest cas la mesura de l'activitat es va fer després de dos minuts d'incubació amb el medi de transport, en part degut a que CNT3 presenta menor afinitat per guanosina (8.5 μM) que per citidina (3.5 μM) i ens preocupava no assolir prou sensibilitat en l'assaig si es feia només en un minut. Tanmateix, atenent als resultats podria ser que aquest temps fos massa llarg i que s'hagués mesurat en realitat l'acumulació del nucleòsid i dels seus possibles metabòlits i no necessàriament el transport en velocitat inicial, per la qual cosa es feia difícil comparar els resultats amb els de citidina. El transport concentratiu (Na-dep) de guanosina era pràcticament negligible i augmentava per la disminució de SAMHD1 (**Figura 26**). L'augment del transport concentratiu per Vpx en el transport de guanosina ens duu a pensar que hi ha algun tipus de regulació per part de SAMHD1 que no depèn dels canvis en els nivells d'expressió dels transportadors. A més, en aquestes condicions, en els tres donants s'observava una disminució del transport equilibratiu (CHO verd). No s'esperava una inhibició dels ENTs per part de citidina ja que presenten baixa afinitat per aquest substrat

(ENT1: 580 μ M, ENT2: 5610 μ M). Els canvis ens mostren que els nivells de nucleòtids poden portar a algun tipus de regulació sobre el transportador, a part de la transcripcional. Podria ser per canvis en la fosforilació, se n'han descrit exemples pels ENTs o per regulació de l'oligomerització que eventualment podria estar regulada de forma al·lostèrica. Per avaluar aquestes opcions faria falta dur a terme més experiments.

Pel que fa a l'expressió dels transportadors equilibratius juntament amb els resultats funcionals, es va observar un augment dels nivells d'mRNA d'ENTs en diferents donants per l'acció de Vpx (**Figura 25**) però no es traduïen en un augment del transport (**Figura 26**). Per seguir en l'estudi d'aquesta alteració es van mesurar els nivells d'mRNA dels ENTs en la línia cel·lular HEK-CNT3 amb el silenciament de SAMHD1 a diferents temps. A 48 h es va observar la major variació en els nivells d'expressió dels ENTs, sobretot l'augment d'ENT2 (**Figura 27**). Aquest canvi tampoc s'havia vist reflectit en modificacions del transport equilibratiu baix aquestes condicions (**Figura 23C**; CHO). Aquest nivell de regulació a nivell d'mRNA d'ENT2 pot estar relacionat amb l'expressió d'ENT2 a la membrana nuclear, ja que s'ha observat que algunes isoformes d'ENT2 es troben en aquesta localització i permeten regular els nivells de nucleòsids al nucli així com la regulació dels nivells d'ENT2 que s'expressen a membrana plasmàtica (Grane-Boladeras, Spring, et al. 2016). SAMHD1, a la vegada, també s'encarrega de la regulació dels nivells de nucleòsids a nucli ja que és en aquest orgànul on duu a terme la seva funció. Per aprofundir en aquest aspecte seria interessant estudiar la contribució a aquest augment de cada una de les isoformes d'ENT2.

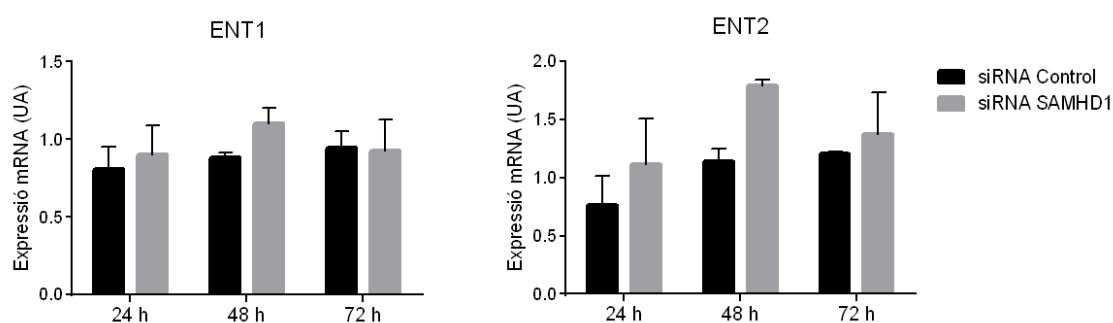


Figura 27. Efecte del silenciament de SAMHD1 en els nivells d'mRNA dels transportadors equilibratius. Es va silenciar SAMDH1 durant 24 h, 48 h i 72 h en les cèl·lules HEK-CNT3. Per RT-PCR es van estudiar els nivells d'mRNA d'ENT1 i ENT2. Es representa la mitjana \pm SEM de tres experiments independents. Es va realitzar t-student de dades aparellades. En ENT2 48 h p-valor = 0.0516

La interacció entre CNT3 i SAMHD1 pot estar regulant els nivells intracel·lulars de nucleòsids una vegada s'ha acabat la replicació, les cèl·lules ja s'estan dividint i s'han de disminuir els nivells de dNTPs. En aquest moment s'aprecia interacció d'ambdues

proteïnes a membrana plasmàtica. A més, els canvis d'expressió de SAMHD1 donen canvis en el perfil d'expressió dels transportadors en macròfags humans. En el cas dels CNTs aquests canvis d'expressió coincideixen amb canvis en el transport de citidina. Els substrats de SAMHD1 també són els seus reguladors al·lostèrics i, per tant, un canvi en l'expressió de la proteïna també pot dur a un canvi en els nivells de nucleòtids que afectarà a l'activació del SAMHD1 restant, així com també canvis en la regulació d'altres enzims del metabolisme de nucleòtids com és el cas de la RNR. Per mantenir els nivells de nucleòsids i nucleòtids de la cèl·lula es podria estar compensant per canvis en l'expressió i/o activitat de transportadors de nucleòsids que podrien internalitzar nucleòsids intracel·lulars per arribar als nivells necessaris a l'interior cel·lular.

La interacció també podria estar regulant la resposta de les cèl·lules d'LLC al tractament amb fludarabina. Tot i que la fludarabina no és tan bon substrat de SAMHD1 com citarabina (Knecht et al. 2018) el seu efecte pot estar influenciat per l'estat de SAMHD1 ja que es pot afectar la incorporació del fàrmac per la desregulació dels nivells de nucleòtids. De manera que aquesta interacció també pot ser important per al tractament de l'LLC, ja que s'estan tocant dos punts importants del metabolisme de la fludarabina: un és l'entrada dins la cèl·lula que pot ser a través de CNT3 i l'altra és la freqüència amb què s'incorporarà al DNA depenent dels nivells de nucleòtids que hi ha dins la cèl·lula.

Capítol 2. Validació bioquímica i funcional de la interacció entre CNT3 i QDPR.

Degut a la limitació que presenta el *GST-pull down* per a l'estudi de proteïnes amb regions transmembrana hidrofòbiques, en el grup es va plantejar la possibilitat de dur a terme alguna altra tècnica que permetés determinar proteïnes d'interacció dels CNTs amb la seva conformació estructural nadiua a la membrana plasmàtica i no només emprant la cua N-terminal soluble com a esquer. Per això, dins el marc de la tesi doctoral del Dr. Albert Viel es va establir una col·laboració amb el grup del Dr. Igor Stagljar (University of Toronto, Canadà) per dur a terme el *Membrane Yeast Two Hybrid* (MYTH), tècnica en la que són pioners.

Les proteïnes d'interacció que s'identifiquen poden ser tant altres proteïnes de membrana com citosòliques que puguin estar en contacte amb l'esquer. Una altra avantatge d'aquesta tècnica és que es duu a terme en un sistema eucariota (en el nostre cas llevat, tot i que més recentment el mètode ja s'ha implementat en cèl·lules de mamífer). Això permet que es donin les modificacions posttraduccionals que trobem en els humans i que no es donen quan es fan servir models procariotes. D'aquesta manera si la interacció depèn d'un d'aquests canvis també podrà ser detectada.

En el MYTH s'aprofita la característica de la ubiquitina que permet dividir la proteïna en dos dominis estables: l'N-terminal (Nub) (**Figura 28A** verd) i el C-terminal (Cub) (**Figura 28A** blau) (Snider et al. 2010) que es poden expressar per separat i quan s'uneixen formen pseudoubiquitina (**Figura 28B**). Es muta la isoleucina 13 (Nubl) (**Figura 28B**) per glicina (NubG) el que fa que la unió entre els dos dominis sigui més feble (**Figura 28C**) de manera que si aquesta unió es dona, sigui específica. Per dur a terme la tècnica s'han de generar diferents construccions. Per una banda, al domini C- o N-terminal de la proteïna d'interès (*bait*) s'hi uneix Cub fusionat a la molècula reportera (TF) que està composta pel domini d'unió al DNA LexA d'*Escherichia coli* i el domini d'activació transcripcional VP16 del virus herpes símplex. Per altra banda, les possibles proteïnes d'interacció (*preys*) s'uneixen a NubG i a un tag que permeti la verificació de l'expressió i la validació (**Figura 28D**). Quan el *bait* interacciona amb alguna *prey*, s'uneixen els dos dominis generant pseudoubiquitina i poden actuar els enzims desubiquitinadors citoplasmàtics permetent l'alliberament del TF i l'expressió dels factors de resistència (**Figura 28D**). D'aquesta manera les colònies de llevat que presenten proteïnes que estan interaccionant s'expressen i així es pot fer la identificació del *prey* (Snider et al. 2010).

Si aquesta tècnica es vol fer servir per fer un cribratge de possibles proteïnes d'interacció, la unió a NubG es fa a llibreries de DNA i es coexpressen amb el *bait* d'estudi.

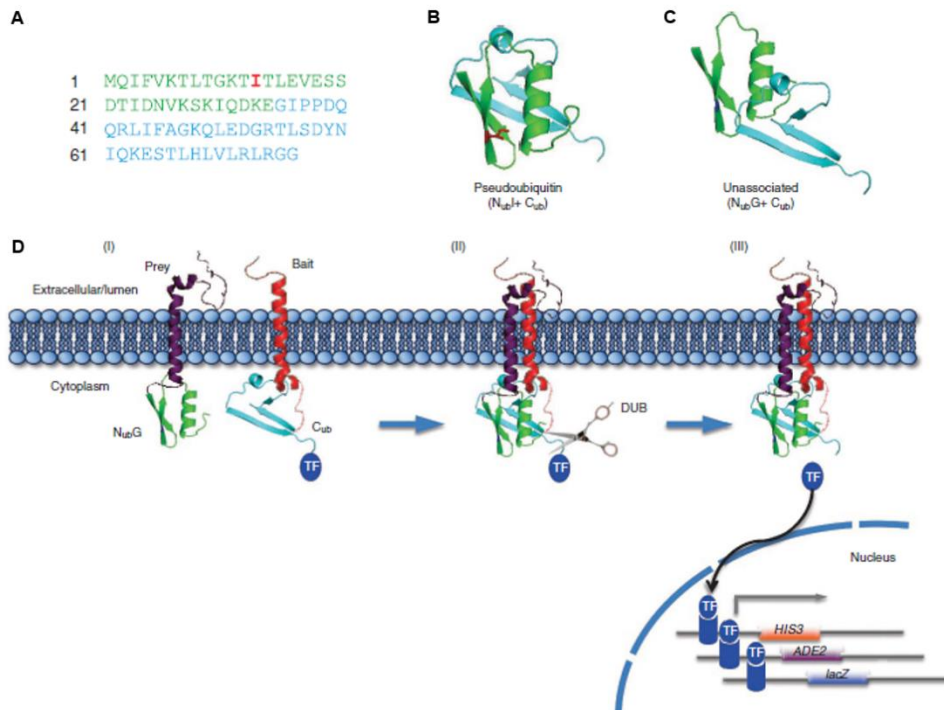


Figura 28. Representació del funcionament de la tècnica MYTH. A) Seqüència de la ubiquitina WT amb les seqüències Nubl i Cub marcades en verd i blau, respectivament. La isoleucina 13 està marcada en vermell. B) Nubl (verd) i Cub (blau) es poden associar espontàniament per formar la molècula de pseudoubiquitina sencera. C) Introducció de la mutació Ile13Gly, produïnt NubG (verd) que no permet la unió a Cub per formar pseudoubiquitina. D) El *prey* en lila està unit a NubG i el *bait* en color vermell està unit a Cub i el factor de transcripció (TF) (I). L'interacció entre el *prey* i el *bait* permet l'associació de NubG i Cub per formar la molècula de pseudoubiquitina, que pot ser reconeguda pels enzims desubiquitinadors citosòlics (DUBs) (II). DUB talla després del C-terminal de Cub i s'allibera el TF. El TF pot entrar al nucli i activar el sistema reporter (Snider et al. 2010).

En concret, pel cas dels CNTs es va unir el Cub al domini N-terminal perquè és l'extrem de la proteïna que està en contacte amb el citoplasma (això és necessari perquè es pugui donar el tall per part dels DUBs) i es van fer servir llibreries de ronyó i de sistema nerviós central (SNC). És una tècnica molt més astringent que el *pull down* ja que només es trobaran les proteïnes que interaccionen directament amb la proteïna d'estudi i no les que estiguin formant part d'un complex amb alguna proteïna que sí que estigui interaccionant. Una vegada s'obtenen les proteïnes candidates, es validen mitjançant el test de dependència que consisteix en provar els gens *preys* positius amb el *bait* estudiat (en aquest cas CNT3) i el *bait* control. Només passen el test els que creixen en el *bait* d'interès i no en el control. En aquest cas, una vegada validades les proteïnes del primer

cribratge, només es van obtenir quatre proteïnes candidates per interaccionar amb CNT3, totes elles en la llibreria de SNC. Aquestes són el factor de transcripció general III complex 5 (GTF3C5), la *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2* (GABARAPL2), la tubulina beta IIA (TUBB2A) i la QDPR.

GABARAPL2 és una proteïna semblant a ubiquitina que està relacionada amb la maduració d'autofagosomes de manera que té un paper important en autofàgia (Weidberg et al. 2010). GTF3C5 és una subunitat de TFIIC, factor de transcripció necessari per a l'acció de la polimerasa III que transcriu diferents tipus de RNAs, entre els que hi ha els tRNAs (Geiduschek and Kassavetis 2001). TFIIC també pot unir-se a llocs ETC (extra-TFIIC) sense la resta del complex de la polimerasa III, d'aquesta manera pot desenvolupar funcions addicionals com marcar l'estat de la cromatin quan la cèl·lula es divideix o canvia el patró d'expressió de gens (Donze 2012). TUBB2A és una isoforma de la tubulina que forma part dels microtúbuls i també presenta funcions reguladores en la forma despolimeritzada, com és el control de la permeabilitat de VDAC respecte els nucleòtids d'adenina (Rostovtseva et al. 2008; Carre et al. 2002). QDPR realitza el pas de qBH₂ a BH₄ per recuperar aquest cofactor important en moltes reaccions com la síntesi de diversos aminoàcids i neurotransmissors (Werner, Blau, and Thony 2011). S'ha descrit que aquesta proteïna està relacionada amb els nivells de folats de la cèl·lula (Zheng et al. 2018; Xu et al. 2014).

Cap d'elles sembla estar relacionada directament amb el metabolisme de nucleòtids com les altres proteïnes d'interacció que s'han estudiat. Tot i així poden estar relacionades amb el transportador. En el cas de tubulina podria tenir un paper en la distribució subcel·lular de CNT3, ja que es pot trobar en compartiments intracel·lulars i per diferents estímuls desplaçar-se a la membrana plasmàtica (Fernandez-Calotti and Pastor-Anglada 2010; Godoy et al. 2014). Alternativament podria tenir un paper regulador de l'activitat del transportador de manera semblant al cas de VDAC. QDPR, a part de la seva funció de recuperació de BH₄, pot regular els nivells de folats de la cèl·lula pel que podria estar implicada en la regulació de la síntesi *de novo* de nucleòtids on es fan servir folats com a donadors de carboni. En la síntesi de purines es fa servir 10-fTHF en les reaccions de GART i ATIC. En la síntesi de pirimidines 5,10-metilen-THF en la reacció la TS per convertir dUMP en dTMP. De manera que la modificació dels nivells de folats podria relacionar la biosíntesi de purines i pirimidines. Per aquesta possible relació amb la síntesi de nucleòtids s'ha aprofundit en l'estudi de la interacció entre CNT3 i QDPR.

1. Estudi de la interacció amb QDPR

BH₄ és un cofactor no proteic, essencial per la funció de les hidroxilases d'aminoàcids aromàtics, pas limitant en el catabolisme de la fenilalanina (Phe), la tirosina (Tyr) i el triptòfan (Trp), amb el que es duu a terme la biosíntesi dels neurotransmissors dopamina i serotonina. A més, serveix com a cofactor de les tres isoformes de la sintasa d'òxid nítric i per l'alquilglicerol mono-oxigenasa (Werner, Blau, and Thony 2011). BH₄ es sintetitza *de novo* a partir de guanosina trifosfat (GTP) per l'acció dels enzims GTP ciclohidrolasa I (GTPCH), 6-piruvoiltetrahydropterina sintasa (PTPS) i sepiapterina reductasa (SR) (**Figura 29**). Una vegada BH₄ s'ha fet servir com a cofactor s'oxida i es genera pterina 4a-carbinolamina que es pot recuperar en dos passos. En el primer es genera quinoid BH₂ (qBH₂) per l'acció de pterina 4a-carbinolamina deshidratasa (PCD). En el segon pas, per acció de QDPR es recupera BH₄ a partir de la reducció de qBH₂ (**Figura 29**). qBH₂ és inestable i es pot convertir de manera espontània a BH₂ que en aquest cas serà reduït a BH₄ per part de la dihidrofolat reductasa (DHFR) (Kaufman et al. 1975).

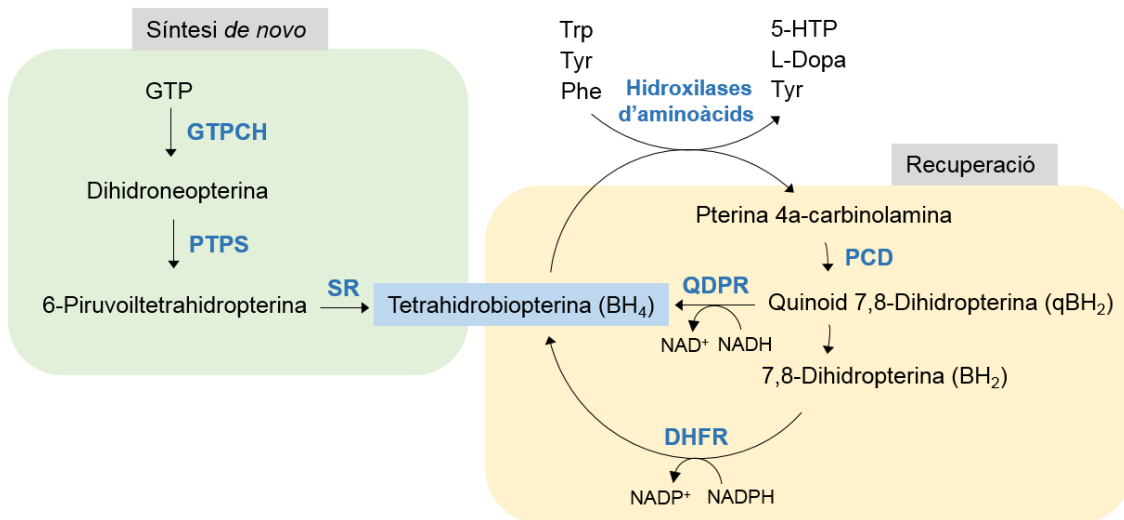


Figura 29. Esquema de les vies de síntesi *de novo* i recuperació de BH₄. En blau es representen els enzims i en negre els substrats i productes de les reaccions. La síntesi *de novo* està marcada amb el fons verd i la recuperació amb el fons groc. GTP: guanosina trifosfat; GTPCH: GTP ciclohidrolasa I; PTPS: 6-piruvoiltetrahydropterina sintasa; SR: sepiapterina reductasa; PCD: 4a-carbinolamina deshidratasa; QDPR: quinoid dihidropterina reductasa; DHFR: dihidrofolat reductasa; Trp: triptòfan; Tyr: tirosina; Phe: fenilalanina; 5-HTP 5-hidroxitriptòfan.

Problemes tant en la generació *de novo* com en la recuperació de BH₄ poden portar a una deficiència de BH₄ que genera situacions patològiques (Thony and Blau 2006), ja que degut a la depleció de BH₄ es dona una deficiència de monoamines que causa

problemes neuropsiquiàtrics (Ichinose, Nomura, and Sumi-Ichinose 2008). En concret, ens centrarem en la deficiència de QDPR que es va descriure per primera vegada el 1975 per Kaufman et al. (Kaufman et al. 1975). La deficiència de QDPR es tracta de la segona causa més freqüent de deficiència de BH₄ i la més severa (Blau 2016). L'efecte patogènic que es dona per deficiència de BH₄ depèn essencialment de la impossibilitat d'hidroxilar aminoàcids aromàtics, que porta a hiperfenilalaninèmia (HPA) i a la impossibilitat de sintetitzar dopamina i serotonina. En un principi es va confondre amb fenilcetonúria (PKU) ja que en aquesta malaltia també hi ha HPA però en aquest cas és deguda a mutacions en la fenilalanina hidroxilasa (PAH), per això al principi la deficiència de BH₄ es va conèixer com a PKU atípica o maligna degut al pitjor pronòstic encara que hi hagi un control de la Phe en la dieta (Smith and Lloyd 1974), tractament que sí funciona en la PKU. Per això, també s'administra el cofactor BH₄ (dihidroclorur de sapropterina; Kuvan®). Així i tot, això no sol ser suficient ja que se'n necessiten grans quantitats per la falta de recuperació del cofactor administrat de manera que també fa falta l'administració de neurotransmissors i àcid fòlic (Ponzzone et al. 2004).

A diferència d'altres deficiències en BH₄, la que es desenvolupa per problemes en QDPR presenta nivells baixos de folats en el sistema nerviós central (SNC) (Werner, Blau, and Thony 2011). Juntament amb aquesta observació també hi altres evidències que proposaven una relació entre QDPR i el metabolisme dels folats (Leeming and Hall 2006; 2010) (Pollock and Kaufman 1978). De la mateixa manera, el ratolí KO *Qdpr* a part de presentar canvis en els nivells de pteridines també presenta modificacions en els nivells de folats (Xu et al. 2014).

Recentment, s'ha descrit la relació entre el metabolisme dels folats i QDPR (Zheng et al. 2018). En mamífers, el metabolisme de folats està compartimentalitzat en citoplasma i mitocondri. En ambdues localitzacions les reaccions que es donen són pràcticament iguals amb l'excepció de la formació de 5-metil tetrahidrofolat (5-MTHF) que és exclusiu del citoplasma (**Figura 30**). Les dues vies es comuniquen i el flux entre els dos compartiments es creu que és unidireccional, de sortida del mitocondri. La via mitocondrial produeix format que s'exporta al citoplasma i les diferents formes de folats que es generen es poden fer servir per la síntesi de purines, dTMP i en reaccions de metilació (Tibbetts and Appling 2010).

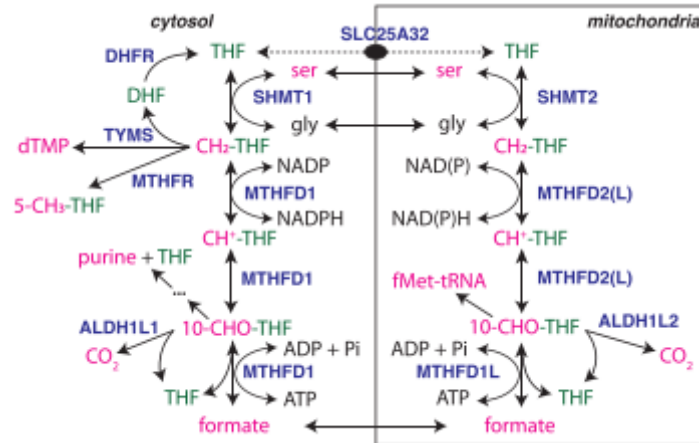


Figura 30. Representació de la biosíntesi de folats citosòlica i mitocondrial. Els noms dels enzims estan indicats en blau. Els enzims mitocondrials presenten la mateixa funció que els citosòlics i la part general del nom només està descrita una vegada ja que és comú pels enzims citosòlics i mitocondrials. DHFR: dihidrofolat reductasa; TYMS: timidilat sintasa (TS); MTHFR: metilentetrahidrofolat reductasa; ALDH1L 10 formil tetrahidrofolat deshidrogenasa; SHMT: serina hidroximetil transferasa; MTHFD metilentetrahidrofolat deshidrogenasa. THF: tetrahidrofolat; DHF: dihidrofolat; CH₂-THF: metilen THF; CH-THF: metenil THF; 10-CHO-THF: 10-formil THF; 5-CH₃-THF: 5-metil THF; ser: serina; gly: glicina. (Zheng et al. 2018)

En el treball de Zheng i col·laboradors s'ha volgut aprofundir en l'estudi de la compartimentalització de la via de síntesi de folats ja que s'ha proposat que la via mitocondrial podria ser una diana per a la teràpia del càncer (Nilsson et al. 2014). Es creu que l'avantatge de que sigui unidireccional es basa en assegurar que el flux net de substrats necessaris per a la biosíntesi es trobin en una situació termodinàmicament favorable. S'ha pogut observar que si la via de síntesi de folats mitocondrial no està activa, es dona una degradació dels folats a nivell citoplasmàtic. Aquest efecte també es dona en el cas del tractament per metotrexat (MTX) però es donen per vies diferents. En el primer cas, THF es degrada per trencament oxidatiu (Zheng et al. 2018). S'ha pogut observar que aquest efecte és revertit per QDPR de manera que aquest enzim, a part de la seva funció de recuperació de BH₄, també permet la reparació de THF tal com s'havia mostrat en estudis enzimàtics (Pollock and Kaufman 1978). En situacions amb una gran acumulació de THF, la capacitat reparadora de QDPR es veu sobrepassada i també es donarà degradació de folats. En el segon cas, l'acció de MTX sobre la degradació de folats es dona per l'acumulació de DHF (Zheng et al. 2018) que també pot patir trencament oxidatiu. En resum, l'estratificació del metabolisme dels folats en els compartiment citosòlic i mitocondrial permet la reparació del dany produït per estrès oxidatiu als metabòlits de la via mentre en manté els *pools* cel·lulars.

La síntesi *de novo* de nucleòtids es caracteritza dins la xarxa metabòlica de la cèl·lula perquè necessita substrats i energia de moltes fonts per poder dur-se a terme (**Figura 31**). Integra elements del metabolisme de la glucosa, aminoàcids i elements del metabolisme dels folats (Vander Heiden and DeBerardinis 2017; Zhu and Thompson 2019).

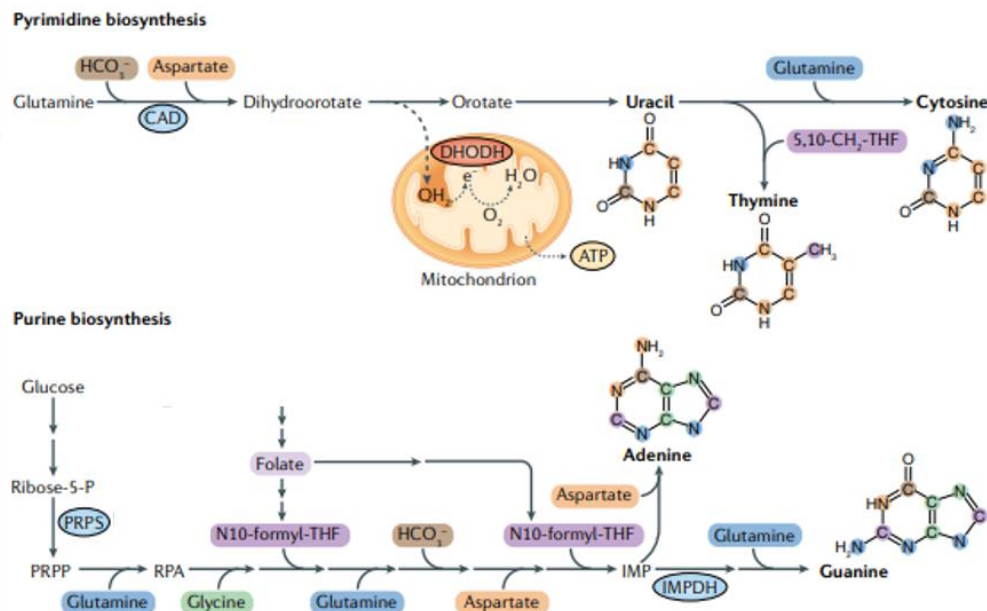


Figura 31. Substrats necessaris per a la biosíntesi *de novo* de purines i pirimidines. La síntesi de nucleòtids integra diverses vies metabòliques. Utilitza diversos substrats com a fonts de carboni i nitrogen com són els aminoàcids i metabòlits del cicle de folats (el color de cada carboni i nitrogen en l'estructura química determina de quin substrat prové). Adaptat de (Zhu and Thompson 2019).

Un element comú tant en la síntesi *de novo* de purines com de pirimidines i que també és necessari en la recuperació de nucleobases és el fosforribosil pirofosfat (PRPP). Es genera generalment en la fase oxidativa de la via de les pentoses fosfat. L'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) desvia la glucosa cap a la producció de ribosa-5-fosfat generant poder reductor en forma de NADPH. Després aquesta és activada per PRPS donant així PRPP. Per a la generació de nucleòtids és necessari el subministrament de carboni i nitrogen que prové de diversos aminoàcids i intermediaris metabòlics. Una via important com a font de carboni és el metabolisme dels folats. En la síntesi de purines GART i ATIC utilitzen 10-formil tetrahidrofolat i en la síntesi de pirimidines la TS utilitza 5,10-metilentetrahidrofolat com a donador de grups metil. Els aminoàcids necessaris en diferents punts de les vies són glutamina, aspartat i glicina. La serina, en canvi, és necessària per al funcionament del metabolisme dels folats i es farà servir de manera indirecta. També són importants els nivells d'entrada de glutamina.

Per la integració de totes aquestes vies, es pot veure que la regulació dels nivells de nucleòtids de la cèl·lula depèn de molts factors, com és la disponibilitat de cada un dels substrats necessaris. La interconnexió entre el metabolisme de nucleòtids i el cicle dels folats té rellevància en algunes malalties (Nikkanen et al. 2016). D'aquesta manera, per la implicació que pot tenir QDPR en la regulació dels nivells de folats pot ser interessant l'estudi de la interacció amb CNT3. Això permetria relacionar la biosíntesi de nucleòtids amb la recuperació de nucleòsids que també podrien estar regulades entre elles per mantenir els nivells globals de nucleòtids de la cèl·lula.

Com ja s'ha explicat en altres apartats, l'expressió dels CNTs és dependent de la diferenciació de les cèl·lules i per això es perd l'expressió en les línies cel·lulars. Per a l'estudi d'aquesta interacció es van fer servir la línia cel·lular HEK293 a la que es van transfectar tant els CNTs com QDPR, tot i que es poden detectar nivells endògens baixos de QDPR. A més, es van fer servir les línies cel·lulars que s'havien generat al grup i presenten sobreexpressió constitutiva de cada un dels CNTs per separat. A més, es va fer servir la línia cel·lular derivada d'hepatoma humà HepG2 que conté la maquinària necessària per al reciclatge de BH₄, com és QDPR (Rakovich et al. 2011).

Per començar, es va dur a terme la immunoprecipitació de myc-QDPR i es va observar la coimmunoprecipitació de CNT3-HA, mentre que al control no es va veure banda als 75 kDa de manera que la interacció sembla específica (**Figura 32**). Seguint el mateix procediment, també es va observar la coimmunoprecipitació en la línia cel·lular HepG2 (**Figura 33A**).

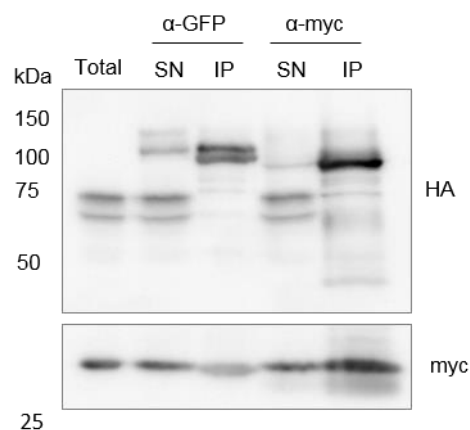


Figura 32. Interacció de CNT3 i QDPR en HEK293. Es va transfectar CNT3-HA i myc-QDPR durant 48 h en cèl·lules HEK293. L'extracte de proteïna d'aquestes cèl·lules es va incubar amb l'anticòs α-myc per immunoprecipitar QDPR. Com a control es va fer servir α-GFP que no està relacionat amb les proteïnes de l'extracte i està generat en la mateixa espècie que l'α-myc. Per detectar CNT3 es va revelar amb l'anticòs α-HA.

En ambdós casos es va poder observar una banda un poc inferior als 50 kDa que també co-immunoprecipitava amb myc-QDPR. Per estudiar si aquesta banda podia correspondre a CNT3 o era una banda inespecífica es va estudiar el patró de bandes que es donava en la línia cel·lular HepG2 per la transfecció de CNT3. De manera endògena es podia observar una banda per davall dels 50 kDa i un altra més suau als 50 kDa (**Figura 33B**). Per la transfecció de CNT3 també es detectaven aquestes dues bandes però la més expressada era la de 50 kDa (**Figura 33B**). En aquest cas, també s'expressava la banda de 75 kDa que és la que esperàvem per la mida de CNT3 (**Figura 33B**). Amb aquestes observacions no es pot descartar que existeixi una forma més curta de CNT3 que també podria estar interaccionant amb QDPR.

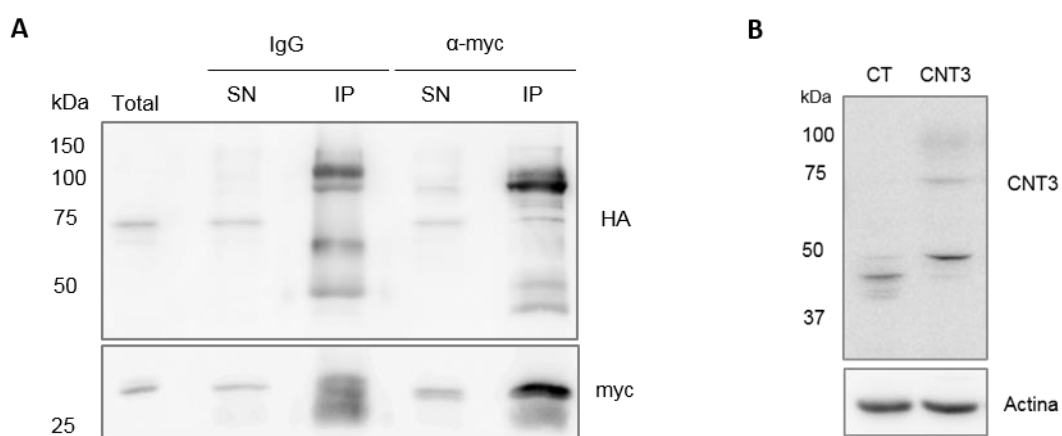


Figura 33. Coimmunoprecipitació de CNT3 i QDPR en HepG2. A) Es va transfectar CNT3-HA i myc-QDPR durant 48 h en cèl·lules HepG2. L'extracte de proteïna d'aquestes cèl·lules es va incubar amb l'anticòs α-myc per immunoprecipitar QDPR. Com a control es va fer servir IgG. Per detectar CNT3 es va revelar amb l'anticòs α-HA. B) Patró de bandes de CNT3 endògen i transfectat en HepG2. Es va revelar amb l'anticòs α-CNT3 HPA024729.

L'anticòs de CNT3 emprat (HPA024729) reconeix la zona C-terminal de la proteïna, el tag HA també està incorporat en aquesta zona de manera que les formes més curtes de CNT3 que es van detectar per la transfecció de CNT3 o CNT3-HA es podrien donar per la falta d'algun tros en la zona N-terminal. En la transfecció, al introduir cDNA es descarten les possibles modificacions a l'mRNA de manera que perquè hi hagi una banda de menor pes molecular s'ha d'haver donat modificacions posttraduccionalment com la proteòlisi de la proteïna en la zona N-terminal, o es podrien donar modificacions en la maduració de la proteïna i podria ser que la proteïna no es pugui glicosilar bé, com s'ha demostrat per CNT1 (Perez-Torras et al. 2019). Curiosament, les cèl·lules HepG2 transfectades amb CNT3 pràcticament no presenten activitat del transportador, la qual cosa reforçaria la hipòtesi de que sigui una forma no glicosilada del transportador.

Addicionalment, en la línia cel·lular HepG2, on també es veu l'expressió d'una banda de CNT3 de pes molecular inferior de manera endògena, podríem pensar que s'expressa alguna variant d'mRNA. De fet, en el grup es va identificar la forma CNT3ins que es tracta d'una variant d'*splicing* que queda retinguda al reticle endoplasmàtic (Errasti-Murugarren et al. 2009). A més, amb l'epítip que reconeix l'anticòs es va fer un blast per estudiar quines altres isoformes de CNT3 es podrien estar detectant. La isoforma descrita de CNT3 (NP_001186562.1) es detecta i presenta 691 aminoàcids que correspon a la de pes molecular de 77 kDa. A part d'aquesta, amb l'anticòs que es va fer servir es podrien detectar tres isoformes més (**Taula 3**) que corresponen a prediccions generades amb el mètode gnomon (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/gnomon/). La banda de pes molecular proper a 50 kDa que es detectava tant a les co-immunoprecipitacions com en el WB de HepG2 de manera endògena podria correspondre a la isoforma SLC28A3 X3. Es va seguir treballant amb la hipòtesi de la interacció amb la isoforma més ben caracteritzada, tot i que no es pot descartar l'opció que QDPR també pugui estar interaccionant amb alguna altra isoforma de la proteïna, pel que s'hauria d'estudiar si aquesta isoforma predita realment existeix o si hi ha algun processament posttraduccional de CNT3 que no afecta a la interacció amb QDPR. Si es tracta d'una isoforma més curta ens duria a pensar que QDPR podria estar interaccionant en una zona diferent a la N-terminal, a diferència de les altres proteïnes estudiades en aquest treball. Aquest és l'avantatge d'haver fet servir MYTH com a mètode per identificar proteïnes candidates.

Isoforma	Identificador	Núm. d'aminoàcids	Pes predit (kDa)
SLC28A3	NP_001186562.1	691	77
SLC28A3 X1	XP_011517207.1	719	80
SLC28A3 X2	XP_011517209.1	608	68
SLC28A3 X3	XP_011517210.1	478	53

Taula 3. Isoformes de CNT3 que poden ser detectades per l'anticòs de Sigma HPA024729. SLC28A3 X1, X2 i X3 són isoformes predites mitjançant el mètode gnomon (NCBI).

En la línia cel·lular HEK-CNT3 es va estudiar la colocalització de CNT3 i QDPR. Com que l'expressió de QDPR és baixa en HEK293 es va optar per transfectar les cèl·lules amb myc-QDPR. La detecció es va fer amb l'anticòs de CNT3 i de myc. Es va poder observar colocalització intracel·lular en forma puntejada (**Figura 34**), el que va dur a pensar que la interacció es podia estar donant en algun orgànul intracel·lular.

En primer lloc, es va pensar en la possibilitat de que la interacció s'estàs donant a mitocondri o proper a aquest orgànul ja que està implicat en metabolisme de folats i biosíntesi *de novo* de pirimidines i, a més, colocalitza amb el purinosoma (French et al. 2016). La localització de CNT3 a aquest orgànul no està descrita però tampoc es podria descartar ja que en la membrana de mitocondri s'hi pot trobar ENT1 (Lai, Tse, and Unadkat 2004) i es coneix que hi ha entrada de nucleòsids i nucleòtids al mitocondri.

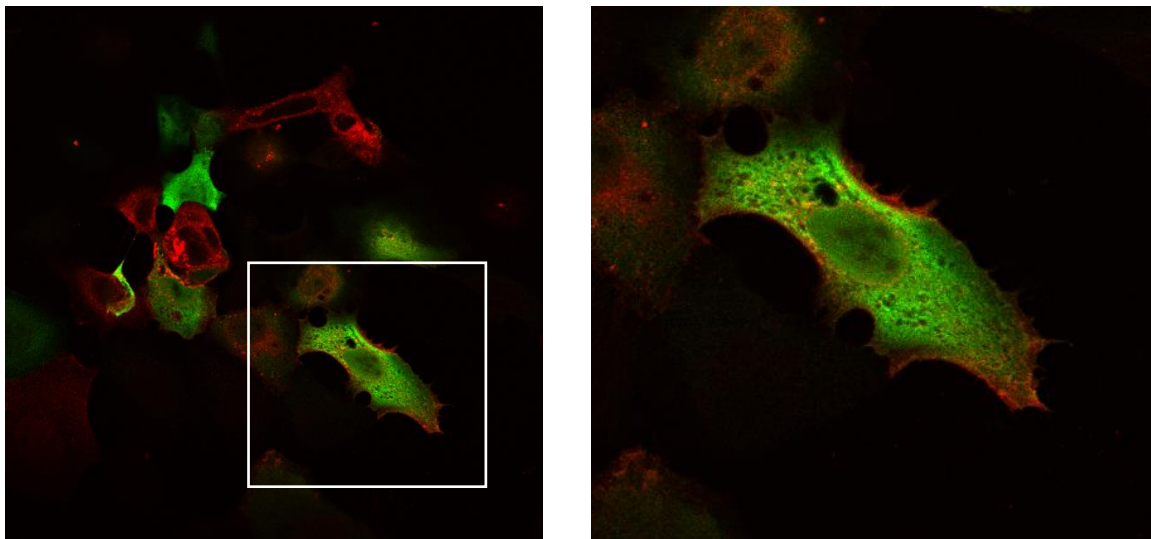


Figura 34. Colocalització de CNT3 i QDPR. Es va transfectar myc-QDPR en la línia cel·lular HEK-CNT3. Es van fer servir l'anticòs α -myc per marcar QDPR i α -CNT3 (HPA024729). QDPR es va marcar el secundari Alexa 488 (verd) i CNT3 amb Alexa 647 (vermell). Es van realitzar les imatges en el microscopi confocal Leica SP2 63x zoom 2x. A la dreta es veu amplificada la regió del quadre blanc de l'esquerra.

Per aprofundir en aquest aspecte es va fer servir el marcador de mitocondri Tom20 per estudiar la possible localització de CNT3 en aquest orgànul. En aquest cas es va fer servir la línia cel·lular HEK293 i es va transfectar CNT3-HA ja que l'anticòs de CNT3 i de Tom20 no eren compatibles degut a que els dos han estat generats en conill. A més, en una de les condicions es va cotransfectar amb QDPR per comprovar si la localització de CNT3 podria variar depenent de la presència o no de QDPR. Amb aquest disseny experimental es va poder observar que en cap dels dos casos (\pm QDPR) no es donava colocalització entre CNT3 i Tom20 (**Figura 35**) de manera que la interacció de CNT3 i QDPR no sembla que s'estigui donant a mitocondri. Una altra possibilitat seria que la interacció es doni al lisosoma. Aquest orgànul s'encarrega de degradar elements que la cèl·lula no necessita, tant de la mateixa cèl·lula com de l'exterior. Entre ells es degraden nucleòtids com els que provenen de l'mRNA. Una vegada degradats els productes han de sortir del lisosoma i aquí hi podrien tenir un paper els transportadors de nucleòsids. De fet, ENT3, que s'expressa en aquest orgànul, s'ha vist que en ratolí pot funcionar com un sensor d'adenosina (Nair et al. 2019) i no podem descartar que CNT3 es pugui

trobar en aquest orgànul a part de a la membrana plasmàtica. Es podrien marcar específicament els lisosomes per comprovar-ho i també estudiar la possible interacció de CNT3 i QDPR en aquesta localització.

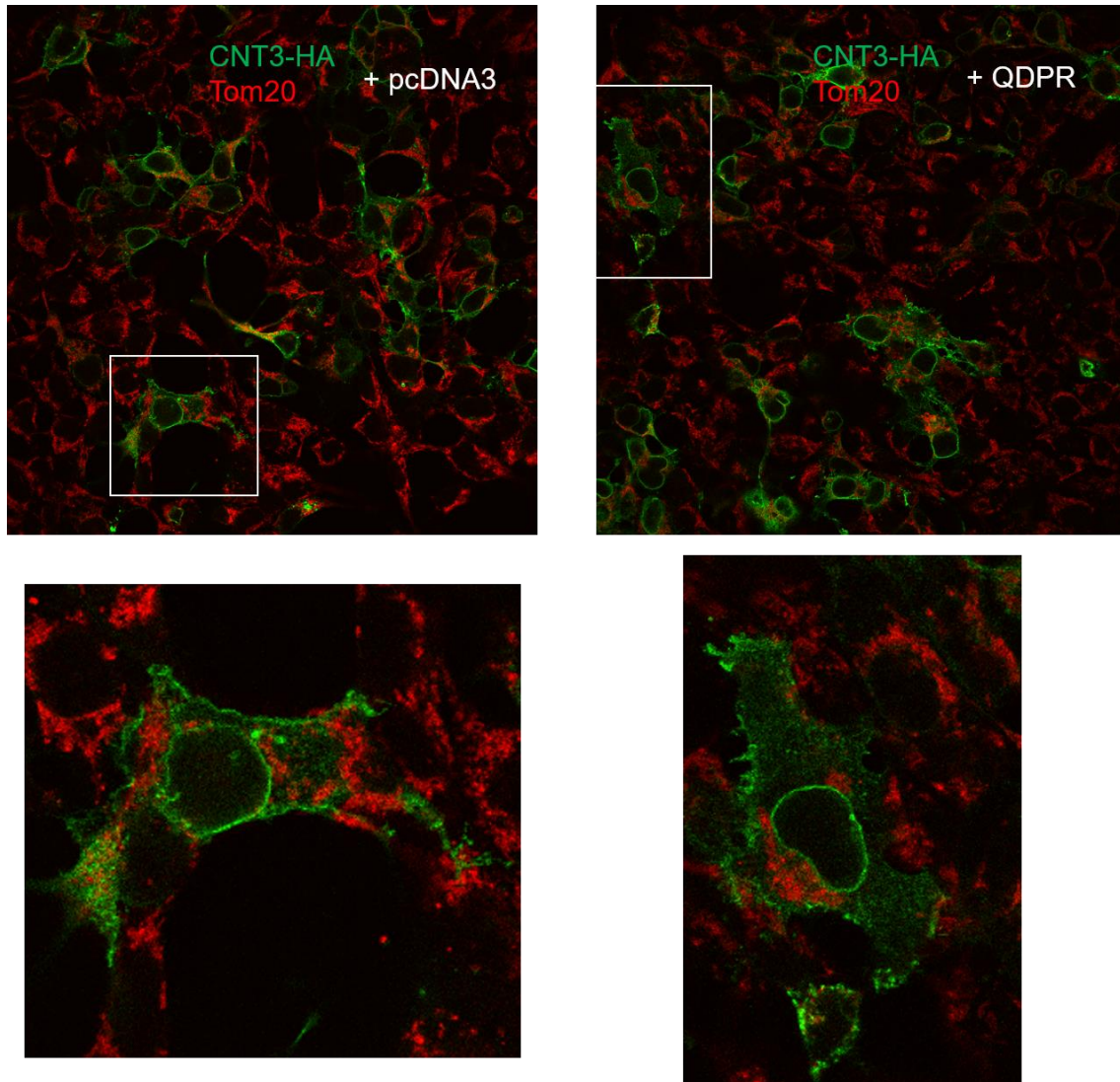


Figura 35. Colocalització de CNT3 i el marcador mitocondrial Tom20 en presència o absència de QDPR. Es va transfectar CNT3-HA en combinació amb pcDNA3.1 com a control o QDPR en la línia cel·lular HEK293. Es va marcar CNT3 amb l'anticòs α -HA i es va fer servir l' α -Tom20 per marcar mitocondri. Com a anticossos secundaris es va fer servir Alexa 488 (verd) per HA i Alexa 647 (vermell) per Tom20. Es van obtenir les imatges amb el microscopi confocal Leica SP2 63x. Les imatges inferiors corresponen a l'amplificació de les regions marcades amb un quadre blanc de les imatges superiors.

La colocalització s'havia estudiat amb la sobreexpressió de CNT3 i QDPR però això pot dur a la localització aberrant de les proteïnes i, per això, és interessant poder detectar la interacció d'una manera més fisiològica, amb l'expressió endògena de la proteïna. Per seleccionar la línia cel·lular més adient per aquest propòsit, es van analitzar els nivells de proteïna i es va observar que les línies cel·lulars HepG2 i Huh7 expressaven nivells

més elevats de QDPR que la línia cel·lular HEK293 (**Figura 36A**). Es va seleccionar la línia cel·lular HepG2, on s'havia estudiat la interacció per co-IP, i es va estudiar l'expressió de QDPR per immunofluorescència. Es va observar un marcatge puntejat (**Figura 36**) i no uniforme al citoplasma (com s'havia vist en les cèl·lules transfectades) tot i que sí que podríem pensar que el marcatge on es veia colocalització fos específic ja que també presentava un patró puntejat (**Figura 34**).

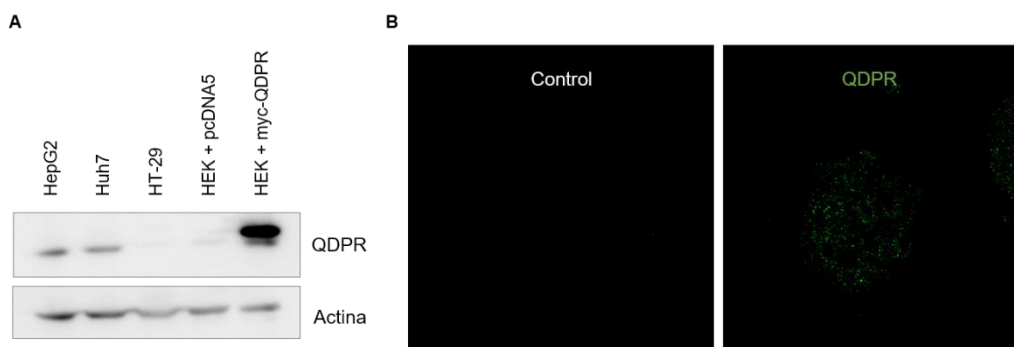


Figura 36. Anàlisi de l'expressió endògena de QDPR. A) Es van analitzar els nivells endògens de la proteïna QDPR en les línies cel·lulars HepG2, Huh7, HT-29 i HEK293. Així com la sobreexpressió de QDPR en HEK293. B) Es va marcar QDPR endògen en la línia cel·lular HepG2 amb l'anticòs sc-37218 i el secundari Alexa 488 (verd). El control són cèl·lules que van seguir el mateix procediment però sense incubar l'anticòs primari, només es van incubar amb l'anticòs secundari. Es van obtenir les imatges amb el microscopi confocal Leica SP2 63x.

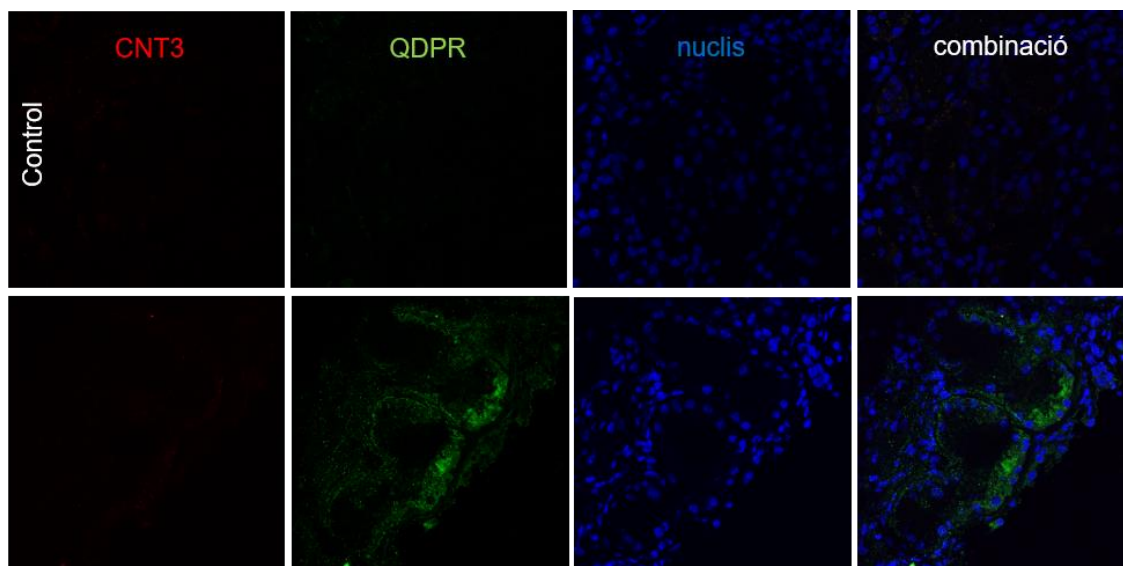


Figura 37. Colocalització de CNT3 i QDPR en talls de ronyó humà. Talls (5 µm) de ronyó humà conservats amb OCT es va marcar amb els anticossos HPA024729 per CNT3 i sc-37218 per QDPR. Com a secundaris es van utilitzar Alexa 647 (vermell) per CNT3 i Alexa 488 (verd) per QDPR. Els nuclis (blau) es van marcar amb Hoechst. Com a control es va fer servir el mateix procediment de marcatge però només amb anticòs secundari, sense primari. Es van obtenir les imatges amb el microscopi confocal Leica SP2 63x.

Per valorar el seu rol fisiològic, es va anar més enllà i es va estudiar la colocalització en teixit de ronyó humà ja que en aquest teixit s'havia observat l'expressió d'mRNA de rCNT3 en rata (Rodríguez-Mulero et al. 2005) i QDPR també està descrit en aquest teixit. En el teixit de ronyó es va poder detectar l'expressió de QDPR (**Figura 37**), que presentava un patró puntejat com en la línia cel·lular HepG2. Però, en canvi, no va ser possible la detecció de CNT3 en les mostres estudiades. Així que no es va poder estudiar la colocalització en aquest teixit.

La morfologia del teixit semblen ser túbuls, on es podria esperar la localització del transportador. Tot i així s'ha de tenir en compte que l'expressió depèn de la zona del túbul i CNT3 es localitzaria en la zona més distal (Rodríguez-Mulero et al. 2005) pel que si la biòpsia s'havia obtingut de la zona cortical podria no detectar-se CNT3. S'haurien d'estudiar més talls per intentar estudiar altres zones del túbul i detectar CNT3 tot i que també podria ser que encara que s'hagin detectat nivells de mRNA en túbuls de rata no se'n trobi expressió detectable de proteïna.

1.1. Regulació de l'expressió entre QDPR i CNT3

Ens vam plantejar si l'expressió de QDPR tenia algun efecte sobre CNT3. Com a primera aproximació es va estudiar l'efecte de la sobreexpressió de QDPR sobre els nivells d'mRNA de CNT3 i a la vegada, ens va semblar interessant afegir l'estudi de l'expressió dels altres CNTs per determinar si els canvis sobre CNT3 eren específics d'aquest transportador. Per estudiar si els efectes observats estaven relacionats amb la disponibilitat de nucleòsids en el medi extracel·lular, les cèl·lules, una vegada transfectades, es van mantenir en medi amb FBS normal o amb FBS dialitzat (dFBS) on s'havien extret les molècules menors de 3.5 kDa, entre les que es troben els nucleòsids.

Per la sobreexpressió de QDPR en HEK293 es van observar canvis específics per cada un dels CNTs. CNT3 va augmentar i CNT1 va disminuir de manera significativa mentre que CNT2 no va presentar canvis (**Figura 38**). En el sèrum dialitzat la disminució de CNT1 no es va mantenir però sí que es va seguir observant l'augment de CNT3. En vista de que la regulació dels nivells dels transportadors per un augment de QDPR era diferent per cada subtipus, es va estudiar l'efecte de la sobreexpressió de cada un dels CNTs sobre QDPR i els altres transportadors. Amb la sobreexpressió de CNT3 no es van observar canvis significatius en l'expressió de CNT1, CNT2 ni QDPR (**Figura 38**). En canvi, en el medi amb dFBS es va poder observar l'augment significatiu dels nivells d'mRNA de CNT1. Curiosament, amb la sobreexpressió de CNT1 es va observar un augment significatiu dels nivells de QDPR (**Figura 38**) i seguia la mateixa tendència en el dFBS, mentre que els altres transportadors no van presentar canvis. Finalment, amb

la sobreexpressió de CNT2 es va observar un gran augment de CNT1 en FBS normal que encara era major en el dFBS, tot i que aquests canvis no arribaven a ser significatius per la diferència de magnitud del resultats entre experiments.

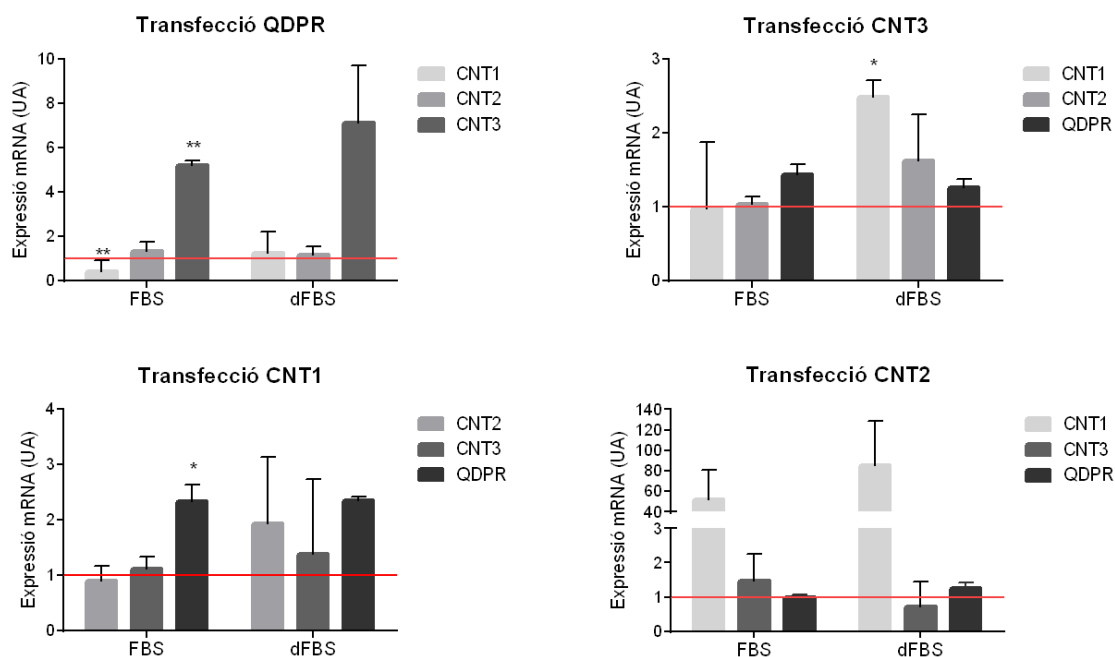


Figura 38. Regulació transcripcional entre QDPR i els CNTs. Es van transfectar HEK293 amb QDPR, CNT3, CNT1 o CNT2 durant 48 h. Per RT-PCR es va analitzar l'expressió de mRNA de CNT1, CNT2, CNT3 i QDPR. Els resultats s'expressen en unitats arbitràries (UA) i estan referits al control transfectat amb pcDNA3.1 que té el valor d'1 (barra vermella). Els resultats representen la mitjana ± SEM de 3-4 experiments independents. Es va realitzar el test t-Student de dades aparellades * <math>< 0.05</math> ** <math>< 0.01</math>.

Resulta interessant que per l'augment dels nivells de QDPR es doni un comportament diferent per part de CNT1 i CNT3 ja que els dos són capaços de transportar pirimidines, amb la diferència de que CNT3 també pot translocar purines. A més, QDPR augmenta per l'increment de CNT1 que podria haver generat un augment de pirimidines intracel·lular. En conjunt, aquestes dades ens porten a pensar que QDPR podria estar relacionat amb els nivells disponibles de pirimidines. Per aprofundir en aquest aspecte es podrien fer servir inhibidors de la via de síntesi *de novo* de pirimidines, com PALA (N-(fosfonacetil)-L-aspartat) per inhibir CAD o brequinar per DHODH, i estudiar els efectes sobre aquesta proteïna i els transportadors.

Una altra observació interessant és que l'expressió del transportador que més varia entre el medi normal i el medi amb sèrum dialitzat és CNT1 (Figura 38), el que podria indicar que la regulació de la seva expressió podria dependre dels nivells de nucleòsids presents en el medi extracel·lular o d'algun altre factor de pes molecular inferior a 3.5 kDa.

Per estudiar en més profunditat els canvis de QDPR deguts a l'expressió dels transportadors es van analitzar els nivells d'mRNA de QDPR en un model que expressa establement cada CNT i podria presentar adaptacions en els nivells de QDPR. Es va observar que a l'estable que sobreexpressa CNT1, QDPR presentava una tendència a augmentar (**Figura 39**), en HEK-CNT2 es mantenia estable i per la sobreexpressió de CNT3 presentava una tendència a disminuir. Això reforçaria la idea de que els nivells de QDPR podrien estar relacionats amb els nivells de pirimidines. Per altra banda, es va estudiar l'efecte de la transfecció transitòria dels transportadors en la línia cel·lular HepG2 que com s'havia vist presentava nivells basals més elevats de QDPR que no la línia cel·lular HEK293. En aquest cas, no es van observar canvis en els nivells de QDPR per la sobreexpressió dels transportadors (**Figura 39**).

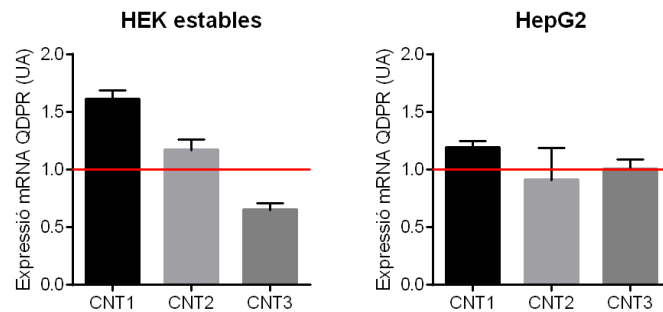


Figura 39. Canvis en els nivells d'expressió de QDPR per la sobreexpressió dels CNTs. Es van analitzar per RT-PCR els nivells de QDPR en les línies HEK estables (HEK-CNT1, HEK-CNT2 i HEK-CNT3) i en la línia cel·lular HepG2, que presenta nivells més elevats de QDPR, transfectada durant 48 h amb CNT1, CNT2 i CNT3. Els resultats s'expressen en unitats arbitràries (UA) i estan referits a la línia control (HEK-pcDNA5) per HEK estables i HepG2 transfectades amb pcDNA3.1 per HepG2, el control té el valor d'1 (barra vermella) $n=1$, es representa la mitjana \pm SEM dues rèpliques.

Paral·lelament als nivells d'mRNA també es van estudiar els canvis en el nivell de la proteïna QDPR en les línies HEK293 i HepG2 transfectades amb els diferents CNTs. En cap dels dos casos no es van observar canvis clars en els nivells de QDPR a les 48 h de transfecció dels transportadors (**Figura 40**). A aquest temps s'havien observat els canvis a nivell d'mRNA i podria ser que s'hagi d'esperar un temps més llarg perquè s'arribin a donar canvis a nivell de proteïna. Per això, es va analitzar l'expressió de QDPR a les 72 h de transfecció. Tampoc es van observar canvis clars en els nivells d'expressió de QDPR en aquest cas (**Figura 40**).

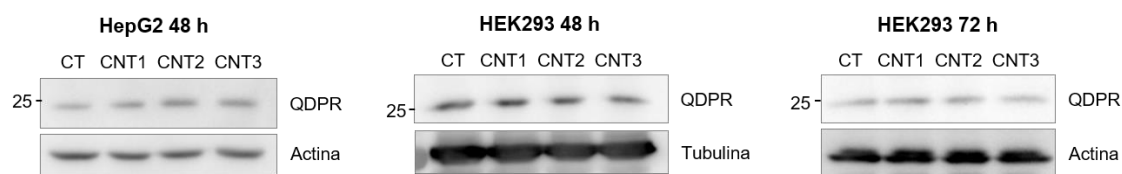


Figura 40. Anàlisi de l'expressió de la proteïna QDPR amb la restitució dels CNTs. Les línies cel·lulars HepG2 i HEK293 es van transfectar amb pcDNA3.1 (CT), CNT1, CNT2 o CNT3 durant 48 h (HepG2 i HEK293) o 72 h (HEK293). Es van analitzar els nivells de QDPR per WB.

Seguidament, també es va comprovar l'efecte de la sobreexpressió de QDPR en els nivells de proteïna de CNT3 ja que a nivell d'mRNA s'havia pogut observar un augment significatiu (**Figura 38**). Es van estudiar els nivells de CNT3 72 h post-transfecció de QDPR. Per tenir disponibles les regions reguladores de CNT3 es van estudiar els nivells endògens de CNT3 que són pràcticament indetectables a nivell de proteïna en la línia cel·lular HEK293. Per això, es van carregar 100 µg de proteïna per cada condició i en el revelat es van realitzar exposicions llargues. Es va poder observar un augment de CNT3 per l'acció de QDPR (**Figura 41**). De manera que a part d'estar interaccionant, QDPR podria regular els nivells de CNT3. Del patró de bandes que s'observa en l'expressió de CNT3 la que més canvia és la d'un pes proper a 50 kDa (**Figura 41**) el que reforça la idea de que hi podria haver una variant de CNT3 d'aquest pes molecular i que, a més, podria estar regulada per QDPR. Com s'ha discutit anteriorment aquesta variant de CNT3 podria ser deguda a la falta de glicosilació del transportador, com s'havia observat per CNT1, es podria donar per la proteòlisi parcial de la proteïna o fins i tot, en aquest cas que estudiem l'expressió endògena, podria ser una isoforma diferent de CNT3.

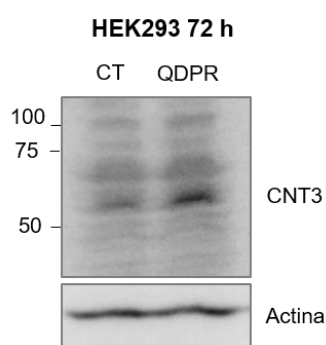


Figura 41. Augment dels nivells de proteïna de CNT3 per la sobreexpressió de QDPR. Es va transfectar QDPR en cèl·lules HEK293 durant 72 h. Es van analitzar els nivells endògens de CNT3 fent servir 100 µg de proteïna i exposicions llargues en el revelat.

Aquest canvi és interessant i ens vam plantejar per quin mecanisme QDPR podria estar regulant els nivells de CNT3. En el grup, la Dra. Estefanía Muñoz havia treballat amb la

regulació transcripcional de CNT3 per part d'aldosterona en la línia cel·lular de ronyó HK-2. En resultats no publicats del grup va poder demostrar que el promotor de CNT3 que es troba a 30 kb de 5' del primer exó, presentava un lloc d'unió d'NFkB i s'havia descrit que l'aldosterona indueix l'activació d'NFkB en cèl·lules dels túbuls de ronyó (Queisser et al. 2011). NFkB està implicada en la regulació de diversitat de processos com inflamació, immunitat, resposta a estrès, diferenciació, desenvolupament, proliferació cel·lular i apoptosi. NFkB està compost per homo- o heterodímers de proteïnes de la família NFkB/Rel (**Figura 42**), sent l'heterodímer més comú p50/p65 (Oeckinghaus and Ghosh 2009). Les κ B són una família de proteïnes que interaccionen amb NFkB i inhibeixen la seva activitat retenint-lo al citoplasma. La degradació d' κ B permet l'activació d'NFkB i la translocació de les proteïnes al nucli on poden unir al promotor dels gens que regulen i així dur a terme la seva acció.

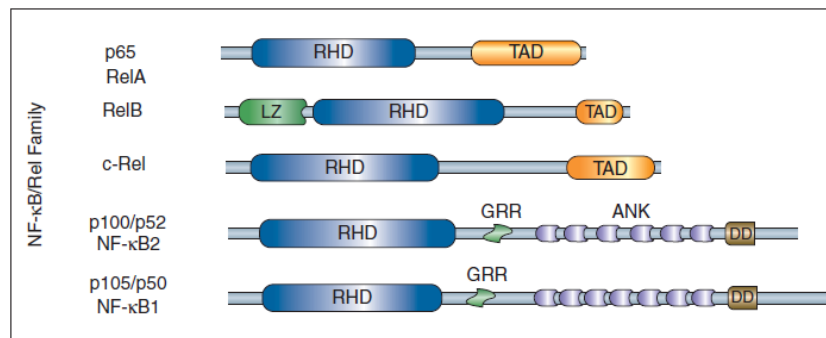


Figura 42. Membres de la família NFkB. El domini RHD és característic de les proteïnes NFkB. Els precursors p100 i p105 també poden tenir funcions inhibidores ja que contenen el domini ANK característic de les proteïnes inhibidores d'NFkB (κ B). RHD: domini d'homologia Rel; TAD: domini de transactivació; LZ: cremallera de leucina; GRR regió rica en glicina; ANK: repeticions ankyrin; DD: domini de mort (Oeckinghaus and Ghosh 2009).

La Dra. Estefanía Muñoz va realitzar assajos d'immunoprecipitació de cromatina (ChiP) on es va veure que les subunitats d'NFkB que interaccionaven amb el promotor de CNT3 eren p50 i RelB. D'aquestes, RelB és la que presenta el domini de transactivació. A més, per assajos d'expressió amb luciferasa es va determinar que NFkB podia regular l'expressió de CNT3. Aquests resultats previs ens van fer pensar en la possibilitat de que QDPR està modificant els nivells d'NFkB i que d'aquesta manera s'està regulant l'expressió de CNT3. Per això, en les mateixes mostres que s'havia observat l'augment dels nivells de proteïna de CNT3 per l'acció de la sobreexpressió de QDPR es va analitzar si canviava l'expressió d'alguna subunitat d'NFkB. No es van observar canvis clars en l'expressió proteica d'aquestes (**Figura 43A**).

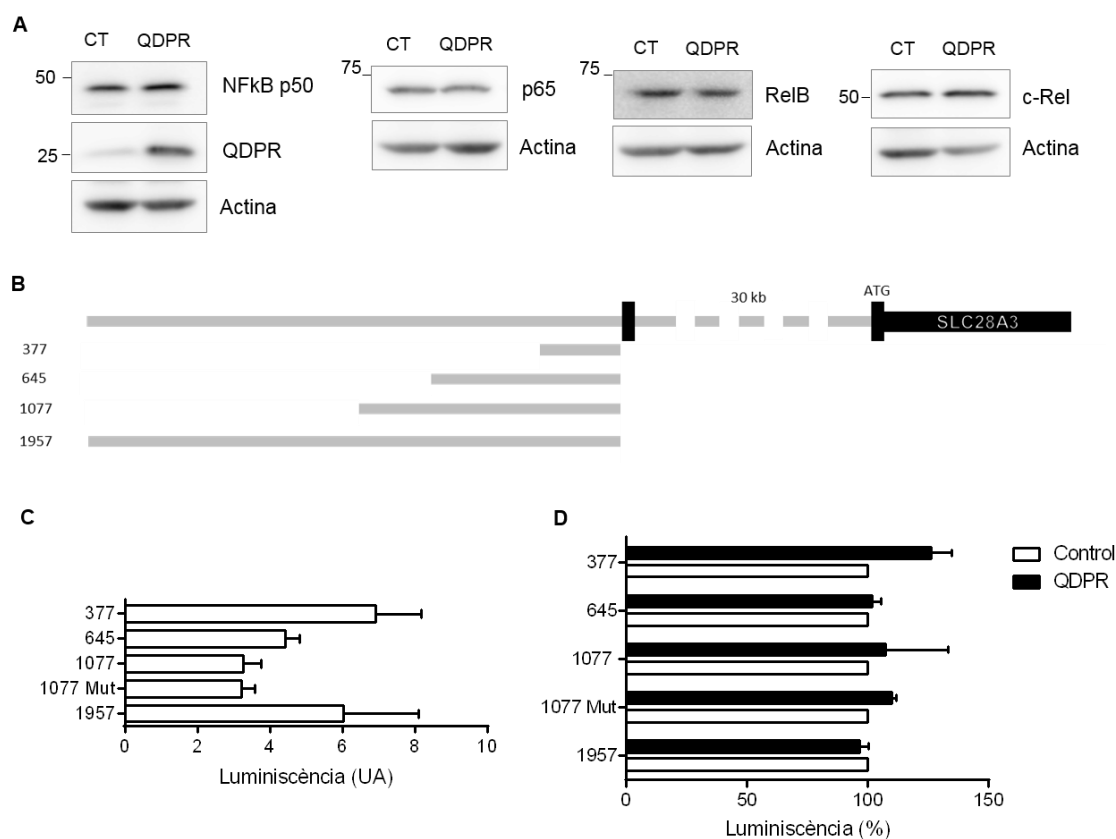


Figura 43. Efecte de QDPR sobre el promotor de CNT3. A) Es van analitzar l'efecte de la transfecció de QDPR durant 72 h sobre els nivells de proteïna diferents membres de la família NFkB/RelB. B) Representació gràfica de les regions del promotor de CNT3 estudiades. Es va estudiar una regió d'unes 2 kb que es troba a 30 kb de l'inici de transcripció de CNT3. C, D) Es van transfectar cèl·lules HEK293 amb regions del promotor de CNT3 de 377, 645, 1077 i 1957 pb i la regió de 1077 amb la zona d'unió d'NFkB mutada (1077 mut) en combinació amb pcDNA3.1 com a control o QDPR. (C) Activitat luciferasa de diferents fragments del promotor relativitzada amb renilla de la mateixa condició i respecte al promotor basic (valor 1). L'activitat s'expressa en unitats arbitràries (UA). Es representa la mitjana de 2 experiments (C) Efecte de QDPR sobre l'activitat luciferasa de cada una de les regions del promotor. El control de cada regió es considera el 100%. Es representa la mitjana de 2 experiments.

Es van aprofitar les construccions generades per la Dra. Estefanía Muñoz per analitzar l'activitat luciferasa de diferents regions del promotor de CNT3 per l'acció de QDPR. Són regions de 377, 645, 1077 i 1957 pb que es troben a 30 kb de l'inici de transcripció d'*SLC28A3* (CNT3) (**Figura 43B**). També es va fer servir la regió de 1077 pb amb NFkB mutat ja que podria ser que tingués un efecte en el canvi d'activitat del promotor encara que no s'hagués vist un canvi en el nivell de proteïna. L'activitat del promotor variava depenent de la regió que s'havia fet servir, les regions que van presentar més activitat van ser les de 377 i 1957 pb (**Figura 43C**) tot i que totes les regions presentaven activitat. La menor activitat es va detectar en la regió de 1077 i de manera basal no es va observar diferència entre la regió 1077 i 1077 amb NFkB mutat (**Figura 43C**). Aquest resultats

difereixen amb els resultats previs del grup però s'ha de tenir en compte que el context en que s'ha estudiat l'activitat és diferent. Els experiments anteriors s'havien realitzat en la línia cel·lular de ronyó HK-2. Línies cel·lulars diferents poden presentar diversa expressió d'elements reguladors de manera que en HEK293 podria ser que l'acció d'NFkB no fos rellevant per a l'expressió de CNT3. Aquest experiment també es podria fer en HepG2 ja que en aquesta línia s'ha vist que la deficiència en folats podria activar NFkB per estrès oxidatiu (Chern et al. 2001).

Per l'acció de QDPR no es van observar canvis en la construcció de 1077 així com tampoc diferència entre aquesta i la mutació d'NFkB (**Figura 43D**) de manera que es descarta la idea de que aquest factor de transcripció estigui involucrat en la regulació transcripcional de CNT3 per part de QDPR en HEK293, fet que concorda amb l'expressió de les subunitats d'NFkB (**Figura 43A**). En l'única regió on es va trobar diferència d'activitat luciferasa per part de QDPR va ser en la construcció més curta (377) on es va veure un augment d'aproximadament un 25% en l'activitat luciferasa respecte al control (**Figura 43**). Aquest resultat ens suggereix que en aquesta regió es podria trobar el lloc d'unió del factor de transcripció responsable de l'augment de l'expressió de CNT3 per la sobreexpressió de QDPR. S'hauria de repetir l'experiment i si el canvi es confirma estudiar quins factors de transcripció es podrien estar unint en aquesta regió.

Per altra banda, vam voler estudiar si hi havia una regulació conjunta dels CNTs i QDPR. Tot i que QDPR no és directament un enzim del metabolisme de folats, s'ha vist que hi està relacionat mantenint els nivells de THF. Per estudiar d'una manera conjunta els diferents elements ens vam basar en la observació que en llevats existeix un mecanisme regulat pels nivells de 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribòsid 5'-monofosfat (ZMP) i 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribòsid 5'-trifosfat (ZTP) que permet regular la biosíntesi de purines i el metabolisme dels folats a la vegada en procariotes (Kim, Nelson, and Breaker 2015). ZMP (també conegut com AICAR) és el substrat de la penúltima reacció de la síntesi *de novo* de purines (**Figura 44**), també es coneix com a AICAR el 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribòsid que és la forma no fosforilada de ZMP. Per evitar confusions, anomenarem AICAR a la forma no fosforilada i ZMP a la forma monofosfat. Kim et al suggereixen que ZMP serveix com a sensor dels nivells de folats de la cèl·lula ja que una disminució de folats farà que no es pugui dur a terme la reacció i s'acumularà ZMP (**Figura 44**). Aquesta manera indirecta de detectar els nivells de folats és útil ja que, en general, les diferents formes de folats són poc estables i és complicat detectar-ne els nivells. S'ha suggerit que en humans hi podria haver una regulació del

metabolisme de folats per ZMP, i hi ha evidències de la relació entre el metabolisme de folats i els nivells d'AICAR (Luhby and Cooperman 1962).

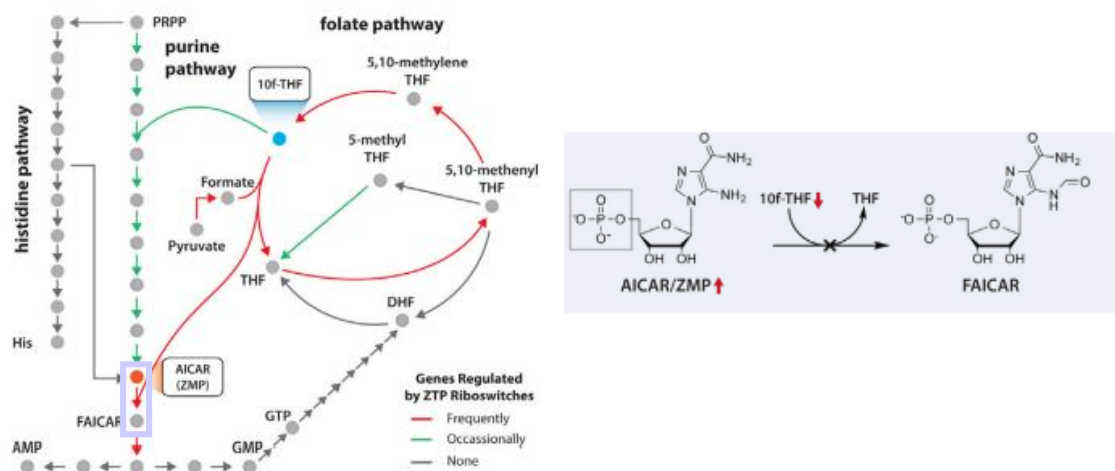


Figura 44. Relació entre les vies de síntesi d'histidina, la síntesi *de novo* de purines i el cicle dels folats en llevat. ZMP es pot generar per la via de síntesi d'histidina i per la síntesi *de novo* de purines i només es pot processar per l'acció d'ATIC en la síntesi de purines (quadre lila) on es fa servir 10-formil-tetrahydrofolat (10f-THF) com a cofactor. D'aquesta manera si hi ha una disminució en els nivells de folats, es donarà una acumulació de ZMP que serà una senyal de falta de folats. ZMP es pot convertir a ZTP amb la despesa de fosforibosil pirofosfat (PRPP). Hi ha enzims regulats pels nivells de ZMP o ZTP en la via de síntesi *de novo* i en el cicle dels folats, en la figura s'indiquen amb fletxes de color verd els que estan regulats ocasionalment i en vermell els que ho fan freqüentment. (Kim, Nelson, and Breaker 2015)

AICAR provoca una desregulació dels nucleòtids d'adenina degut a la desregulació de la síntesi *de novo* i recuperació de purines (Barankiewicz et al. 1990) que provoca l'activació d'AMPK. Però, a més, també pot dur a terme accions de forma independent d'AMPK per una acumulació de ZMP (Guigas et al. 2007), una vegada AICAR ha estat fosforilat per ADK. Un exemple n'és el metabolisme dels folats, ja que l'activitat d'AMPK no el regula (Ducker and Rabinowitz 2015).

Degut a l'efecte de ZMP sobre l'acció del metabolisme de purines i la relació amb el metabolisme de folats, es va pensar en tractar les cèl·lules amb AICAR per provocar un augment de ZMP en la cèl·lula i veure quins efectes es donava en l'expressió de CNTs i QDPR ja que es podrien estar regulant a la vegada. En cèl·lules HEK293 es va fer servir AICAR en diferents concentracions durant 48 h. A la concentració més baixa (0.1 mM) es va poder observar una disminució dels CNTs i, en canvi els nivells de QDPR es mantenien. A la concentració més alta (0.5 mM) els canvis observats eren majors (**Figura 45**). Es va observar un gran augment de CNT3 acompanyat de la disminució de

CNT1, CNT2 i QDPR. Aquesta regulació es podria donar per una acumulació de ZMP o la desregulació dels nivells de purines. De totes maneres, en aquest cas, no es pot descartar l'efecte d'AMPK sobre l'expressió dels CNTs i QDPR, punt que s'hauria d'estudiar. Aquesta només és una aproximació preliminar però segueix en la línia de que hi pot haver una regulació transcripcional entre els transportadors de nucleòsids i QDPR. Per confirmar la implicació de la via de síntesi de purines es podrien fer servir inhibidors de proteïnes de la via de síntesi *de novo* com la inhibició d'ATIC, tot i que en aquest cas també es dona una activació d'AMPK (Asby et al. 2015), així que també s'hauria d'estudiar quin efecte pot tenir AMPK sobre les proteïnes del nostre interès. De totes maneres és interessant l'observació de que varien els nivells de transportadors i de QDPR a la vegada per l'acció d'AICAR. Aquestes modificacions podrien ser degudes a la desregulació dels nivells de nucleòtids a la cèl·lula o per la mimetització d'aquests canvis degut a l'activació d'AMPK.

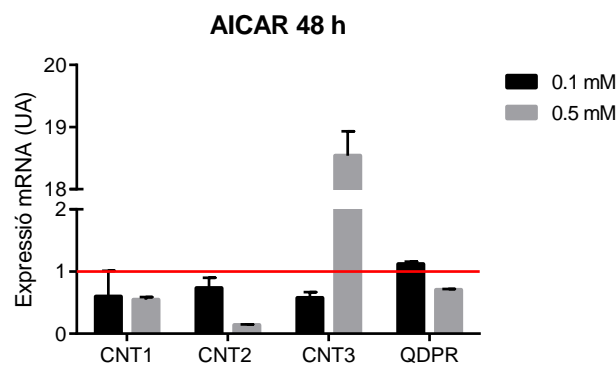


Figura 45. Modulació dels nivells de CNTs i QDPR per AICAR. Es van tractar cèl·lules HEK293 amb AICAR 0.1 o 0.5 mM durant 48 h. Seguidament, es van analitzar els nivells dels diferents CNTs i QDPR per RT-PCR. Els valors estan relativitzats al control sense tractar (línia vermella) i s'expressen en unitats arbitràries (UA). El gràfic representa la mitjana \pm SEM de dos experiments independents.

1.2. Efecte de la sobreexpressió de QDPR sobre l'activitat dels CNTs

Ens vam plantejar si la interacció de CNT3 amb QDPR podria tenir un efecte sobre l'activitat del transportador. En primer lloc, es va fer servir la línia cel·lular HEK-CNT3 i es va sobreexpressar QDPR. Abans havíem comentat que els canvis d'expressió que s'havien observat entre els nivells d'expressió de QDPR i els CNTs podrien estar més relacionats amb els nivells de pirimidines que els de purines. Vàrem pensar que la modulació de l'activitat podria ser dependent del substrat i, per això, vàrem estudiar la translocació dels nucleòsids pirimidínics citidina i uridina i els nucleòsids purínics adenosina i guanosina. L'estudi de guanosina ens semblava especialment interessant ja que el nucleòtid que en deriva (GTP) és el precursor de la síntesi *de novo* de BH₄ que

a la vegada és el producte de QDPR (**Figura 29**). No es va observar efecte per la sobreexpressió de QDPR sobre l'activitat de CNT3 (Na-dep), per cap dels nucleòsids estudiats (**Figura 46**).

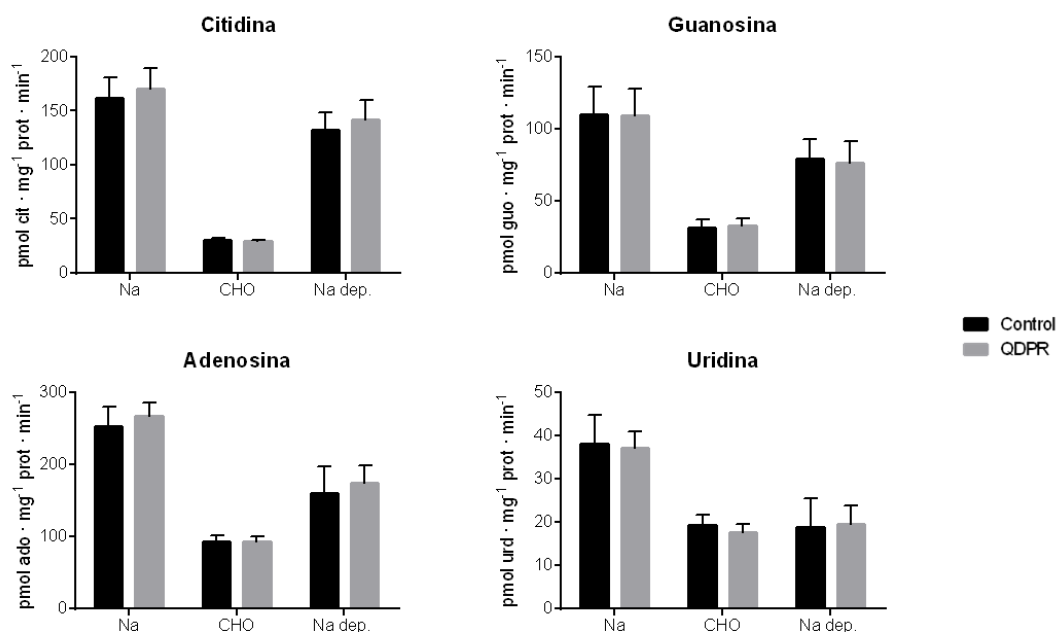


Figura 46. Efecte de QDPR en l'activitat de CNT3. Les cèl·lules HEK-CNT3 es van transfectar amb pcDNA3.1 o QDPR durant 48 h. Es va mesurar el transport de citidina (cit), guanosina (guo), adenosina (ado) o uridina (urd) 1 μ M durant 1 minut. En el medi sodi (Na) hi ha activitat d'ENTs i CNTs, en el medi colina (CHO) d'ENTs i la diferència (Na dep.) és l'activitat dels CNTs. Es representa la mitjana de 4 experiments (cit i guo), 2 experiments (ado) o 3 experiments (urd). T-student de dades aparellades.

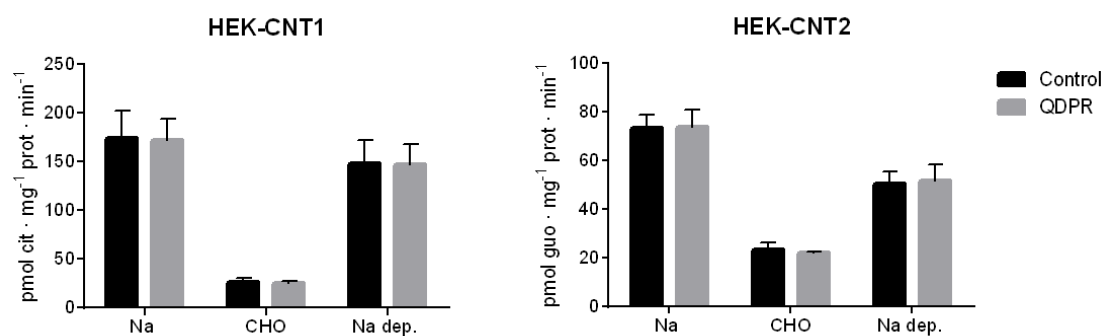


Figura 47. Efecte de QDPR en l'activitat dels diferents CNTs. Les cèl·lules HEK-CNT1 i HEK-CNT2 es van transfectar amb pcDNA3.1 o QDPR durant 48 h. Es va mesurar el transport de citidina (cit) (HEK-CNT1) o guanosina (guo) (HEK-CNT2) 1 μ M durant 1 minut. En el medi sodi (Na) hi ha activitat d'ENTs i CNTs, en el medi colina (CHO) d'ENTs i la diferència (Na dep.) és l'activitat dels CNTs. Es representa la mitjana de 2 experiments (cit) i 3 experiment (guo). T-student de dades aparellades.

Com que en alguns casos s'havien observat canvis d'expressió d'mRNA dels altres CNTs també ens vàrem plantejar si QDPR podria estar modificant l'activitat dels transportadors CNT1 i CNT2. Es va estudiar l'activitat de CNT1 amb el nucleòsid pirimidínic citidina i l'activitat de CNT2 amb el nucleòsid purínic guanosina. En aquest cas, tampoc es van poder observar canvis en el transport d'aquests CNTs per l'acció de QDPR (**Figura 47**).

Tots aquests experiments d'activitat dels CNTs es van realitzar en les línies cel·lulars que sobreexpressen establement els transportadors. S'ha de tenir en compte que en aquest cas podria ser que les cèl·lules presentin adaptacions pel fet de tenir CNT3 sobreexpressat i que això faci que no es vegi l'efecte de QDPR sobre l'activitat, en cas de que es produeixi. També s'ha de tenir en compte que l'eficiència de transfecció, en aquesta línia cel·lular sol ser alta però no es pot descartar que hi hagi cèl·lules amb una gran sobreexpressió de CNT3 que no hagin incorporat QDPR pel que si el canvi d'activitat fos subtil podria no apreciar-se. Per descartar aquests problemes es van fer experiments en la línia cel·lular HEK293 transfectant en el mateix moment el transportador i QDPR, d'aquesta manera les cèl·lules no estarien adaptades a la sobreexpressió del transportador i al ser cotransfecció s'assumeix que les cèl·lules que han estat transfectades presenten les dues proteïnes i les que no s'hagin transfectat no presenten activitat de CNT3. Tot i així, no es va observar cap canvi en l'activitat del CNT3 sobreexpressat per l'acció de QDPR en la translocació de citidina ni en la de guanosina (**Figura 48**). De totes maneres no es pot descartar que la interacció doni un canvi d'activitat ja que aquesta es podria estar donant en alguna localització cel·lular diferent a la membrana plasmàtica, com s'havia pogut observar per immunofluorescència (**Figura 34**).

La utilització de la línia HEK293 també ens va permetre tenir un model per estudiar si l'augment d'mRNA i proteïna de CNT3 que s'havia observat per la sobreexpressió de QDPR (**Figura 38 i Figura 41**) també es traduïa en un augment en l'activitat del transportador. En els experiments anteriors de transport es sobreexpressava CNT3 sense les zones reguladores pel que si s'hagués observat un canvi d'activitat hauria estat per la interacció amb QDPR, per modificacions posttraduccionals de la proteïna o perquè pugui estar afectant a la trimerització de CNT3 i no per un canvi d'expressió de CNT3.

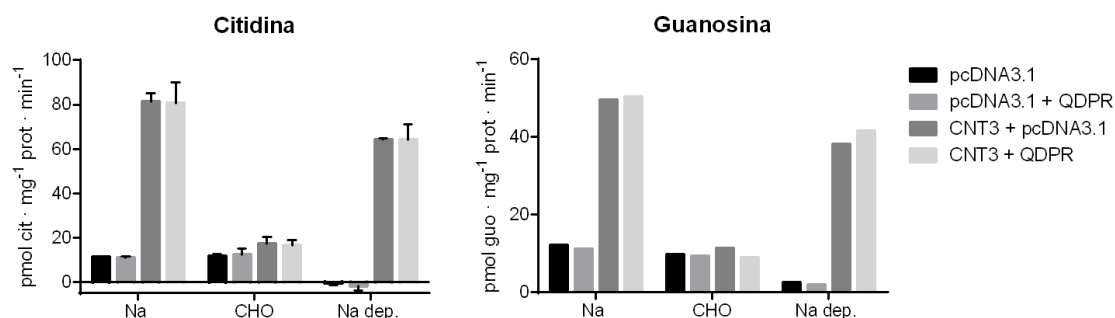


Figura 48. Influència de QDPR en el transport de CNT3. Les cèl·lules HEK293 es van transfectar amb QDPR, CNT3 o la combinació d'ambdós durant 48 h. Es va mesurar transport de citidina (cit) o guanosina (guo) 1 μ M durant 1 minut. En el medi sodi (Na) hi ha activitat d'ENTs i CNTs, en el medi colina (CHO) d'ENTs i la diferència (Na dep.) és l'activitat dels CNTs. Les dades representen la mitjana de dos experiments en el cas de citidina i un experiment per guanosina.

De manera basal, HEK293 no expressava activitat dels CNTs degut a la baixa expressió d'aquests i tampoc es va poder observar cap augment de l'activitat de CNT3 endogen degut a la sobreexpressió de QDPR (**Figura 48**). Pot ser degut a què tot i que els nivells de proteïna augmenten, el canvi d'activitat no sigui suficient per arribar al nivell de detecció de la tècnica. Una altra possibilitat seria que la proteïna no hagi arribat a membrana plasmàtica ja que el procés de tràfic està regulat (Errasti-Murugarren et al. 2012; Fernandez-Calotti et al. 2016; Fernandez-Calotti and Pastor-Anglada 2010).

Per seguir estudiant el possible canvi d'activitat de CNT3 per QDPR, es faran estudis d'electrofisiologia en oòcits amb la coexpressió de les dues proteïnes. Per aquesta raó, al laboratori es va subclonar QDPR en el vector pBlueScript SK (+) entre les dianes KpnI i XhoI, les mateixes entre les que es trobava en el vector pcDNA3.1 (+). Els experiments d'electrofisiologia es duran a terme pel Dr. David Bartolomé (Universidad de la Laguna). Per estudiar si hi ha canvis en l'activitat de CNT3 per l'augment d'expressió que es dona per l'acció de QDPR s'hauria de trobar un model amb activitat endògena de CNT3, però no es coneixen línies cel·lulars que en presentin, el que complica l'estudi.

1.3. Estudi del possible paper fisiològic de la interacció entre CNT3 i QDPR.

Els pacients amb mutacions en QDPR presenten un pronòstic més greu que altres tipus d'HPA i responen pitjor a la suplementació de BH₄. Un punt que empitjora la situació d'aquests pacients és que, a diferència d'altres causes de deficiència de BH₄, presenten deficiències de folats en el SNC (Ponzzone et al. 2004). La interacció de CNT3 amb QDPR ens va fer pensar en la possibilitat de que la recaptació de nucleòsids en la patologia també jugués un paper. Als tubúls del ronyó s'hi expressen transportadors de nucleòsids que permeten la recaptació de purines i pirimidines en aquest òrgan

(Rodríguez-Mulero et al. 2005), per la qual cosa ens va semblar interessant estudiar els nivells d'aquests nucleòsids en orina de pacients amb mutacions a QDPR per veure si l'activitat del transportador podria estar modificada. A través d'una col·laboració amb el Dr. Rafael Artuch de l'hospital Sant Joan de Déu vàrem poder conèixer els nivells de pirimidines en orina de dos pacients amb mutacions en QDPR. El primer cas presentava la mutació c.44T>C en homozigosi (p.Val15Ala), mantenia activitat de QDPR tot i que estava disminuïda. El segon cas presentava la mutació c.295+2_295+3delTG / c.68G>A (p.Gly23Asp) amb activitat de QDPR indetectable. En el primer cas la pirimidinúria era normal, en canvi, en el segon cas hi havia un augment d'unes dues vegades de productes de degradació de les pirimidines, el que podria indicar que per falta d'activitat en QDPR es donaria una disminució de la recaptació de pirimidines per part dels transportadors de nucleòsids en el ronyó. Aquests canvis podrien ser deguts tant a CNT1 com a CNT3 ja que són els dos transportadors concentratius que poden translocar pirimidines i, a més, havíem observat que es podien regular pels nivells de QDPR en la línia cel·lular de ronyó embrionari HEK293. En canvi, el transportador de purines CNT2 no es modificava. En el cas de CNT1 s'ha demostrat que és important per la recaptació de pirimidines en ronyó, ja que un pacient amb mutacions en aquest transportador presentava nivells elevats d'uridina en orina (Perez-Torras 2019). Aquestes observacions ens porten a pensar que sí que hi podria haver una regulació de l'activitat dels CNTs per l'acció de QDPR però necessitem un millor model on estudiar-ho.

Per estudiar la relació dels folats amb les biopterines, Xu et al. van generar el ratolí *Qdpr*^{-/-} (Xu et al. 2014). Van observar que a part dels nivells de biopterina també es modificaven els nivells de folats en diversos òrgans del ratolí. En un estudi metabòlic també van observar que hi havia canvis en vies relacionades (**Figura 49**).

Un dels canvis significatius en els metabòlits del fetge era l'augment de CMP (Xu et al. 2014), que relaciona els nivells de QDPR amb el metabolisme de nucleòtids. Ens vam plantejar la possibilitat de que CNT3, per la seva interacció amb QDPR, també està implicat en aquests canvis així com en els nivells d'aminoàcids relacionats els nivells de BH₄ i de retruc amb QPDR. Aquests són directament Phe, Tyr i Trp que necessiten el cofactor BH₄ per ser hidroxilats. El cicle dels folats, a la vegada, està relacionat amb el cicle de la biopterina tant per l'acció de DHFR com de QDPR. El cicle dels folats també manté punts en comú amb el cicle de la metionina que juntament formen el conegut com a *one carbon metabolism* que consta de reaccions que generen donadors de carboni per multitud de reaccions metabòliques (Locasale 2013).

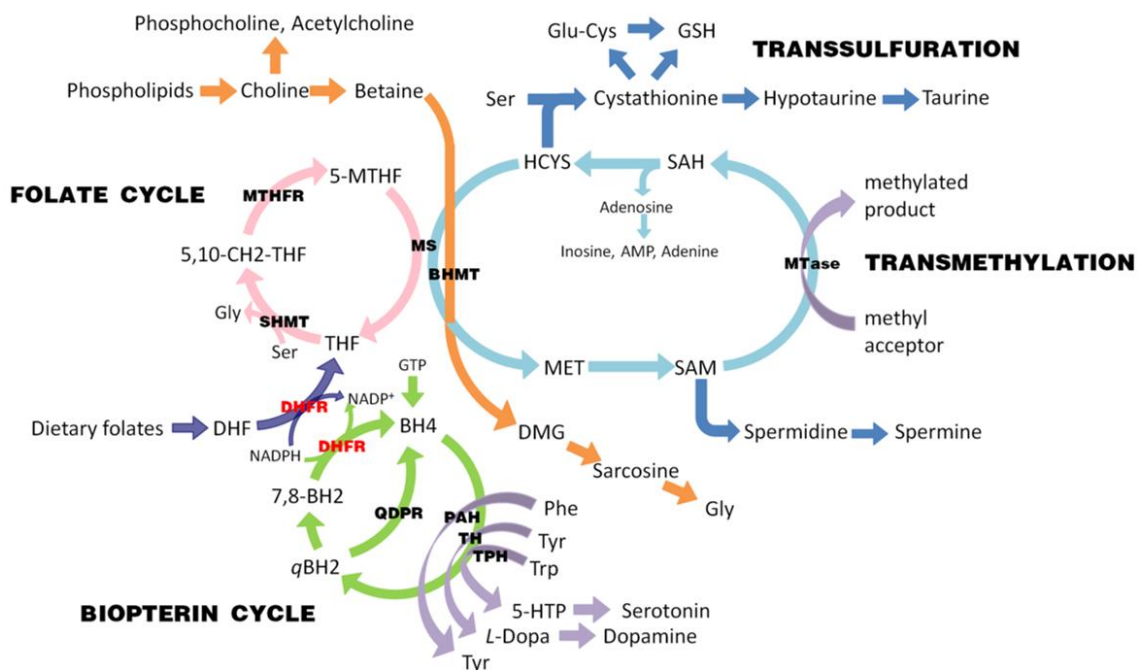


Figura 49. Vies metabòliques afectades en el ratolí Qdpr^{-/-}. Interaccions dels metabòlits associats a les vies de la biopterina i dels folats. El metabolisme de la biopterina (verd) i el cicle del folat (rosa) estan relacionats via DHFR. Cicle de la metionina (cel), transsulfuració (blau). 5,10-CH₂-THF, 5,10-meteniltetrahydrofolat; 5-MTHF, 5-metileniltetrahydrofolat; 5-HTP, 5-hidroxitriptòfan; SAH, S-adenosil-homocisteïna; DMG, dimetilglicina, SAM, S-adenosil metionina; Glu-Cys, glutamilcisteïna; MTHFR, metilentetrahydrofolat reductasa; SHMT, serine hidroximetiltransferasa; MS, metionina sintasa; BHMT, betaïna-homocisteïna metiltransferasa; MTase, múltiples metiltransferases. (Xu et al. 2014)

El metabolisme de nucleòtids depèn del cicle dels folats com a donador de carbonis, de manera que la seva modificació podria dur a canvis en els nivells de nucleòtids en la cèl·lula que, a la vegada, podrien influenciar la recuperació de nucleòsids. D'altra banda, el transportador CNT3 podria tenir una relació amb les vies relacionades amb QDPR. Per estudiar aquesta possibilitat es van analitzar els canvis metabòlics induïts per la presència de CNT3.

Es va estudiar el possible paper modulador de CNT3 en el metabolisme del folat (5-MTHF) i en aminoàcids en cèl·lules control i en cèl·lules amb sobreexpressió estable de CNT3. Es van poder observar canvis tant en 5-MTHF com els aminoàcids relacionats amb el cofactor BH₄ i el cicle de la metionina (**Taula 4**). Aquestes observacions anticipen una relació entre l'expressió de CNT3 i la funció de QDPR.

	5-MTHF (nM)		Tyr (μ M)		Met (μ M)		Phe (μ M)		Trp (μ M)	
HEK-pcDNA5	52,4	1,00	55,3	1,00	45	1,00	59,5	1,00	11	1,00
HEK-CNT3	151	2,88	73	1,32	53,6	1,19	73,6	1,24	16,3	1,48

1,1-1,49 ≥ 2

Taula 4. Modulació dels nivells de 5-MTHF i aminoàcids per CNT3. Es van estudiar els nivells de 5-MTHF i aminoàcids de les línies cel·lulars HEK-pcDNA5 i HEK-CNT3. Per veure la magnitud del canvi es va considerar el canvi respecte el control (números en blau) i el resultat s'ha marcat amb diferents colors depenent del valor respecte el control (llegenda), s'ha considerat canvi a partir d'un 10%.

En les mateixes mostres es van mesurar els nivells de diferents productes del metabolisme de nucleòtids. Es van observar canvis en els nivells dels elements indicats en la (Taula 5), pel que, com era d'esperar, CNT3 modifica els nivells intracel·lulars de purines i pirimidines. Del metabolisme de pirimidines es va observar una disminució en l'àcid oròtic que és el producte de la dihidroorotat deshidrogenasa, punt clau de la síntesi *de novo* de pirimidines. En canvi, els nivells de la nucleobase uracil, el nucleòsid modificat pseudouridina i el producte de la degradació de purines àcid ureidopropionic augmentaven en la línia cel·lular que sobreexpressava CNT3. Els canvis en els nivells de purines es donaven en menor mesura, tot i que les nucleobases hipoxantina i xantina i el nucleòsid purínic inosina van augmentar. En canvi, sorprenentment, el nucleòsid guanosina va disminuir tot i ser substrat del transportador, el que ens podria suggerir que hi ha certa adaptació de les cèl·lules pels alts nivells del transportador.

	[μ mol / 10^9 cèl·lules]	Funció	Control	HEK-CNT3	Ràtio
Pirimidines	acid oròtic	síntesi <i>de novo</i>	0.013	0.004	0.31
	uracil	nucleobase	0.087	0.2	2.30
	pseudouridina	nucleòsid	0.287	0.42	1.46
	acid ureidopropionic	producte de degradació	0.017	0.04	2.35
Purines	hipoxantina	nucleobase	4.383	5.848	1.33
	xantina	nucleobase	0.78	0.984	1.26
	inosina	nucleòsid	0.43	0.492	1.14
	guanosina	nucleòsid	0.033	0.016	0.48

Taula 5. Canvis en els nivells de purines i pirimidines per la sobreexpressió de CNT3.

Per determinar si els canvis observats en 5-MTHF i en els aminoàcids eren específics del transportador CNT3, es van analitzar els nivells d'aquests elements en les línies

cel·lulars HEK-CNT1, HEK-CNT2 i HEK-CNT3 i amb HEK transfectades amb cada un dels transportadors. També es va analitzar l'efecte de la sobreexpressió i el silenciament de QDPR. Degut a la variabilitat dels resultats, només es mostra l'efecte de la sobreexpressió dels transportadors comparant les diferents aproximacions. Per això, en les línies estables es va transfectar pcDNA3.1 com a control de la cotransfecció amb QDPR. En aquest cas també es va afegir la condició de transfecció transitòria per veure si els canvis es devien a una adaptació de les cèl·lules als alts nivells de transportador o si també es donaven a curt termini (48 h de transfecció). Per normalitzar els resultats es van avaluar els nivells de proteïna de cada una de les mostres.

A

	5-MTHF		Tyr		Met		Phe		Trp	
HEK-pcDNA5	88,72	1,00	13,12	1,00	8,38	1,00	13,05	1,00	2,67	1,00
HEK-CNT3	99,88	1,13	17,88	1,36	9,97	1,19	17,46	1,34	3,95	1,48

B

	5-MTHF		Tyr		Met		Phe		Trp	
HEK-pcDNA5 + pcDNA3.1	41,09	1,00	11,83	1,00	6,74	1,00	11,68	1,00	2,52	1,00
HEK-CNT1 + pcDNA3.1	68,91	1,68	12,93	1,09	8,18	1,21	13,06	1,12	2,83	1,13
HEK-CNT2 + pcDNA3.1	53,38	1,30	10,92	0,92	6,86	1,02	11,18	0,96	2,10	0,84
HEK-CNT3 + pcDNA3.1	61,62	1,50	17,65	1,49	9,34	1,38	17,65	1,51	4,01	1,59

C

	5-MTHF		Tyr		Met		Phe		Trp	
HEK293 + pcDNA3.1	67,49	1,00	12,72	1,00	8,58	1,00	11,90	1,00	2,66	1,00
HEK293 + pcDNA3.1 + CNT1	53,82	0,80	12,61	0,99	8,40	0,98	11,77	0,99	2,61	0,98
HEK293 + pcDNA3.1 + CNT2	63,50	0,94	13,11	1,03	8,86	1,03	12,41	1,04	2,74	1,03
HEK293 + pcDNA3.1 + CNT3	79,31	1,18	16,82	1,32	10,94	1,27	16,09	1,35	3,52	1,32

1,1-1,49	1,49-1,99	≤ 0,9
----------	-----------	-------

Taula 6. Modulació dels nivells de 5-MTHF i aminoàcids relacionats amb el metabolisme de BH₄ per l'expressió dels CNTs. Es van estudiar els nivells de 5-MTHF i els aminoàcids tirosina (Tyr), metionina (Met), fenilalanina (Phe) i triptòfan (Trp) en A) la línia cel·lular estable HEK-CNT3 i el seu control HEK-pcDNA5 B) El control HEK-pcDNA5 i les línies estables HEK-CNT1, HEK-CNT2 i HEK-CNT3 transfectades amb el vector control pcDNA3.1. C) La línia cel·lular HEK293 transfectada transitòriament amb pcDNA3.1, CNT1, CNT2 o CNT3. Per normalitzar els valors entre condicions es van relativitzar a la ràtio (Phe/Tyr) i el nivell de proteïna. Els valors de 5-MTHF estan expressats en pmol / mg proteïna i els dels aminoàcids en nmol / mg prot. Per veure la magnitud del canvi s'ha analitzat el canvi respecte el control (números en blau) i el valor s'ha marcat amb diferents colors depenent d'aquest valor (llegenda), s'ha considerat canvi a partir d'un 10%.

En la línia HEK-CNT3 es van confirmar els augments de 5-MTHF, Tyr, Met, Phe i Trp (**Taula 6A**). En les altres línies cel·lulars amb expressió estable dels transportadors es va observar per CNT1 un augment en 5-MTHF, Met, Phe i Trp però no en Tyr (**Taula 6B**). En canvi, per CNT2 es donà un augment en 5-MTHF i una disminució en Trp (**Taula 6B**). De manera que sembla que els canvis siguin específics de cada un dels subtipus dels transportadors. Alguns d'aquests canvis es donaven per l'adaptació de les cèl·lules

a la sobreexpressió dels transportadors ja que els resultats que es van obtenir amb la transfecció transitòria dels transportadors va ser diferent (**Taula 6C**). Per la transfecció de CNT1 va disminuir 5-MTHF, per CNT2 no es van observar canvis i per CNT3 a les 48 h de transfecció ja s'observava l'augment dels mateixos elements que variaven en la línia cel·lular HEK-CNT3. De manera que, mitjançant diferents experiments s'ha vist que els canvis que es donen per l'expressió de CNT3 es reproduïxen. De totes maneres, s'haurien de repetir cada una de les aproximacions per confirmar els resultats. També ens interessava l'estudi dels aminoàcids implicats en la síntesi de purines i pirimidines com a donadors de nitrogen (**Figura 31**). Per la síntesi de purines i pirimidines es necessiten glutamina, glicina i aspartat de manera directa i també aminoàcids que estan relacionats amb el cicle dels folats com són la serina i la mateixa glicina (**Figura 30**). S'observà un augment en els nivells de serina en les diferents aproximacions experimentals que analitzen el paper de CNT3 (**Taula 7**).

A

	Ser		Gly		Asp		Gln	
HEK-pcDNA5	48,23	1,00	118,81	1,00	40,32	1,00	229,25	1,00
HEK-CNT3	64,52	1,34	100,99	0,85	46,80	1,16	253,24	1,10

B

	Ser		Gly		Asp		Gln	
HEK-pcDNA5 + pcDNA3.1	53,46	1,00	103,29	1,00	31,23	1,00	244,19	1,00
HEK-CNT1 + pcDNA3.1	58,16	1,09	101,70	0,98	34,15	1,09	264,16	1,08
HEK-CNT2 + pcDNA3.1	54,77	1,02	122,50	1,19	32,80	1,05	263,24	1,08
HEK-CNT3 + pcDNA3.1	64,80	1,21	113,63	1,10	38,47	1,23	284,77	1,17

C

	Ser		Gly		Asp		Gln	
HEK293 + pcDNA3.1	49,05	1,00	106,87	1,00	32,92	1,00	175,02	1,00
HEK293 + pcDNA3.1 + CNT1	46,75	0,95	99,60	0,93	29,01	0,88	166,02	0,95
HEK293 + pcDNA3.1 + CNT2	47,24	0,96	111,09	1,04	27,03	0,82	169,97	0,97
HEK293 + pcDNA3.1 + CNT3	58,25	1,19	128,15	1,20	29,34	0,89	209,19	1,20

1,1-1,49	≤ 0,9
----------	-------

Taula 7. Modulació dels nivells d'aminoàcids relacionats amb el cicle dels folats i la síntesi *de novo* de purines i pirimidines per l'expressió dels CNTs. Es van estudiar els nivells dels aminoàcids serina (Ser), glicina (Gly), aspartat (Asp) i glutamina (Gln) en A) la línia cel·lular estable HEK-CNT3 i el seu control HEK-pcDNA5 B) El control HEK-pcDNA5 i les línies estables HEK-CNT1, HEK-CNT2 i HEK-CNT3 transfectades amb el vector control pcDNA3.1. C) La línia cel·lular HEK293 transfectada transitòriament amb pcDNA3.1, CNT1, CNT2 o CNT3. Per normalitzar els valors entre condicions es van relativitzar a la ràtio (Phe/Tyr) i el nivell de proteïna. Els aminoàcids estan expressats en nmol / mg prot. Per veure la magnitud del canvi s'ha analitzat el canvi respecte el control (números en blau) i el valor s'ha marcat amb diferents colors depenent d'aquest valor (llegenda). S'ha considerat canvi a partir d'un 10%.

Per contra, per a la glicina, en les dues aproximacions de la línia estable els canvis no van en el mateix sentit (**Taula 7A i Taula 7B**). El que podria suggerir que els canvis no són significatius i caldria validar-ho amb nous experiments. En aquest cas, la glicina és important per les dues vies que estem estudiant, tant pel cicle de folats com per la síntesi de purines. El resultat de glicina per la sobreexpressió de CNT3 no es confirma i els nivells d'aspartat són els únics que mostraven diferències entre les línies que expressen el transportador de manera estable i per transfecció transitòria. Amb la sobreexpressió continuada de CNT3 s'observava un augment d'aspartat i en canvi en la sobreexpressió durant 48 h es veia disminució d'aspartat amb qualsevol dels tres CNTs.

Amb aquestes observacions es pot veure que la presència de CNTs pot portar a canvis metabòlics en la cèl·lula que s'hauria d'adaptar a la nova situació d'entrada de nucleòsids. Això recolza el fet que les diferents vies del metabolisme de nucleòtids estan relacionades i que els transportadors de nucleòsids hi estan implicats. A més, és interessant estudiar aquests canvis ja que cada vegada més es relacionen més elements del metabolisme amb la biologia del càncer. Un punt que s'ha estudiat recentment és la influència dels nivells d'aminoàcids en la progressió i tractament del càncer, juntament amb antimetabòlits (Gao et al. 2019; Kanarek et al. 2018; Maddocks et al. 2017).

Adicionalment, també s'han vist modificacions en altres aminoàcids. Ens vam centrar en els canvis que es generaven per la sobreexpressió de CNT3. En les tres aproximacions que es van fer es va poder observar l'augment d'Hys, Arg, Lys, Glu, Orn, Val, Ile i Leu (**Taula 8**). També es van observar aquests augments en la línia estable de CNT1 però no passava el mateix per la sobreexpressió transitòria d'aquest. La biosíntesi d'histidina té com a intermediari ZMP (**Figura 44**) pel que canvis en aquest aminoàcid també podrien estar relacionats amb la síntesi de purines. Una altra observació interessant és que es donava un augment en els nivells d'ornitina per part de CNT3, en major mesura que els altres aminoàcids. Aquest aminoàcid és important en el cicle de la urea. D'aquest mateix cicle també es va observar l'augment d'arginina. Curiosament, en el ratolí *Slc29a1* *-/-* s'havia observat un augment significatiu d'ornitina en sang i una disminució de la urea en orina (resultats no publicats del grup). Aquestes observacions podrien relacionar l'expressió dels transportadors de nucleòsids amb el cicle de la urea.

En l'aproximació actual, els canvis més clars es van observar per CNT3. En conjunt, per l'expressió de CNT3 es van poder observar canvis en metabòlits relacionats amb el metabolisme de les purines i de les pirimidines així com l'element del metabolisme dels folats 5-MTHF i aminoàcids relacionats amb els nivells de BH₄.

		Hys	Arg	Lys	Glu	Orn	Val	Ile	Leu
A	HEK-pcDNA5	6,42	14,54	19,37	229,97	1,93	21,45	16,90	23,84
	HEK-CNT3	7,90	16,73	21,96	255,31	3,20	25,31	20,74	30,86
		Hys	Arg	Lys	Glu	Orn	Val	Ile	Leu
B	HEK-pcDNA5 + pcDNA3.1	5,43	9,49	14,15	231,40	2,07	18,75	16,40	21,44
	HEK-CNT1 + pcDNA3.1	6,28	11,14	17,40	257,27	2,97	22,18	18,43	24,53
	HEK-CNT2 + pcDNA3.1	5,77	12,08	17,74	247,66	1,89	19,33	16,07	20,80
	HEK-CNT3 + pcDNA3.1	7,24	13,91	19,05	334,20	3,36	27,17	23,15	30,90
		Hys	Arg	Lys	Glu	Orn	Val	Ile	Leu
C	HEK293 + pcDNA3.1	4,62	10,44	23,66	345,46	4,19	23,49	18,51	24,07
	HEK293 + pcDNA3.1 + CNT1	4,95	10,32	21,38	328,36	4,56	22,58	18,02	23,76
	HEK293 + pcDNA3.1 + CNT2	5,31	10,77	22,49	338,56	4,57	23,79	19,05	24,48
	HEK293 + pcDNA3.1 + CNT3	6,54	14,80	30,37	379,68	5,81	31,20	24,37	31,37
		1,1-1,49	1,49-1,99	≤ 0,9					

Taula 8. Altres aminoàcids augmentats per la sobreexpressió de CNT3. Es van estudiar els nivells dels aminoàcids histidina (Hys), arginina (Arg), lisina (Lys), glutamat (Glu), ornitina (Orn), valina (Val), isoleucina (Ile) i leucina (Leu) en A) la línia cel·lular estable HEK-CNT3 i el seu control HEK-pcDNA5 B) El control HEK-pcDNA5 i les línies estables HEK-CNT1, HEK-CNT2 i HEK-CNT3 transfectades amb el vector control pcDNA3.1. C) La línia cel·lular HEK293 transfectada transitoriament amb pcDNA3.1, CNT1, CNT2 o CNT3. Per normalitzar els valors entre condicions es van relativitzar a la ràtio (Phe/Tyr) i el nivell de proteïna dels aminoàcids estan expressats en nmol / mg prot. Per veure la magnitud del canvi s'han analitzat el canvi respecte el control (números en blau) i el valor s'ha marcat amb diferents colors depenent d'aquest valor (llegenda). S'ha considerat canvi a partir d'un 10%.

El següent pas a seguir seria estudiar la regulació d'aquestes molècules per la combinació de cada un dels transportadors amb la sobreexpressió o silenciament de QDPR. Amb el conjunt de resultats es podria anticipar quines vies es poden estar regulant i per confirmar-ho es podrien tractar les cèl·lules amb substrats radioactius de diferents vies i per HPLC fer un seguiment dels canvis que implica la sobreexpressió de CNT3 i QDPR en aquestes vies metabòliques.

En aquest capítol s'ha pogut observar la interacció de CNT3 i QDPR quan es sobreexpressen. La interacció pels nivells endògens fins al moment no s'ha pogut validar per la dificultat de tenir models cel·lulars que retenguin l'expressió de CNT3. A part de la interacció, s'ha pogut observar una regulació a nivell transcripcional que implica tant els CNTs com QDPR. La sobreexpressió de CNT1 provoca un augment en l'expressió de QDPR. A la vegada, la sobreexpressió de QDPR provoca modificacions en els transportadors concentratius encarregats de la translocació de pirimidines, causa la disminució dels nivells d'mRNA de CNT1 i un augment de CNT3. Aquest últim canvi també s'ha confirmat a nivell de proteïna tot i que, en les aproximacions que s'han fet, no es tradueix en un augment de l'activitat. Finalment, es suggereix una relació funcional entre CNT3 i els elements de la via dels folats i de la biopterina, així com també amb la síntesi *de novo* de purines i pirimidines. Aquests canvis podrien ser importants a nivell de fetge i també per la recaptació de nucleòsids en ronyó.

Bloc 2. Regulació d'elements del metabolisme de nucleòtids per FLT3 en leucèmia aguda pediàtrica.

La leucèmia aguda és la neoplàsia més freqüent en l'edat pediàtrica (**Figura 50**) (Steliarova-Foucher et al. 2017). Els dos tipus de leucèmia més comuns en aquesta població són la leucèmia limfàtica aguda (LLA) i la leucèmia mieloide aguda (LMA). Aproximadament el 80% de nens (1-14 anys) i el 56% d'adolescents (15-19 anys) que pateixen leucèmia presenten LLA, mentre que en el cas de LMA es presenta en una 15% en els casos de leucèmia en nens i en un 31% dels casos en adolescents (Ward et al. 2014).

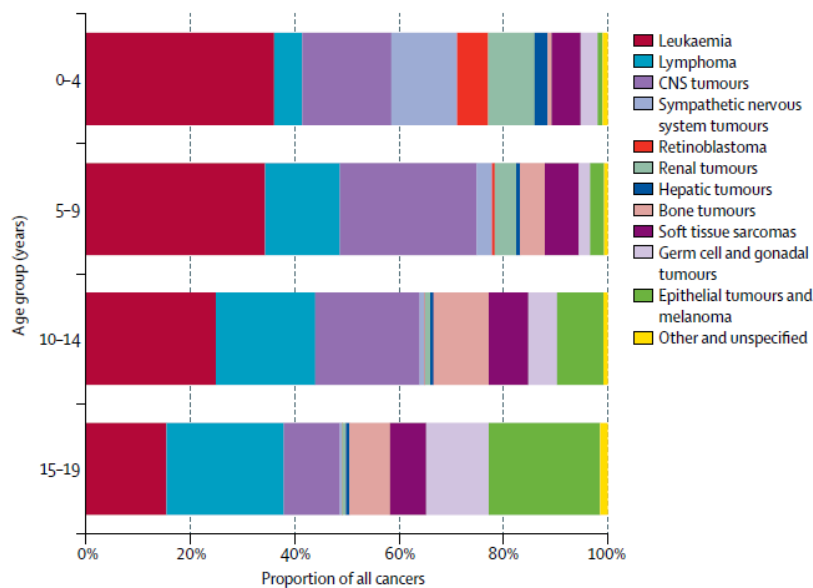


Figura 50. Distribució proporcional del tipus de càncer per franja d'edat en pacients pediàtrics d'arreu del món entre els anys 2001 i 2010. (Steliarova-Foucher et al. 2017)

El receptor *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3) forma part de la família de receptors tirosina quinasa tipus III i està implicat en la hematopoesi (Small et al. 1994). FLT3 s'expressa majoritàriament en progenitors mieloides i limfoides. Normalment, el receptor és estimulat pel lligand d'FLT3 (FLT3L) el que porta a la dimerització del receptor i a la conseqüent activació del domini tirosina quinasa per autofosforilació. Una vegada activat s'indueix la proliferació i s'inhibeix l'apoptosi, per fosforilació de proteïnes diana que es troben per davall el receptor (Stirewalt and Radich 2003).

FLT3 és un dels gens més mutats en LMA en adults. Un 20-25 % dels casos presenten mutacions internes en tàndem (*internal tandem duplications*, FLT3-ITD) i un 5-10% presenten mutacions puntuals en el domini tirosina quinasa del receptor (TKD). En canvi, en pacients pediàtrics d'LMA, les mutacions en FLT3 són menys freqüents, ja que un

10-16% dels pacients presenten FLT3-ITD i un 5-10% TKD (Andersson et al. 2008). La prevalença d'FLT3-ITD augmenta amb l'edat dels nens, és d'un 1.5% en menors d'un any, un 7% entre 1-5 anys i fins a un 17% en pacients d'entre 10 i 20 anys (Meshinchi et al. 2006). La mutació FLT3-ITD porta a l'activació constitutiva i autofosforilació d'FLT3 de manera que està actiu sense necessitat de lligand i, per tant, deixa de ser sensible als nivells d'FLT3L.

Les mutacions d'FLT3 són marcadors pronòstics de la malaltia. En el cas d'FLT3-ITD, el pronòstic és pitjor quan la ràtio FLT3-ITD/FLT3 WT és major a 0.4 (Meshinchi et al. 2006). La sobreexpressió d'FLT3 que porta a l'autofosforilació del receptor també és un factor pronòstic de la malaltia tant en LMA com en LLA (Kang et al. 2012; Ozeki et al. 2004).

Els pacients pediàtrics amb LMA tractats amb quimioteràpia responen pitjor que els pacients que pateixen LLA (Sexauer and Tasian 2017), el que fa que hi hagi la necessitat d'incorporar noves estratègies terapèutiques per millorar l'evolució d'aquests pacients com és el cas de la incorporació d'inhibidors d'FLT3. Els inhibidors d'FLT3 de primera generació –com sorafenib, midostaurina i sunitinib– són inhibidors multiquinasa, els de segona generació –com quizartinib i gilteritinib– s'han sintetitzat específicament per inhibir FLT3 i com a resultat són més selectius i potents. Segons el seu mecanisme d'unió a FLT3 es poden classificar en inhibidors de tipus I o de tipus II. Els primers poden inhibir tant FLT3-ITD com TKD, en canvi, en el segon cas només funcionen per FLT3-ITD. Es consideren de tipus I sunitinib, midostaurina i gilteritinib i de tipus II sorafenib i quizartinib (Larrosa-Garcia and Baer 2017).

El 2018 es van aprovar per l'FDA i l'agència europea del medicament (EMA) els inhibidors d'FLT3 midostaurina i gilteritinib per al tractament d'LMA. Després de l'assaig clínic RATIFY es va aprovar la combinació de quimioteràpia amb l'inhibidor d'FLT3 PKC412 (midostaurina) per al tractament de pacients adults d'LMA amb mutacions d'FLT3 (Kim 2017). En canvi, en el cas del gilteritinib es va aprovar com a monoteràpia en pacients de recaiguda (Dhillon 2019). Actualment hi segueix havent assajos clínics en marxa per aquests fàrmacs i també se n'estan realitzant amb altres inhibidors d'FLT3 com és el cas de quizartinib (Daver et al. 2019). Encara no s'han incorporat els inhibidors d'FLT3 en la pauta clínic per a pacients pediàtrics tot i que s'estan realitzant assajos clínics per estudiar la seva eficàcia en pacients de recaiguda o que no responen al tractament en LMA amb mutacions d'FLT3 i en LLA amb alta expressió d'FLT3. L'assaig de fase 1 amb midostaurina com a monoteràpia es va concloure sense resultats rellevants degut al baix nombre de participants. En el cas de quizartinib es va realitzar

un assaig de fase 1 en combinació amb quimioteràpia i es va observar una millora en pacients amb LMA amb FLT3-ITD però no en pacients amb LMA amb FLT3 WT ni LLA amb sobreexpressió d'FLT3 (Sexauer and Tasian 2017). Actualment, s'estan realitzant assajos clínics de fase 2 per a la combinació de quimioteràpia amb ambdós inhibidors. En el cas de midostaurina s'estudia l'efecte en pacients d'LMA amb FLT3 mutat que encara no han rebut tractament (NCT03591510) i en el cas de quizartinib en pacients d'LMA amb FLT3-ITD que no responen al tractament o que han patit una recaiguda (NCT03793478). El tractament d'inhibidors d'FLT3 en monoteràpia porta a l'aparició de mutacions en el receptor que generen resistència. Per això, la combinació amb quimioteràpia és una millor opció (Daver et al. 2019).

En la pauta de tractament de la combinació de quimioteràpia i inhibidors d'FLT3 s'administra primer la quimioteràpia seguit de l'inhibidor. Aquesta pauta es va dissenyar per evitar l'arrest del cicle cel·lular que podria portar a quimiorresistència si s'administren primer els inhibidors d'FLT3 (Levis et al. 2004). De totes maneres, l'arrest en cicle cel·lular no és l'única font de resistència en la combinació d'aquests tractaments. En el nostre grup, es va descriure la inhibició del transportador de nucleòsids ENT1 per l'inhibidor d'FLT3 PKC412, el que porta a una disminució en l'entrada de citarabina a la cèl·lula, degut a una disminució en els nivells d'mRNA i proteïna, de manera que es dona una menor acció dels fàrmacs que si s'administren en l'ordre invers (Catala et al. 2016). A més, en el mateix estudi, en una cohort de pacients pediàtrics amb subtipus de leucèmia que presenten una alta expressió d'FLT3 es va veure que hi havia una correlació positiva entre els nivells d'mRNA d'FLT3 i ENT1, el que suggereix que la relació entre ENT1 i FLT3 també es dona en els pacients (Catala et al. 2016). A més, s'ha de tenir en compte que l'Ara-C és un profàrmac que s'ha d'activar per fosforilació per dur a terme la seva acció. La dCK s'encarrega del pas limitant de la fosforilació que és revertida per cN-II que desfosforila Ara-CMP. En aquest sentit, el balanç entre dCK i cN-II pot ser rellevant en el tractament amb Ara-C (Galmarini et al. 2003). Recentment, s'ha descrit la implicació de SAMHD1 en la resistència a Ara-C en el tractament de leucèmia ja que aquest enzim és capaç d'inactivar Ara-CTP (Herold, Rudd, Ljungblad, et al. 2017; Schneider et al. 2017). Per tant, tant SAMHD1 com cN-II presenten el mateix rol dual, com a marcadors d'acció del fàrmac i com a possibles dianes per ser inhibides, sent una eina per incrementar la resposta en les teràpies amb anàlegs de nucleòsids (Rampazzo et al. 2016; Herold, Rudd, Sanjiv, et al. 2017). A més, s'han descrit possibles xarxes gèniques regulades coordinadament en cèl·lules canceroses que poden involucrar gens que codifiquen per receptors de factors de creixement, enzims del metabolisme de nucleòtids i una varietat de proteïnes implicades en la reparació del

DNA i apoptosi (Grane-Boladeras, Spring, et al. 2016). Amb totes aquestes evidències ens va semblar rellevant estudiar la relació entre FLT3 i els enzims del metabolisme de nucleòtids dCK, cN-II i SAMHD1.

Pacients	Total no. (%) 108
Sexe	
Masculí	57 (53)
Femení	51 (47)
Edat, anys	
Mediana (rang)	4.7 (0-17.4)
Comptatge de leucòcits, x10⁹/L	
Mediana (rang)	14.2 (0.6-504.0)
Blasts al moll de l'os (n=82)	
Mitjana (rang)	90.0 (25-100)
Immunofenotip	
BCP-LLA	83 (75)
T-LLA	9 (10)
LMA	16 (15)
Citogenètica	
BCP-LLA (n=83)	
Alta hiperdiploïdia	
t(12;21)(p13;q22)/ <i>ETV6-RUNX1</i>	27 (33)
t(1;19)(q23;p13)/ <i>TCF3-PBX1</i>	19 (23)
t(9;22)(q34;q11)/ <i>BCR-ABL1</i>	4 (5)
Reordenament <i>KMT2A</i>	7 (8)
iAMP21	6 (7)
Hipodiploïdia	2 (3)
Altres B	2 (3)
	16 (18)
T-LLA (n=9)	
LMA (n=16)	
Reordenament <i>KMT2A</i>	9 (62)
Altres	5 (38)

Taula 9. Característiques clíniques i biològiques dels 108 pacients pediàtrics diagnosticats amb leucèmia aguda inclosos en el nostre estudi.

En col·laboració amb l'hospital Sant Joan de Déu, es va estudiar la correlació entre els elements del metabolisme de nucleòtids rellevants per a l'acció d'Ara-C i d'aquests amb FLT3 en pacients de leucèmia pediàtrica aguda. Tot i que la combinació entre Ara-C i inhibidors d'FLT3 es fa servir en pacients amb mutacions en FLT3, per estudiar la relació entre FLT3 i el metabolisme de nucleòtids es van fer servir les mostres disponibles dels pacients entre 0 i 18 anys diagnosticats amb leucèmia aguda entre els anys 2003 i 2013, independentment de si era LMA o LLA i de l'estat d'FLT3 en aquests pacients ja que sinó la mostra seria molt petita com per poder tenir resultats significatius. Dels 265 pacients que s'havien diagnosticat durant aquests 10 anys, es van fer servir les mostres de 108 (**Taula 9**). D'aquestes mostres, les 50 que presentaven subtipus de leucèmia amb major expressió d'FLT3 ja s'havien fet servir en el treball anterior (Catala et al.

2016). En l'estudi actual, la cohort no estava esbiaixada per cap característica concreta. Estava formada per aproximadament la meitat de nens i la meitat de nenes amb una mitjana de 4.7 anys (**Taula 9**). Hi havia 83 casos de leucèmia limfàtica aguda de cèl·lules B (BCP-LLA) amb diferents característiques citogenètiques indicades en la Taula 9, 9 casos de leucèmia limfàtica aguda de cèl·lules T (T-LLA) i 16 casos de leucèmia mieloide aguda (LMA). Després d'això es van fer servir línies cel·lulars per aprofundir en l'estudi de les correlacions trobades en les mostres clíniques.

1. Relació entre l'expressió de dCK i cN-II

Es va estudiar la correlació entre dCK i cN-II degut a la importància de la ràtio entre aquests dos enzims en l'acció d'Ara-C. Es va poder observar una correlació positiva entre ambdós enzims tant en la cohort que s'havia fet servir en l'estudi anterior com en la cohort ampliada d'aquest estudi (**Figura 51**). Es va pensar que podien existir mecanismes comuns de regulació per ambdós enzims.

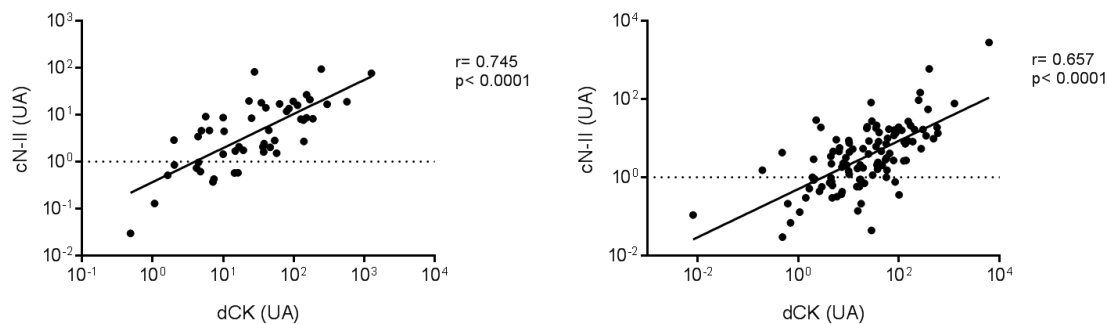


Figura 51. Correlació positiva entre dCK i cN-II en mostres clíniques de pacients pediàtrics de leucèmia aguda. Es van representar els nivells relatius d'mRNA de dCK contra els de cN-II d'una selecció de pacients amb alts nivells d'FLT3 (panell esquerre) o de la cohort completa de 108 pacients (panell dret). A la figura es mostren el coeficient de correlació i el p-valor.

En una primera aproximació es va pensar en activar dCK i/o inhibir cN-II per veure l'efecte que hi havia en l'expressió dels enzims per observar si els canvis anaven en el mateix sentit, ja que en mostres clíniques l'expressió d'ambdós enzims està correlacionada. Per activar dCK es va fer servir afidicolina (APC), un agent genotòxic que porta a l'activació per fosforilació de dCK i permet que es doni una millora en l'efecte d'alguns anàlegs de nucleòsids com és la gemcitabina (Amsailale et al. 2012). En el cas de cN-II es va fer servir *Anthraquinone 2-6 disulfonic acid* (AdiS) per inhibir competitivament l'enzim (Jordheim, Marton, et al. 2013). Es van fer servir dues línies cel·lulars diferents, MV4-11 d'LMA pediàtrica i MEC-1 d'LLC en adult. Per determinar les concentracions que es farien servir no es van poder realitzar assajos d'activitat dels enzims i per això vam fer una aproximació indirecta mesurant la viabilitat cel·lular i es

van seleccionar concentracions a les que es podia veure un mínim efecte citotòxic que assumíem que es donava per l'acció sobre els enzims però sense que hi hagués un gran efecte sobre aquesta viabilitat ja que podria emmascarar els resultats obtinguts. Així en MV4-11 es van fer servir les concentracions: 250 μ M d'AdiS i 55 nM d'APC i en MEC-1: 135 μ M d'AdiS i 80 nM d'APC. Es van realitzar tractaments durant 6 h i 24 h. No es van poder observar canvis significatius en l'expressió de dCK ni de cN-II en cap de les condicions de tractament (**Figura 52**), ni activant dCK, ni inhibint cN-II, ni modulant els dos alhora en cap dels temps estudiats. Així que aquesta aproximació no ens va permetre determinar si ambdós enzims es modulaven alhora ja que no vam aconseguir veure canvis.

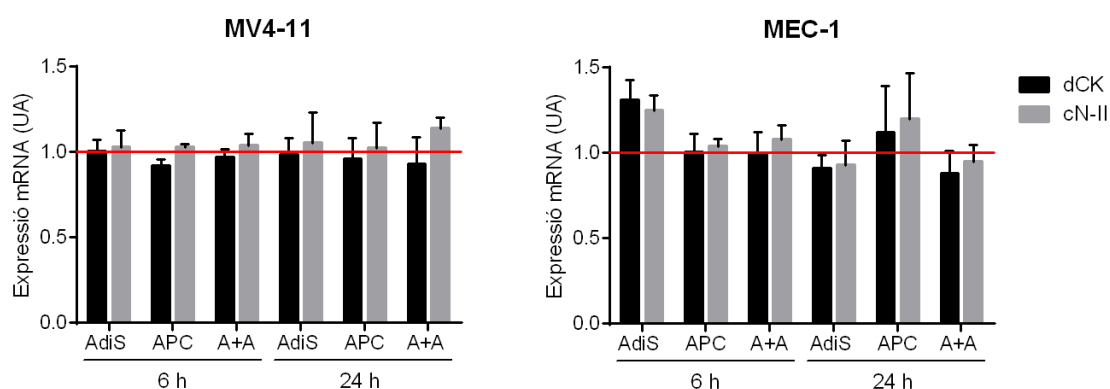


Figura 52. Modulació de dCK i cN-II per AdiS i/o afidicolina en línies cel·lulars de leucèmia. Es van tractar la línia cel·lular de LMA MV4-11 i la línia cel·lular d'LLC amb l'inhibidor de cN-II AdiS, l'activador de dCK afidicolina (APC) o amb la combinació d'ambdós (A+A) durant 6 i 24 h. L'expressió d'mRNA de dCK i cN-II es va analitzar per RT-PCR. Els valors estan relativitzats al control sense tractar de cada temps i es mostren en unitats arbitràries (UA). Els gràfics representen la mitjana de tres experiments independents. Es va realitzar t-student aparellada.

Per això, es va passar a l'estratègia de modular la síntesi *de novo* de pirimidines per veure si en aquesta situació es regulaven els nivells dels enzims de recuperació. En aquest sentit es va fer servir brequinar, inhibidor de la DHODH que és un dels enzims que controla el flux d'aquesta via metabòlica. Brequinar es va provar en assajos clínics per al tractament de tumors sòlids però no es van aconseguir resultats satisfactoris ja que brequinar no era efectiu en les dosis i temps que es van fer servir (Noe et al. 1990; Arteaga et al. 1989). Actualment, ha sorgit un nou interès en aquest fàrmac ja que s'ha demostrat que permet inhibir la proliferació i millorar la diferenciació de les cèl·lules d'LMA i s'està avaluant la seva utilitat per al tractament d'aquesta malaltia en assajos clínics (Sykes 2018; Sykes et al. 2016). En aquest cas es va seleccionar la concentració mirant que el fàrmac tingués un efecte sobre el cicle cel·lular ja que una falta de pirimidines faria que les cèl·lules avancessin més lentament en el cicle o quedessin arrestades. Com que l'efecte de brequinar es pot veure rescatat pels nivells d'uridina

que es recuperen es va fer servir en combinació amb els inhibidors del transport equilibratiu dipiridamol i NBTI. Una altra opció hauria pogut ser fer servir sèrum dialitzat (Peters, Kraal, and Pinedo 1992), però aquesta aproximació és probablement menys específica.

A més, es va pensar en la possibilitat de que dCK i cN-II estassin relacionats no només en leucèmia sinó també en altres tipus de tumors ja que aquests enzims també serveixen per metabolitzar altres anàlegs de nucleòsids com la gemcitabina (Jordheim, Durantel, et al. 2013), anàleg emprat per al tractament de tumors sòlids. Per això, es van estudiar els nivells basals de dCK i cN-II en línies cel·lulars generades a partir de diferents tipus de tumors sòlids (NP-9, PANC-1, NP-9, CP15T i BxPc3 són línies d'adenocarcinoma pancreàtic i HT-29 d'adenocarcinoma colorectal). També es van incloure la línia de LMA pediàtrica MV4-11 i la línia d'LLC MEC-1. Es va poder observar que les línies presentaven diferents nivells basals tant de dCK com de cN-II i que la correlació entre els nivells d'mRNA de dCK i de cN-II en les diferents línies cel·lulars era positiva tot i que aquesta correlació no era significativa (**Figura 53**).

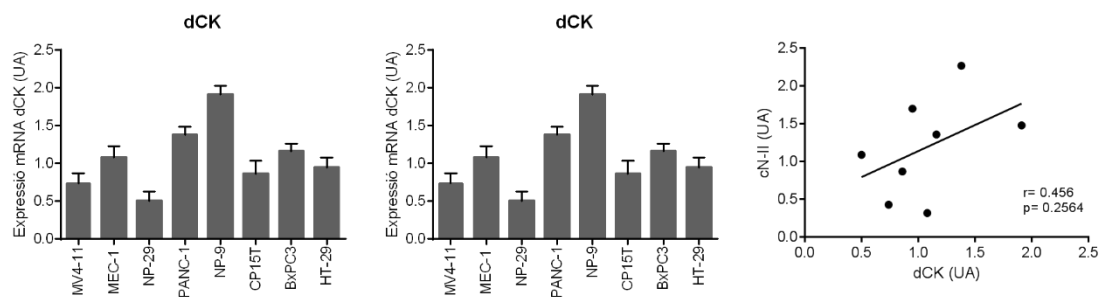


Figura 53. Anàlisi dels nivells d'mRNA de dCK i cN-II en diferents línies cel·lulars. Es van analitzar els nivells basals d'mRNA de dCK i cN-II per RT-PCR en les línies cel·lulars d'LMA (MV4-11), LLC (MEC-1) adenocarcinoma pancreàtic (NP-29, PANC-1, NP-9, CP15T i BxPC3) i adenocarcinoma colorectal (HT-29). Es van representar de manera individual com a valors relatius en unitats arbitràries (UA) respecte al valor de la mitjana de les diferents línies. L'error representa la mitjana de les rèpliques d'una sola mostra. Els mateixos valors es van representar conjuntament per estudiar la correlació. En el gràfic es mostren el coeficient de correlació i el p-valor.

Es va avaluar l'efecte de breuinar juntament amb els inhibidors dels transportadors equilibratius en les línies cel·lulars MV4-11, HT-29, PANC-1 i NP-9. En general, quan les cèl·lules només es van tractar amb breuinar no es va observar cap efecte sobre el cicle cel·lular. En canvi, quan es va combinar amb la inhibició d'ENT1 i ENT2 per part d'NBTI o dipiridamol es van poder observar canvis (**Figura 54**).

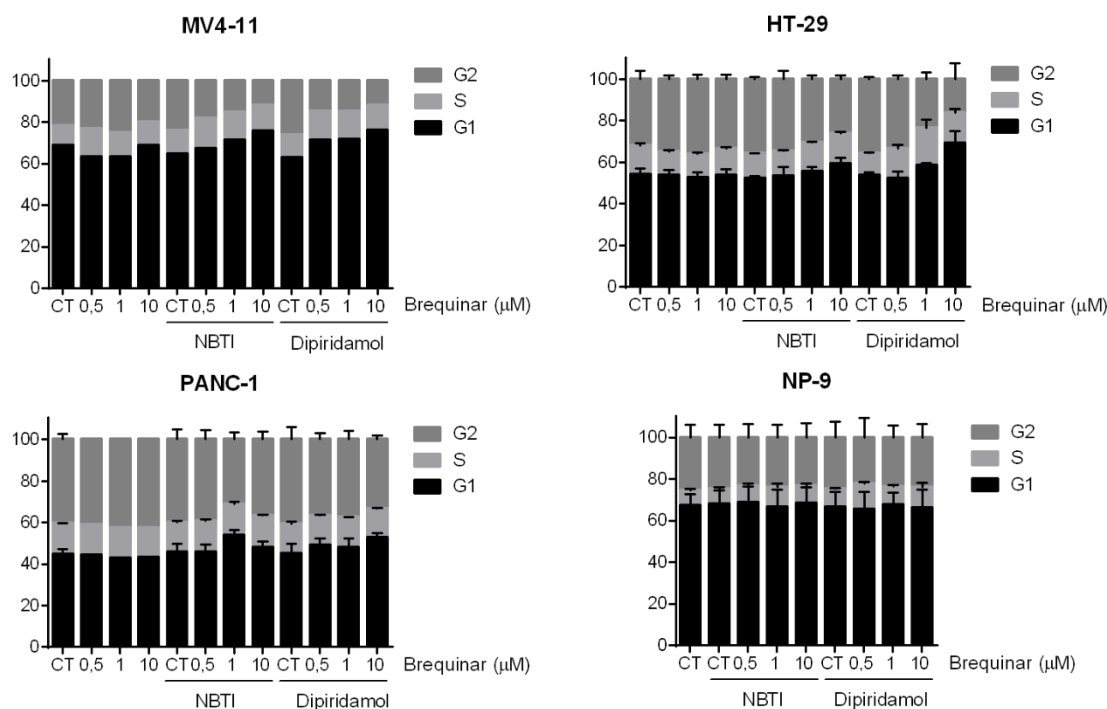


Figura 54. Anàlisi de l'efecte en el cicle cel·lular de la inhibició de la via de síntesi de novo de pirimidines i/o l'entrada de nucleòsids per a la via de recuperació. Es va inhibir l'enzim DHODH de la via de síntesi de novo de pirimidines amb diferents concentracions de brequinar i els transportadors de nucleòsids ENT1 i ENT2 amb 10 µM d'NBTI o 10 µM de dipiridamol durant 6 h. Es van fer servir les línies cel·lulars MV4-11, HT-29, PANC-1 i NP-9. Els punts on hi ha barra d'error es representa la mitjana de dos experiments independents. En els punts que no hi ha error es representa un sol experiment.

En MV4-11 es va veure un augment en fase G1 en totes les concentracions de brequinar tant en combinació d'NBTI com de dipiridamol. Aquesta és la línia més sensible a aquest efecte. En HT-29 l'efecte es va veure sobretot en la combinació de brequinar 10 µM amb dipiridamol, tot i que ja hi havia cert efecte en la concentració d'1 µM i a 10 µM en combinació amb NBTI. Posteriorment, en la tesi doctoral de la Dra. Liska Caviedes, es va comprovar l'efecte de dipiridamol 10 µM sobre l'activitat de DHODH en HT-29 i es va poder observar una disminució d'un 50 % de l'activitat de l'enzim que es mantenia en el cas de la combinació amb dipiridamol 10 µM. En el cas de PANC-1 l'efecte es va observar en les condicions de brequinar 10 µM tant en combinació d'NBTI com de dipiridamol (**Figura 54**). Finalment, en la línia cel·lular NP-9 no es van poder observar canvis en el cicle cel·lular. En els dos experiments es van veure diferents nivells basals de la distribució de les fases del cicle i d'aquí ve l'error que es pot observar en l'experiment. Això pot ser degut a que aquesta línia cel·lular s'arresta fàcilment i segurament en un dels dos experiments les cèl·lules estaven massa confluents, el que donava un percentatge més alt de fase G1. De totes maneres no es veia l'efecte de brequinar amb o sense dipiridamol en cap dels dos experiments. Aquesta línia cel·lular

presenta un temps de divisió més llarg que altres línies i podria ser que amb 6 h no hagués passat el temps necessari perquè es pogués veure un efecte en el cycle cel·lular. Per això, es van provar noves aproximacions. En un cas es van tractar les cèl·lules durant 6 h, es va canviar el medi i es van deixar en cultiu durant 18 h més. L'altra condició va ser deixar el tractament durant 24 h.

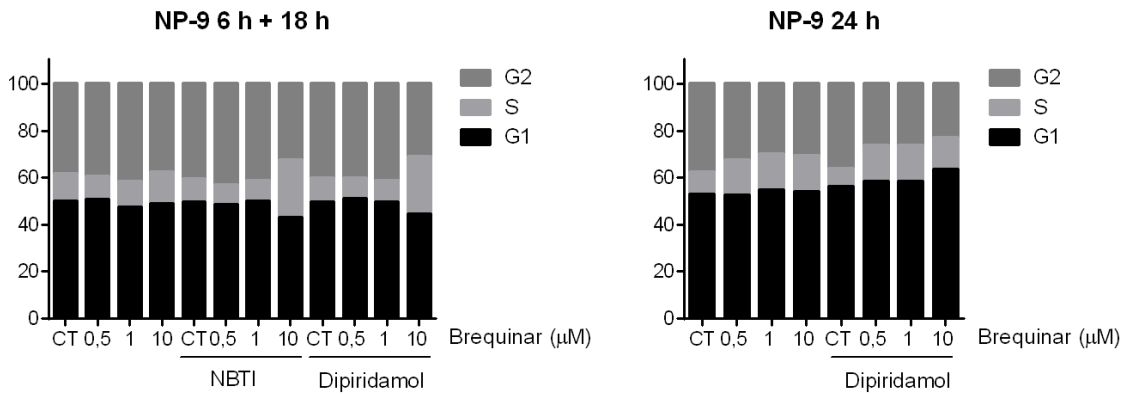


Figura 55. Anàlisi de l'efecte en el cycle cel·lular de la inhibició de la via de síntesi *de novo* de pirimidines i/o l'entrada de nucleòsids per a la via de recuperació en NP-9. Es va inhibir l'enzim DHODH de la via de síntesi *de novo* de pirimidines amb diferents concentracions de brequinar i els transportadors de nucleòsids ENT1 i ENT2 amb 10 µM d'NBTI o 10 µM de dipiridamol en dues pautes de tractament diferents: es van tractar 6 h i es van deixar en cultiu durant 18 h més, en l'altre cas el tractament es va deixar durant 24 h. Es representa un sol experiment.

En el primer cas, es podia observar una acumulació en fase S (**Figura 55**), que podria indicar que en algun punt hi havia hagut una acumulació en fase G1 com s'havia vist en les altres línies cel·lulars i que ja havien avançat cap a fase S en el moment de l'anàlisi, de manera que 6 h de tractament amb brequinar també té efectes en la línia cel·lular NP-9 però es poden observar més endavant degut al temps de divisió d'aquesta línia. Una altra opció seria que, en aquest cas, l'efecte sigui per un alentiment de la fase S, de manera que tardin més a sortir d'aquesta fase i s'acumulin. Si aquestes cèl·lules es tracten durant 24 h es pot observar l'augment en fase G1 i S (**Figura 55**). Per determinar si en totes les línies passa el mateix, es podria mesurar la incorporació de 5 BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) per comprovar si les cèl·lules passen per fase S.

Baix aquestes mateixes condicions es van analitzar els nivells d'mRNA de dCK i cN-II. En general, no es van observar canvis en els nivells d'mRNA d'aquestes enzims pel tractament amb brequinar (**Figura 56**). Tot i els errors que es poden observar en l'experiment hi podria haver una certa tendència a canviar en el cas de les línies d'adenocarcinoma pancreàtic (PANC-1 i NP-9). De totes formes, els canvis de dCK i cN-II no van en el mateix sentit en cap dels casos i en general es donaria una disminució de dCK i un augment de cN-II que anirien en contra de l'activació de gemcitabina, el

profàrmac que s'administra en aquest tipus de tumors. Al no tenir resultats concloents no es va seguir estudiant la correlació de dCK i cN-II amb aquestes estratègies.

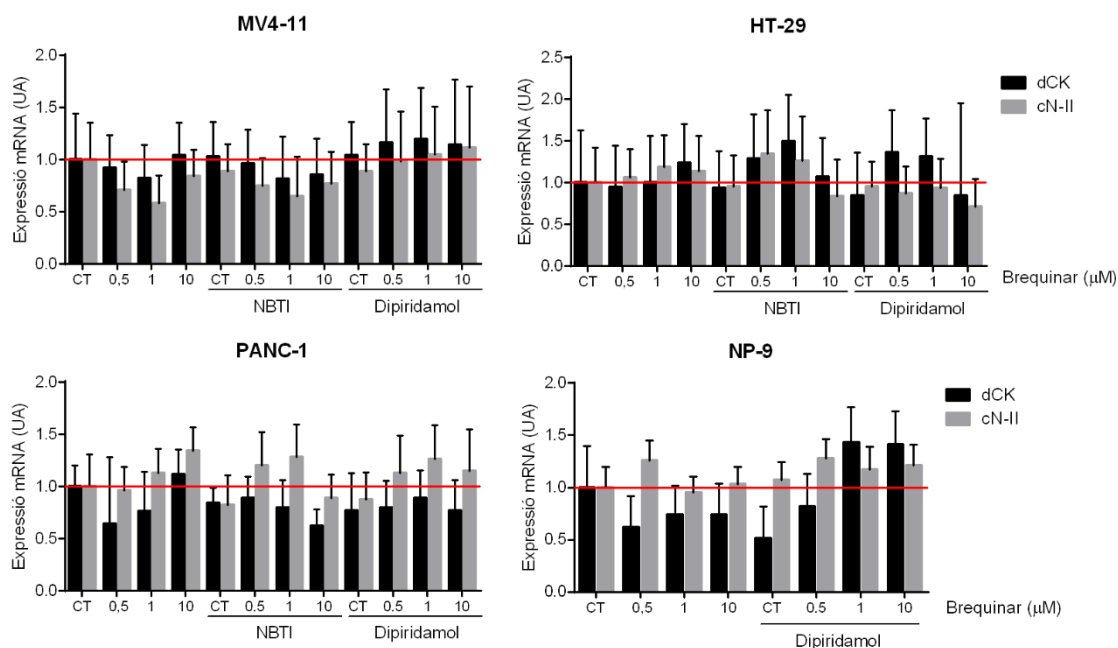


Figura 56. Anàlisi dels nivells d'expressió d'mRNA de dCK i cN-II pel tractament amb AdiS i/o afidicolina. Les cèl·lules MV4-11, HT-29, PANC-1 i NP-9 es van tractar amb l'inhibidor de DHODH brequinar a diferents concentracions i es van inhibir els transportadors de nucleòsids ENT1 i ENT2 amb 10 µM d'NBTI o 10 µM de dipiridamol durant 6 h. Seguidament, per RT-PCR, es van analitzar els nivells relatius d'mRNA de dCK i cN-II respecte al control sense tractar. Els resultats es mostren en unitats arbitràries (UA) i són la mitjana de duplicats d'un sol experiment.

2. Regulació d'elements del metabolisme de nucleòtids per FLT3.

Es va procedir a estudiar la correlació entre FLT3 i aquests enzims ja que anteriorment s'havia vist que aquest receptor implicat en l'hematopoesi podia regular l'expressió d'ENT1, per la qual cosa no es podia descartar que tingués també un efecte sobre altres elements del metabolisme de nucleòtids. Per això es van estudiar els nivells d'mRNA d'FLT3, dCK i cN-II en les mostres clíniques de la cohort de malalts abans indicada. Es va observar una correlació positiva entre FLT3 i dCK i també entre FLT3 i cN-II (**Figura 57A**) en la cohort de pacients de l'estudi anterior (Catala et al. 2016) que expressaven subtipus de leucèmia amb alta expressió d'FLT3. Aquesta correlació es mantenia en la cohort ampliada d'aquest estudi (**Figura 57B**). En canvi, en el cas de la correlació entre FLT3 i ENT1 es va poder observar que la tendència canviava en la cohort ampliada, mentre que en l'estudi anterior s'apreciava una correlació positiva significativa (**Figura 58A**) en la cohort ampliada deixava d'haver-hi correlació (**Figura 58B**).

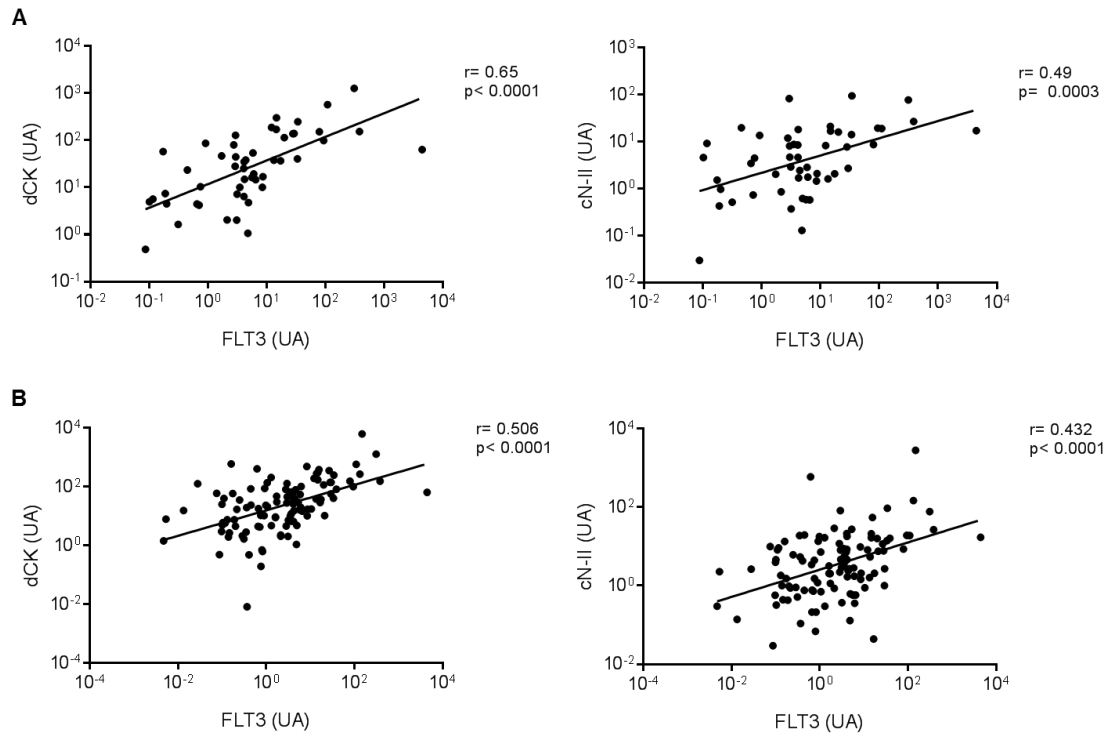


Figura 57. Correlació positiva entre FLT3 i elements de la via de recuperació de nucleòsids (dCK i cN-II) en mostres de leucèmia aguda pediàtrica. Els nivells relatius d'mRNA de dCK o cN-II es van representar respecte als nivells d'FLT3 en A) una selecció dels subtipus de leucèmia amb major expressió d'FLT3 (reordenament *KMT2A*, HeH i altres B) o B) tots els pacients de la cohort estudiada (n= 108). En la figura es mostren el coeficient de correlació i el p-valor.

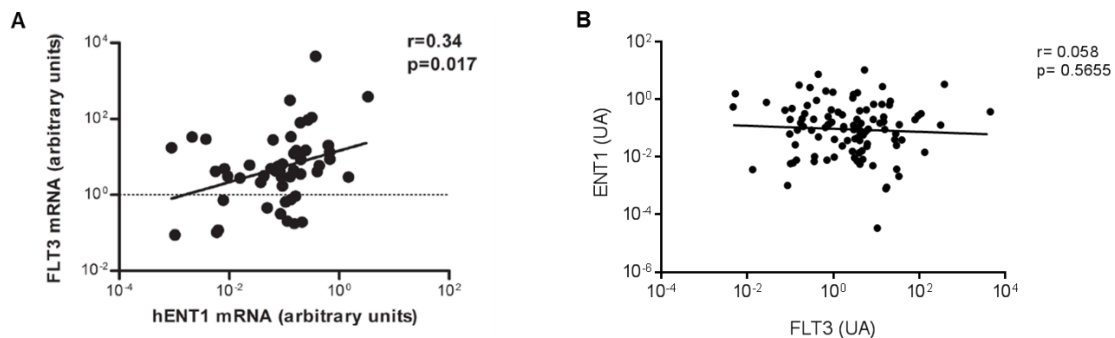


Figura 58. Correlació entre FLT3 i el transportador de nucleòsids ENT1 en mostres de pacients pediàtrics de leucèmia aguda. A) Correlació positiva entre FLT3 i ENT1 de l'estudi anterior del nostre grup (Catala et al. 2016). B) Es van analitzar els nivells relatius d'mRNA d'ENT1 i FLT3 per RT-PCR i es van representar un respecte a l'altre (n= 102). En la figura es mostren els coeficients de correlació i el p-valor.

Per estudiar la relació funcional entre FLT3 i dCK, cN-II i ENT1 es van fer servir línies cel·lulars de leucèmia aguda pediàtrica amb diferents característiques. MV4-11 prové d'LMA amb translocació t(4;11), reordenació *KTM2A* i FLT3-ITD. SEM prové d'LLA de precursors de limfòcits B, presenta translocació t(4;11) i reordenació *KTM2A* amb alta expressió d'FLT3 però sense mutacions en FLT3.

La primera estratègia per estudiar la modulació per FLT3 dels elements d'estudi va ser activar el receptor amb el seu lligand natural (FLT3L). En aquest cas només es va fer servir la línia cel·lular SEM ja que MV4-11 presenta la mutació FLT3-ITD que fa que el receptor estigui actiu constitutivament i deixi de respondre al lligand. Les cèl·lules SEM es van tractar amb 50 ng/ml d'FLT3L durant 1, 4 i 24 hores. Baix aquestes condicions, la fosforilació d'FLT3 es va induir ràpidament i ja era evident al primer punt estudiat (1 h), la fosforilació es mantenia a les 4 h tot i que en menor mesura i a les 24 h de tractament ja havia tornat als nivells basals (**Figura 59A**). D'acord amb els canvis ràpids d'activació del receptor FLT3, també es varen observar canvis a temps curts en els nivells d'expressió dels elements estudiats (**Figura 59B**). Els nivells de dCK van disminuir a les 4 h d'activar el receptor i es van mantenir baixos a les 24 h. Els nivells d'mRNA de cN-II presentaven una tendència a augmentar a les 4 h però la seva expressió va disminuir significativament a les 24 h de tractament. En el cas d'ENT1 es va observar una tendència a augmentar tant a 4 com a 24 h tot i que aquest efecte no era significatiu.

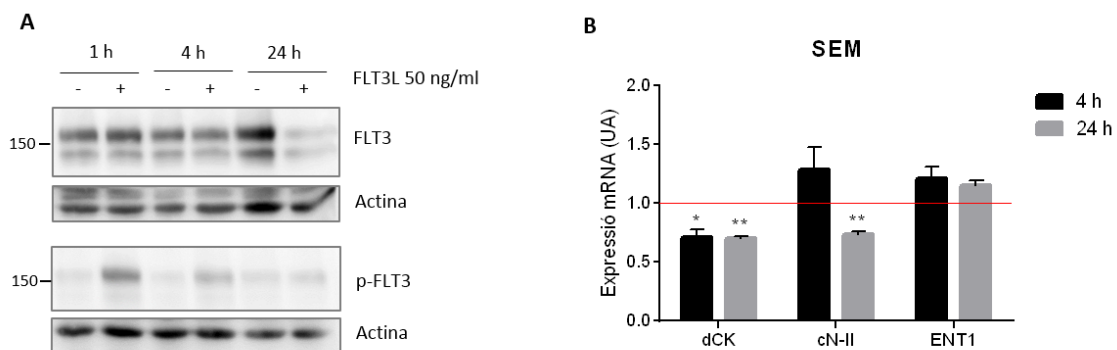


Figura 59. Modulació de l'expressió d'mRNA de dCK, cN-II i ENT1 amb el lligand d'FLT3. Les cèl·lules SEM es van tractar amb 50 ng/ml d'FLT3L durant els diferents temps indicats en la figura. A) Es va analitzar per WB l'efecte d'FLT3L en la fosforilació d'FLT3. B) Es van analitzar els nivells relatius d'mRNA de dCK, cN-II i ENT1 respecte al control de cada temps per RT-PCR. Es mostren els resultats de la mitjana de 3-5 experiments independents. S'ha realitzat t-student de dades aparellades *p < 0.05 **p < 0.01.

També es va analitzar l'impacte de la inhibició farmacològica del receptor tirosina quinasa FLT3 per l'inhibidor específic AC220 a la concentració de 10 nM. En aquest cas es van fer servir les línies cel·lulars MV4-11 i SEM ja que l'inhibidor es pot fer servir tant en mutacions FLT3-ITD com en la sobreexpressió d'FLT3.

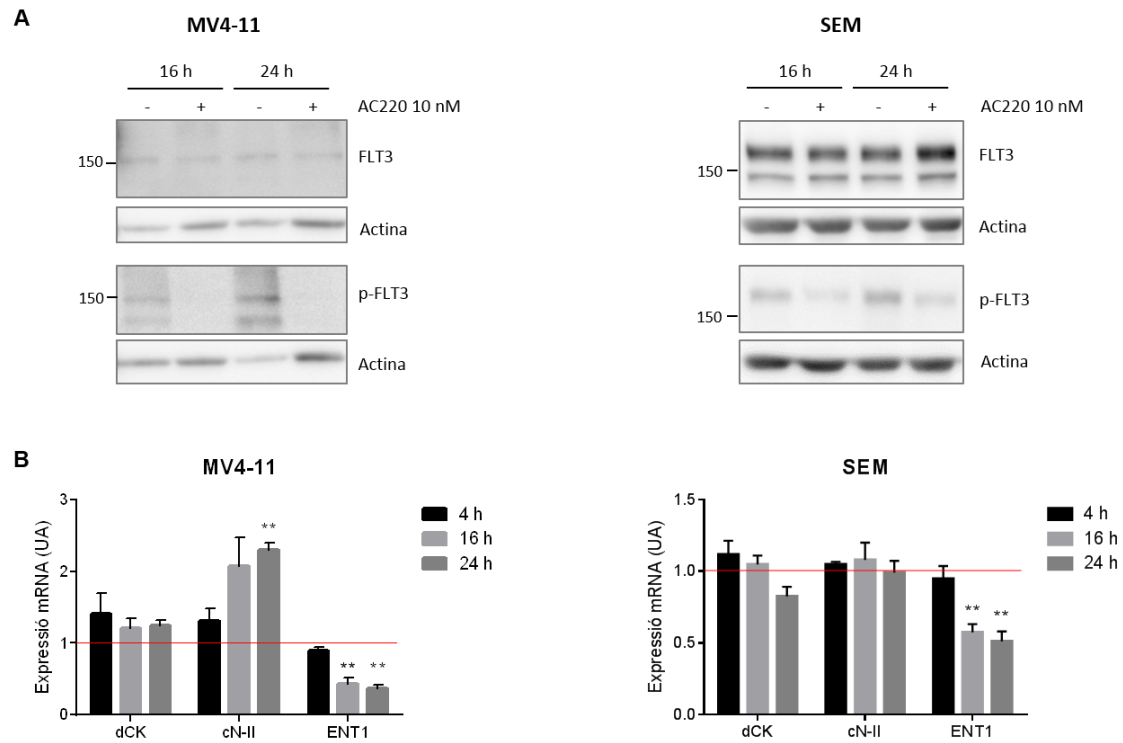


Figura 60. Efecte de la inhibició d'FLT3 per AC220 sobre l'expressió d'mRNA de dCK, cN-II i ENT1. Les cèl·lules MV4-11 i SEM es van tractar amb 10 nM d'AC220 durant 16 i 24 h. Baix aquestes condicions es van analitzar A) els nivells d'FLT3 i FLT3 fosforilat per WB B) els nivells relatius d'mRNA de dCK, cN-II i ENT1 respecte al control de cada temps per RT-PCR. Els resultats respresenten la mitjana de 3-4 experiments independents. S'ha realitzat t-student de dades aparellades de cada condició respecte al seu control * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

L'efecte de l'inhibidor en cada una de les línies es va poder veure per la disminució de la fosforilació d'FLT3 sense modificar-ne els nivells totals del receptor (**Figura 60A**). Baix aquestes condicions es va poder observar la disminució significativa d'ENT1 tant en MV4-11 com en SEM (**Figura 60B**) tal com ja s'havia observat per acció de l'inhibidor multiquinasa PKC412 (Catala et al. 2016). En aquest cas AC220 és més específic per FLT3 pel que, considerant també la tendència a augmentar d'ENT1 amb l'estimulació d'FLT3 per FLT3L, es reforça la idea de que la regulació dels nivells d'ENT1 es donen específicament per la inhibició d'FLT3 i no per l'acció d'alguna altra quinasa que pugui ser diana de PKC412. L'anàlisi dels nivells de dCK i cN-II no va mostrar canvis en la línia cel·lular SEM amb el tractament d'AC220, mentre que en MV4-11 es va observar una tendència a augmentar dels nivells de dCK i cN-II i aquest augment era significatiu per cN-II a les 24 h de tractament (**Figura 60B**). La diferència entre les línies cel·lulars pot venir donada per la contribució d'FLT3-ITD que determina patrons d'expressió gènica concrets deguts a la mutació del receptor (Cauchy et al. 2015). També pot ser

rellevant en aquesta diferència el fet de que les línies cel·lulars presenten la capacitat de secretar FLT3L (Zheng et al. 2004) que podria afectar SEM que presenta sobreexpressió d'FLT3 però no a MV4-11 ja que FLT3-ITD no respon al lligand. Tenint en compte la secreció basal d'FLT3L en les línies cel·lulars, per evitar variabilitat entre experiments, en tots els assajos fets amb aquestes línies cel·lulars es va procedir a canviar el medi de les cèl·lules 24 h abans de començar l'experiment per partir del mateix estat de fosforilació en tots els casos.

Amb aquests resultats i tornant a les correlacions clíniques es va poder observar que tant per l'activació com per la inhibició d'FLT3, dCK i cN-II tendien a canviar en el mateix sentit (augmentar o disminuir) encara que en el cas de MV4-11 l'augment es donava en diferent magnitud. Aquests canvis concorden amb la correlació positiva entre dCK i cN-II que s'havia observat en pacients de leucèmia aguda pediàtrica (**Figura 51**). En canvi, la correlació positiva entre FLT3 i els enzims del metabolisme de nucleòtids que s'havia observat en pacients no es va poder reproduir en models cel·lulars ja que no es van traduir en respostes moduladores en la línia del que es podria esperar ja que per la inhibició d'activitat d'FLT3 provocava un augment dels nivells d'expressió de cN-II i SAMHD1. No obstant, s'ha de tenir en compte que les dades clíniques corresponen als nivells que es troben en el moll de l'os en el moment del diagnòstic (sense tractar), una situació que és difícil de mimetitzar *in vitro* quan es modula FLT3 durant temps curts i s'analitzen els nivells d'expressió dels enzims.

El canvi més rellevant obtingut per la modulació d'FLT3 en les línies cel·lulars va ser l'augment significatiu de cN-II per l'efecte de la inhibició d'FLT3. Aquest canvi juntament amb la disminució d'ENT1 poden portar a fenòmens de quimiorresistència per la combinació d'inhibidors d'FLT3 i anàlegs de nucleòsids com la citarabina. Per això, es va procedir a estudiar l'efecte de la inhibició de cN-II en la citotoxicitat induïda per citarabina tant en combinació amb AC220 com sense. Les cèl·lules MV4-11 es van pretractar o no amb AC220 10 nM durant 24 h. Passat aquest temps es va canviar el medi tractant aquesta vegada les cèl·lules amb concentracions creixents d'Ara-C amb combinació o no amb l'inhibidor de cN-II AdiS. La viabilitat cel·lular es va mesurar 72 h després de l'inici del tractament amb Ara-C. En els controls sense Ara-C es podia observar que tant AC220 com AdiS per separat tenien un efecte limitat sobre citotoxicitat (**Figura 61**) i la seva combinació millorava l'efecte. L'Ara-C sol va ser efectiu per a la disminució de la viabilitat cel·lular amb una IC_{50} de 9.96 μ M. La combinació d'AdiS amb citarabina millora l'efecte tot i que no es dona un canvi significatiu en la viabilitat (IC_{50} 7.4 μ M). Això és degut a que si s'inhibeix cN-II hi haurà menys inactivació d'Ara-C. Tot i la quimiorresistència que podíem anticipar pels resultats en els nivells d'expressió de

cN-II i ENT1 pel tractament amb AC220, es va observar l'efecte contrari en la viabilitat cel·lular ja que la combinació d'Ara-C i AC220 portava a un efecte sinèrgic que es traduïa en una disminució de l'IC₅₀ que en aquest cas era d'1.7 μ M. Aquest efecte es podria explicar per canvis en el cicle cel·lular relacionats amb el perfil d'expressió de gens determinat per FLT3-ITD. El tractament amb AC220 de cèl·lules amb FLT3-ITD disminueix els nivells de p21 i, en el context del silenciament de p21, les cèl·lules es tornen més sensibles a l'Ara-C (Abe et al. 2016) ja que aquest fàrmac depèn de l'activitat del cicle cel·lular per dur a terme el seu efecte. La inhibició de cN-II per part d'AdiS encara potenciava més l'efecte de la combinació d'Ara-C i AC220 (**Figura 61**) arribant a una IC₅₀ de 0.7 μ M. L'augment en la citotoxicitat es va observar sobretot a concentracions baixes de citarabina (0.25 – 1 μ M). Tot i que no la sinèrgia no era significativa (CDI < 0.7), els valors de CDI en aquest rang de concentracions eren 0.71 (0.25 μ M), 0.75 (0.5 μ M) i 0.77 (1 μ M).

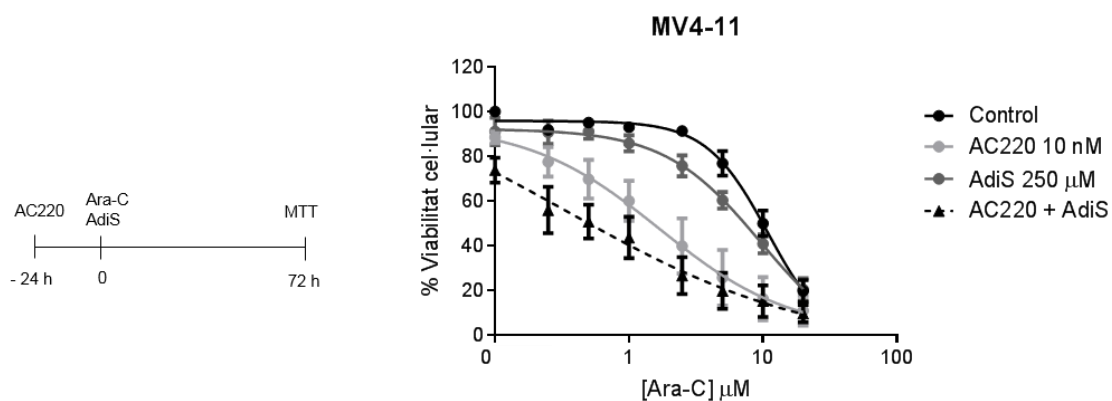


Figura 61. Paper de cN-II en la citotoxicitat d'Ara-C després del tractament amb AC220. Les cèl·lules MV4-11 es van pre-tractar amb 10 nM d'AC220 durant 24 h. Seguidament es van tractar amb concentracions creixents d'Ara-C, tot sol com a control o en combinació amb 250 μ M d'AdiS (inhibidor de cN-II). La viabilitat cel·lular es va mesurar per MTT 72 h després del tractament. Les dades estan representades com la mitjana \pm SEM de 4 experiments.

Com s'ha mencionat abans, SAMHD1 per la seva funció desoxinucleòtid trifosfat fosfohidrolasa pot inactivar l'Ara-C i així modular l'efecte d'aquest fàrmac en la viabilitat cel·lular. Per això, també es va decidir estudiar la relació entre FLT3 i SAMHD1 per determinar si el receptor tirosina quinasa podia regular l'expressió de SAMHD1 que podria tenir un paper en l'efecte de la combinació d'inhibidors d'FLT3 i Ara-C. Es va observar una correlació positiva entre la cohort estudiada en aquest treball i en la selecció de pacients amb alta expressió d'FLT3 (**Figura 62A**) el que suggeria una relació entre el receptor i SAMHD1.

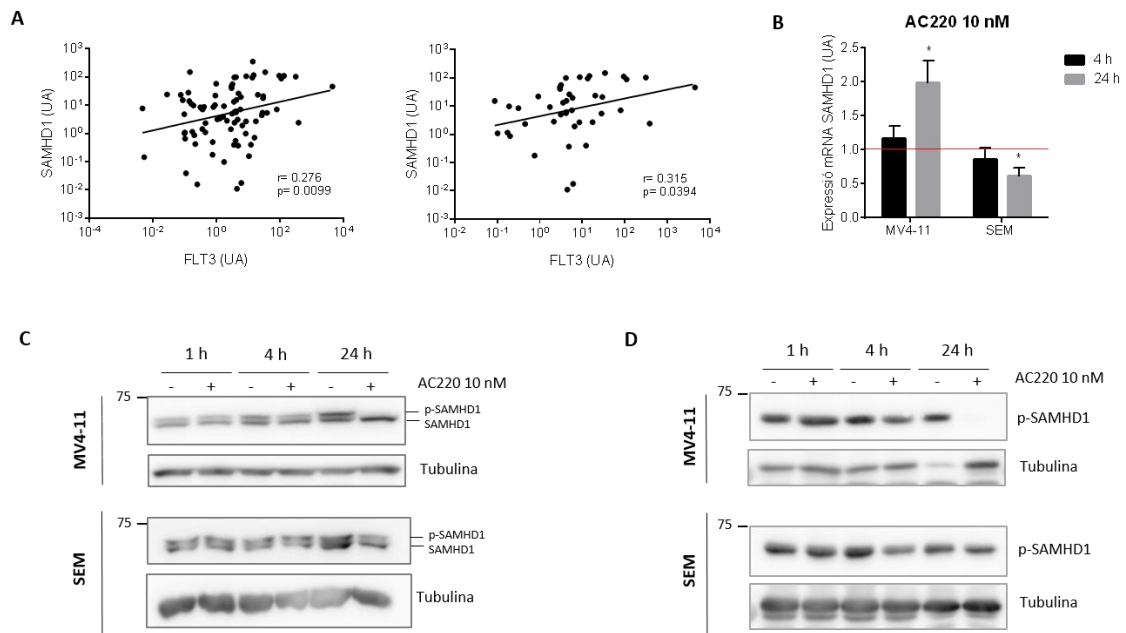


Figura 62. Regulació de SAMHD1 per FLT3. A) En mostres de pacients pediàtrics de leucèmia aguda es van analitzar els nivells d'mRNA de SAMHD1 respecte els nivells d'FLT3 en 86 mostres de la cohort ampliada (panell esquerre) i en les 50 mostres dels pacients amb subtipus de leucèmia amb major expressió d'FLT3 (panell dret). B) Les cèl·lules MV4-11 i SEM es van tractar durant 4 h i 24 h amb 10 nM d'AC220, es van analitzar els nivells relatius d'mRNA per RT-PCR i es van normalitzar al control de cada temps. Les dades representades són la mitjana de 3-4 experiments independents i s'ha realitzat t-student de dades aparellades * $p < 0.05$. C,D) MV4-11 i SEM es van tractar durant 1 h, 4 h i 24 h amb 10 nM AC220 (C) Els nivells de SAMHD1 es van mesurar en condicions d'electroforesi que permetien la separació de les bandes fosforilada (p-SAMHD1) i no fosforilada (SAMHD1) de SAMHD1. (D) Els nivells de p-SAMHD1 es van analitzar per WB amb l'anticòs contra la fosforilació Thr592 de SAMHD1.

La inhibició de l'activitat d'FLT3 per AC220 en la línia cel·lular MV4-11 va provocar un augment significatiu de SAMHD1 a les 24 h (**Figura 62B**). Però, en canvi, en la línia cel·lular SEM l'efecte va ser el contrari, es va donar una disminució dels nivells d'mRNA de SAMHD1. Degut a que aquestes resultats no ens van permetre determinar la relació entre FLT3 i SAMHD1 es va decidir analitzar els nivells de proteïna. Es va fer l'electroforesi de manera que es separessin les dues bandes de SAMHD1, la de més pes molecular correspon a la forma fosforilada de SAMHD1. La inhibició d'FLT3 per AC220 va resultar en la disminució de la forma fosforilada en les dues línies cel·lulars encara que diferien en la potència de l'efecte, en MV4-11 la banda corresponent a la forma fosforilada era pràcticament indetectable després de 24 h de tractament mentre que en SEM només es mostrava una disminució d'aquesta banda (**Figura 62C**). Aquests resultats es van confirmar amb l'ús de l'anticòs específic contra la fosforilació Thr592 de SAMHD1 (**Figura 62D**). Aquest anticòs reconeix una única banda que presentava els

mateixos canvis que la banda superior de l'experiment anterior confirmant que la banda de pes molecular superior corresponia a la forma fosforilada de SAMHD1.

Adicionalment, es va tractar la línia cel·lular THP-1 que presenta FLT3 WT amb una concentració 10 vegades superior d'AC220 (100 nM) que en les línies anteriors. En aquest cas no es va aconseguir modular la fosforilació d'FLT3 i, en conseqüència, tampoc es van modular els nivells de la forma fosforilada de SAMHD1 (**Figura 63**). Amb aquests resultats es pot afirmar que l'activitat d'FLT3 modula la fosforilació de SAMHD1 ja que els canvis de fosforilació del receptor FLT3 i de la forma fosforilada de SAMHD1 van en el mateix sentit, desapareixen en MV4-11, disminueixen en SEM i no es modulen en THP-1.

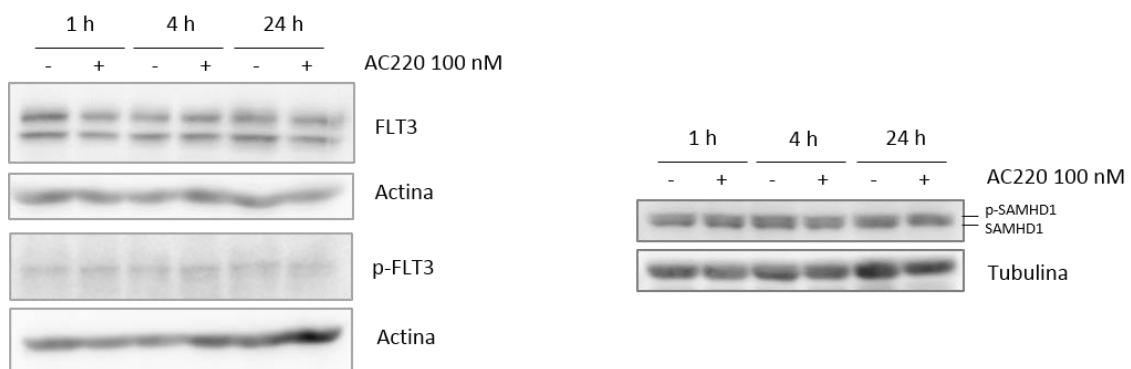


Figura 63. Efecte de la modulació d'FLT3 per AC220 sobre la fosforilació de SAMHD1 en THP-1. Les cèl·lules de leucèmia amb FLT3 WT, THP-1, es van tractar amb 100 nM d'AC220 durant 1 h, 4 h i 24 h. Es van analitzar per WB els nivells d'FLT3, p-FLT3 i les bandes fosforilada i no fosforilada de SAMHD1.

Per corroborar aquest efecte es va estudiar l'efecte de l'inhibidor d'FLT3 PKC412 en els nivells de fosforilació de SAMHD1. En aquest cas es va poder observar una disminució rellevant de la forma fosforilada (**Figura 64**).

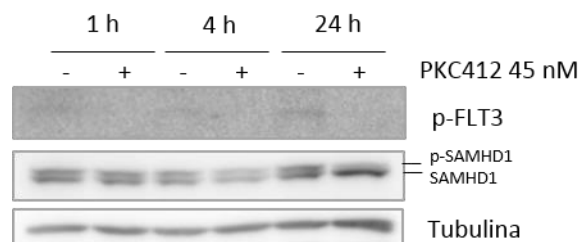


Figura 64. Efecte de la modulació d'FLT3 per PKC412 sobre la fosforilació de SAMHD1 en MV4-11. Les cèl·lules MV4-11 es van tractar amb 45 nM de PKC412 durant 1 h, 4 h i 24 h. Per WB es van analitzar els nivells de p-FLT3, SAMHD1 i p-SAMHD1.

SAMHD1 presenta un rol dual en el metabolisme d'àcids nucleics. Presenta activitat trifosfat hidrolasa que té un paper clau en la regulació dels *pools* de dNTPs i també té activitat nucleasa, que està relacionada amb el control de la infecció retroviral (Ballana

and Este 2015). SAMHD1 és fosforilat per la ciclina A2/CDK1 que està regulada pel cicle cel·lular (White et al. 2013; Cribier et al. 2013). La fosforilació de SAMHD1 impacta diferencialment en les seves funcions, perquè bloqueja la restricció viral, segurament per inhibició de l'activitat RNAsa, però manté la seva activitat dNTPasa (Ballana and Este 2015; White et al. 2013). A més, recentment s'ha observat que l'activitat fosfohidrolasa de SAMHD1 es manté durant la progressió del cicle cel·lular (Tramontozzi et al. 2018). Encara que les conseqüències funcionals i estructurals de la fosforilació de SAMHD1 han estat controvertides durant els últims anys, les últimes observacions afavoreixen la visió de que la inhibició d'FLT3 pot modular la fosforilació de SAMHD1, probablement degut a canvis en el cicle cel·lular. Fins a quin punt això tingui repercussió en els *pools* d'Ara-CTP, considerant que la forma no fosforilada de SAMHD1 manté l'activitat dNTPasa, queda per estudiar.

En la **Figura 65** es pot observar una representació esquemàtica dels canvis que s'observen en la via de recuperació de nucleòtids per l'acció d'AC220 dependent del context cel·lular estudiat.

En global, s'ha pogut observar que quan s'inhibeix FLT3 hi ha una regulació dels enzims del metabolisme de nucleòtids que portaria a una menor entrada (per la disminució d'ENT1) i a una major inactivació dels nucleòsids (per l'augment de cN-II i SAMHD1). Això podria ser degut al fet que amb aquesta inhibició s'atura la proliferació d'aquestes cèl·lules i no és necessari sintetitzar tants nucleòtids. Aquest fet perjudica l'efecte dels anàlegs de nucleòsids ja que aquests necessiten ser internalitzats a la cèl·lula i arribar a la forma de nucleòtid trifosfat per dur a terme la seva funció a nucli. Per això, és necessari tenir en compte aquests resultats a l'hora de decidir l'ordre d'administració dels fàrmacs, sent millor l'administració d'Ara-C en primer lloc, seguida dels inhibidors d'FLT3. En clínica s'està seguint aquest patró en el tractament dels pacients en combinació d'inhibidors d'FLT3 i quimioteràpia. Més enllà d'aquesta observació, aquests resultats els considerem molt rellevants perquè també alerten sobre la possibilitat que l'ús d'inhibidors de receptors tirosina quinasa en el tractament de neoplàsies pugui alhora impactar sobre el metabolisme de nucleòtids de manera que pugui alhora comprometre la resposta terapèutica davant de multiteràpies.

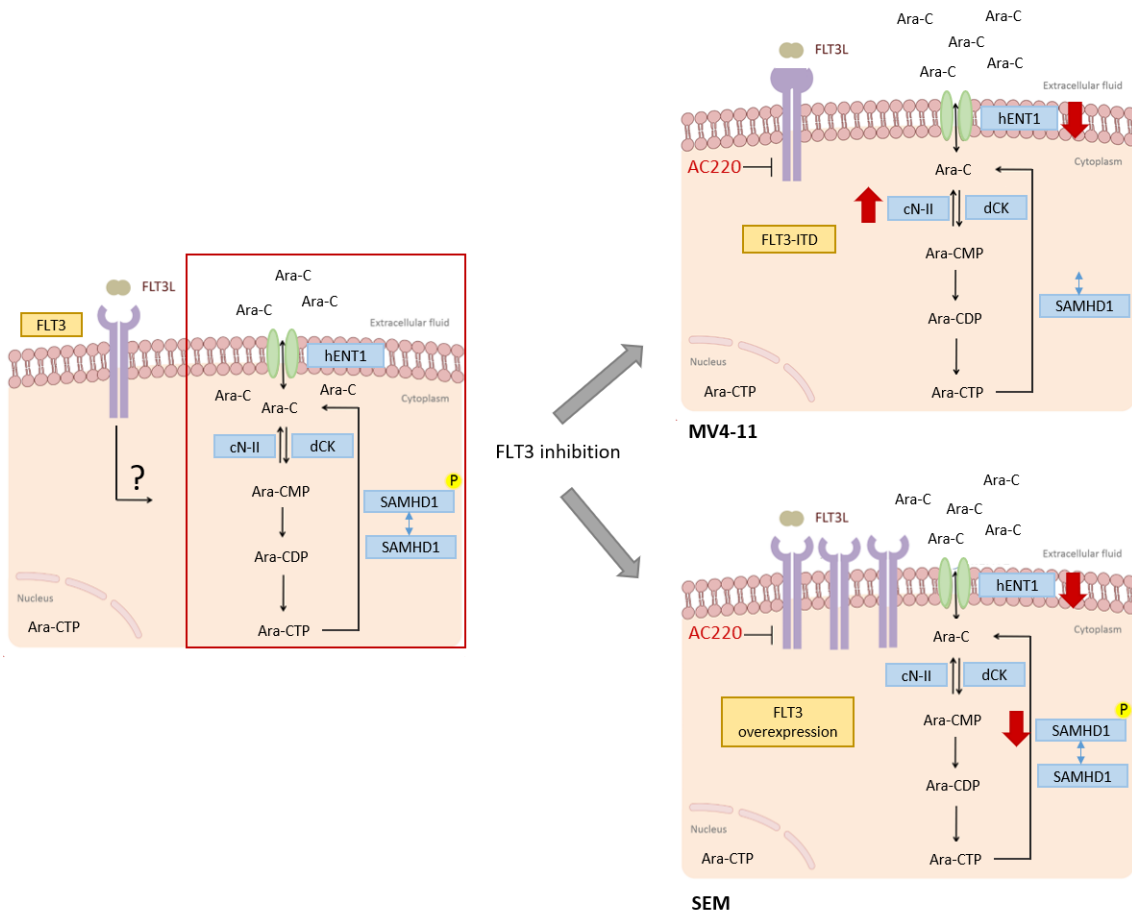


Figura 65. Modulació d'elements del metabolisme d'Ara-C per la inhibició d'FLT3. S'han introduït la inhibició d'FLT3 en combinació amb quimioteràpia com a manera de tractar LMA, d'aquí ha sorgit l'interès per la possible interacció entre els dos fàrmacs. Aquí s'ha estudiat l'efecte de la inhibició d'FLT3 per AC220 sobre elements del metabolisme de nucleòtids importants per a l'activació i desactivació d'Ara-C. S'han observat diferents efectes segons la línia cel·lular estudiada. En MV4-11 es va poder observar una disminució d'ENT1, un augment de cN-II i la desaparició de la forma fosforilada de SAMHD1. En SEM la repercussió va ser més lleu amb una disminució d'ENT1 i disminució de la forma fosforilada de SAMHD1 però sense que arribàs a desaparèixer. En global es van observar canvis que van en línia d'un empitjorament de l'efecte d'Ara-C després del tractament d'AC220. Per això, es recomana que primer s'administri l'Ara-C i seguidament AC220 (Perello-Reus et al. 2020).



DISCUSSIÓ GENERAL



DISCUSSIÓ GENERAL

El metabolisme de nucleòtids té un paper important en la proliferació cel·lular. Les poques metabolopaties descrites fins ara que afecten la síntesi *de novo* de nucleòtids generen quadres patològics que en general es desenvolupen a edats primerenques (Jurecka 2009), fet que reforça el concepte que el metabolisme de nucleòtids juga un paper imprescindible per al bon funcionament de l'organisme. També és rellevant en el desenvolupament del càncer, ja que s'ha vist que la desregulació dels nivells de nucleòtids, tant pel que fa a la seva quantitat total com a l'equilibri purines/pirimidines, provoca l'acumulació de mutacions que poden portar al desenvolupament de la malaltia (Mathews 2015).

Els enzims que conformen les vies de síntesi *de novo* i de recuperació es van descriure i caracteritzar fa molt de temps (Reichard 1988). Però, en canvi, els mecanismes de regulació d'aquests han estat poc estudiats fins al moment. En un inici es van fer estudis enzimàtics i es va descriure la regulació al·lostèrica d'aquests enzims, en general determinada pels propis nucleòtids. També es van descriure canvis en la regulació de la seva activitat quan la cèl·lula necessita més nucleòtids en situacions com la reparació del DNA o la proliferació, estant doncs la seva funció biològica lligada al cicle cel·lular (Eriksson et al. 2002; Reichard 1988). Per altra banda, els transportadors de nucleòsids, es van caracteritzar més tard. En un inici es van fer servir per estudis farmacològics però avui en dia també es consideren un element important en la biodisponibilitat de nucleòsids i nucleobases a més de presentar funcions addicionals (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2018a). Un altre punt que ens mostra la importància dels transportadors en la fisiologia humana és que es coneixen poques malalties on hi estiguin involucrats com a defecte primari, el que ens podria mostrar que són essencials. A més dels enzims de síntesi *de novo*, la maquinària de recuperació i control dels *pools* intracel·lulars de nucleòsids i nucleòtids també pot presentar mutacions, la qual cosa deriva també molt sovint en fenotips severos. En els darrers anys també s'han descrit noves proteïnes que presenten un paper important en el manteniment d'aquests *pools*, com és el cas de SAMHD1 (Goldstone 2011), les mutacions de la qual generen la síndrome d'Aicardi-Goutières i també s'han associat al procés oncogènic (Clifford et al. 2014; Rice et al. 2009).

Un altre enzim pel que estudis recents demostren funcions addicionals a la canònica prèviament descrita, és QDPR. S'ha vist que aquest enzim té un paper en la reparació de THF que ha patit un procés oxidatiu (Zheng et al. 2018). De fet, ja s'havia pogut observar alguna relació experimental entre els nivells de THF i QDPR en cervell (Pollock

and Kaufman 1978), tot i que el mecanisme que explicaria aquest lligam funcional no s'ha començat entendre fins fa molt poc. Aquest coneixement ha permès explicar el fenotip d'alteració dels nivells de folats en el sistema nerviós central de pacients amb mutacions a *QDPR* (Werner, Blau, and Thony 2011). A més, creiem que pel seu paper en el manteniment dels folats podria estar relacionat amb el metabolisme de nucleòtids tal i com ja s'ha vist per altres enzims de la via dels folats (Ben-Sahra et al. 2016).

Tanmateix, el coneixement de la regulació de les vies relacionades amb el metabolisme de nucleòtids es troba en termes generals poc desenvolupat, a diferència d'altres vies metabòliques també alterades en processos tumorals, com pot ser la glicòlisi, la regulació de la qual és àmpliament coneguda i es pot trobar fàcilment fins i tot en llibres de text. És per aquest motiu que s'ha generat interès en conèixer els elements que poden regular la síntesi de nucleòtids, sobretot mitjançant la via *de novo*, de manera dependent de senyals cel·lulars tant internes com externes (Villa et al. 2019). Aquesta regulació és important per tal d'entendre el desenvolupament del càncer per l'acció d'oncogens i supressors de tumors. S'ha observat la modulació de molts enzims implicats tant en la síntesi *de novo* com en la recuperació de nucleòtids per l'efecte de mutacions en p53 (Kollareddy et al. 2015). C-myc també promou canvis en les diferents vies de síntesi *de novo* de nucleòtids i dels seus precursors (Cunningham et al. 2014; Liu et al. 2008; Mannava et al. 2008).

A més, les proteïnes involucrades en el metabolisme de nucleòtids estan regulades per mTORC1, proteïna encarregada d'integrar senyals metabòliques i nutricionals per així regular un ampli ventall de funcions metabòliques necessàries per a la proliferació (Sabatini 2017). D'aquesta manera es poden modificar els nivells de nucleòtids per senyals que provenen de l'exterior com és el cas de la senyalització per receptors tirosina quinasa (dianes d'estímuls proliferatius), per alguns dels quals s'ha descrit que formen xarxes gèniques amb enzims del metabolisme de nucleòtids i també amb la maquinària de la reparació del DNA (Grane-Boladeras, Perez-Torras, et al. 2016). mTORC1 pot sensar els nivells disponibles de purines però no de pirimidines (Emmanuel et al. 2017; Hoxhaj et al. 2017). Aquest eix de transducció de senyals proliferatius i nutricionals pot regular les dues vies de síntesi *de novo* però de diferent manera. Actua de forma aguda sobre l'activitat de l'enzim de síntesi *de novo* de pirimidines CAD promovent la seva fosforilació i oligomerització (Ben-Sahra et al. 2013; Robitaille et al. 2013). En canvi, la regulació de la síntesi *de novo* de purines és més lenta i implica canvis en l'expressió de gens que generen precursors necessaris per a la via. A la vegada, mTORC1 pot regular la colocalització del purinosoma amb el mitocondri dependent de les necessitats de la cèl·lula (French et al. 2016), el que permet acostar

el purinosoma a la font de substrats de carboni, ja que el mitocondri és important per a la síntesi de folats. El purinosoma és un complex multiproteic que permet la canalització dels substrats i potencia l'eficiència metabòlica de la via (An et al. 2008). En un principi aquest concepte va presentar certa controvèrsia ja que s'havia treballat amb la sobreexpressió de les proteïnes que el formen però evidències més recents de formació del purinosoma depenent de les necessitats de la cèl·lula (Baresova et al. 2018) o la importància de la formació del purinosoma en la patologia de malalts que presenten mutacions en enzims de la síntesi *de novo* de purines (Baresova et al. 2012; Pelet et al. 2019) porta a confirmar la importància de la formació del complex en situacions fisiològiques.

Amb totes aquestes evidències s'han obert nous camps d'estudi dins el metabolisme de nucleòtids com és la formació de complexos proteics. En el nostre grup, s'ha descrit la interacció de l'enzim de la síntesi *de novo* de purines PAICS i l'enzim encarregat de la fosforilació d'adenosina ADK (tesi Dra. Liska Caviedes). Això permet introduir la idea de que no només poden estar en contacte enzims de la mateixa via sinó que s'amplia a la interacció de diferents vies dins el metabolisme de nucleòtids, el que demostra que la regulació d'aquests mecanismes és més global. A la vegada, ADK també pot interaccionar amb el transportador de nucleòsids CNT3 (tesi Dra. Olga Casulleras) de manera que els transportadors de nucleòsids també poden formar part d'aquestes xarxes proteiques.

Per ampliar el coneixement de l'interactoma del transportador CNT3, en el nostre grup s'han dut a terme en els darrers anys diferents assajos proteòmics per a detectar possibles proteïnes candidates a interaccionar amb el transportador. Aprofitant els resultats obtinguts i amb la hipòtesi de que els transportadors de nucleòsids poden formar part de xarxes proteiques que permeten la regulació dels nivells de nucleòtids, en aquest projecte s'ha estudiat la interacció de CNT3 amb les proteïnes VDAC1, ADK, SAMHD1 i QDPR.

La interacció de CNT3 amb VDAC1 no s'ha pogut confirmar, però no es pot descartar que formin part d'un mateix complex proteic. De fet, després de conèixer els resultats de MYTH on es va detectar com a proteïna candidata una subunitat de la tubulina es podria pensar que la interacció de VDAC1 i CNT3 no fos directa. Es coneix que VDAC1 interacciona amb la tubulina i que aquesta en regula l'activitat de transport de nucleòtids d'adenina (Rostovtseva et al. 2008). Podria ser que la tubulina interaccionés de manera directa amb CNT3 i que a la vegada també es pogués unir a VDAC1 i així la tubulina

podria regular de manera coordinada la permeabilitat de nucleòsids i nucleòtids d'adenina.

La interacció de CNT3 amb ADK es va validar per la Dra. Olga Casulleras en la seva tesi i s'ha seguit estudiant aquí, afegint l'estudi de la isoforma llarga d'ADK. A més, també s'ha estudiat la interacció amb SAMHD1 i amb QDPR. Per coimmunoprecipitació s'ha pogut determinar la interacció de cada una de les tres proteïnes amb CNT3 tot i que no s'ha determinat baix quines condicions fisiològiques es donen aquestes interaccions que podrien ser transitòries. En algun cas podria ser que CNT3 presenti la unió de cada una d'aquestes proteïnes en situacions fisiològiques diferents o que uneixi més d'una d'aquestes proteïnes a la vegada. Per això, també és important determinar el lloc d'unió de cada una de les proteïnes amb el transportador. Les proteïnes identificades amb el GST *pull down* haurien d'interaccionar amb la cua N-terminal i les descrites per MYTH poden interaccionar amb qualsevol part intracel·lular del transportador. Concretament, en el cas d'ADK s'ha vist que la interacció no es dona en els 10 primers aminoàcids de la cua N-terminal. I per SAMHD1 s'ha vist que la interacció semblaria dependre de situacions fisiològiques concretes ja que es produiria quan la cèl·lula ha acabat de duplicar el DNA i s'està dividint, moment en que SAMHD1 està duent a terme la seva activitat trifosfohidrolasa per disminuir els nivells de dNTPs que la cèl·lula no ha fet servir (Franzolin et al. 2013).

Amb aquestes interaccions podem veure que CNT3 podria ser un nexa d'unió de proteïnes de diferents vies implicades en el metabolisme de nucleòtids o en l'abastiment de precursors per a la síntesi d'aquests. Per això seria interessant poder estudiar les interaccions *in vivo* modificant les necessitats de la cèl·lula o modificant elements de les diferents vies per veure com reaccionaria cada una d'aquestes interaccions. En la pràctica això implicaria realitzar experiments on es modulés la disponibilitat extracel·lular de nucleòsids, en condicions d'inhibició o no de les vies de recuperació (per exemple inhibint els transportadors ENTs amb dipiridamol) o alterar l'equilibri purines/pirimidines mitjançant la inhibició d'enzims de les vies de síntesi *de novo*. En aquestes condicions, es podria fer servir un mètode com el NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) (Dixon et al. 2016) que consisteix en fusionar cada una de les proteïnes d'interès amb una subunitat d'una proteïna que emet fluorescència. Quan la interacció es dona es pot detectar el senyal de manera que es pot estudiar la dinàmica de la interacció. També es podria complementar amb la tècnica de microscòpia FRET (*Förster resonance energy transfer*) el que permet l'estudi de la interacció per microscòpia de manera que també es podria determinar la localització de la interacció baix cada una de les condicions. Aquest punt és interessant ja que, com s'ha pogut veure en els resultats d'aquest treball,

la localització de CNT3 podria ser més àmplia que no només a membrana plasmàtica. La interacció de CNT3 amb ADK s'ha pogut veure propera al nucli i a membrana plasmàtica. A més, la interacció amb la isoforma d'ADK sembla que faria que CNT3 es mantenis en major mesura proper al nucli. Per altra banda, la interacció de CNT3 amb QDPR s'ha observat a l'interior cel·lular, a un òrganul per determinar. Podria ser lisosoma on es duu a terme la degradació de diverses macromolècules entre les que hi ha els àcids nucleics i per la importància dels lisosomes quan mTORC1 està actiu (Sabatini 2017). S'ha descrit la presència d'ENT3 en aquest orgànul i està relacionat amb la regulació dels nivells d'adenosina (Nair et al. 2019). La interacció de CNT3 amb SAMHD1 es dona de manera més difusa a l'interior cel·lular ja que s'ha pogut observar en un moment en que la cèl·lula s'està dividint i el nucli està desestructurat. A part de que es pugui trobar CNT3 en altres localitzacions tampoc es pot descartar l'existència d'altres isoformes de CNT3, que CNT3 presenti modificacions posttraduccionalmentals o que pateixi algun procés de proteòlisi ja que en els western blots s'ha pogut observar una banda de menor pes molecular que, a més, pareix coimmunoprecipitar amb QDPR.

Una limitació important en l'estudi d'aquestes interaccions és que l'expressió de CNT3 es perd quan les cèl·lules estan en cultiu. A més, CNT3 és característic d'epitelis polaritzats de manera que treballar amb cèl·lules més desdiferenciades pot fer que CNT3 no es trobi en la localització fisiològica. Pel que ens podríem plantejar l'opció de dur a terme els experiments de les interaccions en models cel·lulars polaritzats que permeten la correcta localització del transportador (Fernandez-Calotti et al. 2016). Tot i així s'ha de tenir en compte que no totes les cèl·lules es poden polaritzar i per tant, ens hauríem de replantejar el model d'estudi. Una altra opció seria la generació d'esferoides que aconseguen mimetitzar algunes de les característiques dels epitelis diferenciats, on recentment hem aconseguit induir l'expressió i la translocació de CNT1 a la membrana plasmàtica (tesi Clara Boces).

Tot i en cap dels casos està clar la interacció es doni a la membrana plasmàtica, s'ha estudiat la influència de la transfecció de cada una d'aquestes proteïnes sobre l'activitat de CNT3. Ni per la sobreexpressió d'ADK ni de QDPR s'han observat canvis en el transport de CNT3 per cap dels nucleòsids estudiats tot i que en el cas de QDPR s'ha observat un augment en l'expressió de CNT3. En canvi, pel silenciament de SAMHD1 es va poder observar una disminució en el transport d'uridina per part de CNT3 en la línia cel·lular HEK-CNT3. El canvi en l'activitat de transport es podria donar perquè la interacció de SAMHD1 amb CNT3 inhibís directament l'activitat del transportador. Aquesta acció no es pot descartar tot i que és poc probable que l'acció es pogués observar en les cèl·lules en cultiu sense sincronitzar ja que el percentatge de cèl·lules

en divisió (moment on es va poder observar la colocalització de CNT3 i SAMHD1) és molt baix i l'efecte podria no apreciar-se. El canvi en els nivells de transport tampoc es dona per canvis transcripcionals ja que el CNT3 que es sobreexpressa no presenta regions reguladores que han de ser pròpies del gen *SLC28A3*. Tanmateix, la caiguda d'activitat que es va observar podria ser deguda a un canvi de localització de la proteïna tot i que per immunofluorescència no sembla que CNT3 es localitzàs menys a membrana plasmàtica. Podria ser que els transportadors de nucleòsids es modulin de manera ràpida per fosforilació i que això tinguin un efecte en l'activitat. La fosforilació s'ha descrit en el cas dels transportadors equilibratius (Grane-Boladeras et al. 2019; Reyes et al. 2011) però fins al moment no s'ha demostrat en CNTs. Una altra opció interessant seria que hi hagués una regulació de l'oligomerització del transportador. La forma trimèrica de CNT3 és crítica per a la seva estabilitat i, per tant, per a la seva funció biològica. Aparentment, la trimerització escurça el cicle de translocació dels nucleòsids de manera que s'accelera el seu transport (Stecula et al. 2017). Com a reguladors al·lostèrics podríem trobar els nucleòsids o els nucleòtids els nivells dels quals es veuen alterats per l'expressió de SAMHD1. Amb el silenciament de SAMHD1 es donarà una disminució dels nivells de nucleòsids i un augment dels nucleòtids. Una opció podria ser que l'element que regula al·lostèricament el transportador siguin els dNTPs. Arribat a uns nivells de dNTPs s'inhibiria l'acció de CNT3 ja que no faria falta l'entrada de més nucleòsids que una vegada metabolitzats arribarien a ser dNTPs, de manera que cabria la possibilitat de que CNT3 estigui inhibit pel producte final de la via de recuperació. Per conèixer la identitat dels reguladors al·lostèrics, en cas de que hi siguin, faria falta fer més comprovacions on es puguin canviar els nivells de nucleòtids intracel·lulars per acotar el possible actor d'aquest efecte així com conèixer l'estructura de la proteïna tot i que fins al moment no s'ha aconseguit cristal·litzar.

En el cas d'ADK també s'afavoriria la generació de nucleòtids i, en canvi, no s'han pogut observar canvis en l'activitat de CNT3 amb assajos de transport. Tot i així s'ha de tenir en compte les limitacions que presenta la mesura del transport en cèl·lules en monocapa ja que en estudis electrofisiològics en oòcits es va veure un augment de l'afinitat del transportador per adenosina degut a l'acció d'ADK. Els assajos de transport només permeten la detecció de l'efecte sobre l'activitat del transportador si es dona a nivell de membrana plasmàtica ja que la mesura es fa amb les cèl·lules en cultiu. Si el canvi d'activitat es dona a un altre òrganul aquest no es detectaria. Per altra banda, la tècnica pot tenir un problema de sensibilitat per detectar petits canvis. Degut a això, no es pot descartar que QDPR tingui un efecte sobre l'activitat de CNT3 que no s'hagi pogut detectar per assajos de transport i seria interessant estudiar l'efecte en oòcits.

Tots aquests experiments de mesura de l'activitat del transportador es van fer mitjançant la sobreexpressió d'aquest i això pot mostrar limitacions en aquest estudi. Per això, en el cas de SAMHD1 s'ha aprofitat el fet que els monòcits derivats de macròfags presenten activitat endògena dels transportadors de nucleòsids (Minuesa et al. 2008) de la mateixa manera que s'hi expressa SAMHD1. Amb la modulació dels nivells de SAMHD1 per l'acció de la proteïna viral Vpx s'han pogut observar variacions en l'expressió a nivell d'mRNA i en l'activitat dels transportadors. El canvi és més heterogeni però també s'ha de tenir en compte la variabilitat inter-individual entre donants que es pot observar en l'expressió dels transportadors. Això ja s'havia pogut observar en altres aproximacions amb donants (Molina-Arcas et al. 2003). Per ampliar l'estudi es podria analitzar l'efecte de la modulació dels nucleòtids intracel·lulars mitjançant la modulació per d'altres enzims. Els canvis en el transport de citidina mediat per CNTs es poden entendre pel canvi en l'expressió d'aquests que es dona per la disminució de SAMHD1. Mentre que, en el cas dels ENTs s'observa un augment en l'expressió que no es reflecteix en una variació en l'activitat. Els canvis en l'expressió podrien ser deguts a alguna isoforma del transportador, ja que en el cas d'ENT2 se'n coneixen a nucli (Grane-Boladeras, Spring, et al. 2016). Estudiar aquest fet seria interessant ja que s'ha de tenir en compte que SAMHD1 és una proteïna nuclear el que la podria relacionar directament amb els transportadors que s'expressen a membrana nuclear.

A part de l'efecte que pot tenir la sobreexpressió de les proteïnes d'interès sobre l'activitat de CNT3 també s'ha estudiat quin efecte té la sobreexpressió de CNT3 en el metabolisme de la cèl·lula. S'han pogut observar canvis en 5-MTHF i un gran nombre d'aminoàcids així com també en alguns derivats de purines i pirimidines. Aquests canvis poden venir determinats per l'efecte dels nucleòtids dins la cèl·lula així com per la relació de CNT3 amb diverses proteïnes com és el cas d'ADK i QDPR que hem estudiat aquí. En concret, l'expressió de CNT3 provoca augments en els nivells de 5-MTHF i de metionina que poden estar relacionats amb les reaccions de transmetilació on ADK té un paper important en la regulació dels nivells d'adenosina (Boison et al. 2002). I QDPR també hi té un paper a través de la relació del cicle dels folats amb el cicle de la metionina. Es pot veure que CNT3 pot induir canvis en metabòlits que modifiquin algunes vies que també estan relacionades amb les proteïnes d'interacció del transportador. Valdria la pena fer un estudi metabolòmic dels canvis que provoca la sobreexpressió de CNT3 per conèixer les vies afectades pel canvi dels nivells del transportador. Es podrien anticipar canvis en els nivells de nucleòtids, aminoàcids i productes de les reaccions de metilació com SAH i SAM. També seria interessant

estudiar els efectes en combinació d'ADK o QDPR per determinar si els nivells d'aquestes proteïnes també estan relacionats amb aquest fenotip metabòlic.

L'aparent regulació de vies importants en el fetge com és la transmetilació ens porta a pensar la possibilitat d'estudiar les interaccions en aquest òrgan. S'ha de tenir en compte que l'expressió de CNT3 no s'ha pogut observar en hepatòcits en cultiu però s'ha pogut detectar nivells baixos d'mRNA (Urtasun et al. 2017). Tot i les dificultats metodològiques, potser es podria ampliar l'estudi a fetge per la importància fisiològica d'aquestes vies a nivell hepàtic. A més, en el cas de QDPR també es podria estudiar la interacció en endoteli ja que els nivells de BH₄ són importants per a la regulació de la síntesi d'òxid nítric (ON) que és clau en la regulació del teixit endotelial, el qual a la vegada també presenta regulació purinèrgica. En cèl·lules precursors d'endoteli s'ha observat la presència de transportadors equilibratius i, mitjançant la diferenciació, s'observa una disminució d'ENT1 i un augment de CNT3 (Guzman-Gutierrez et al. 2010).

Al llarg d'aquest projecte s'han pogut veure alguns casos on l'expressió d'una proteïna regula els nivells d'mRNA d'una altra com és el cas del silenciament de SAMHD1 en macròfags o la sobreexpressió dels transportadors o QDPR en HEK293. Això pot ser degut a que els substrats o productes que s'acumulen per la sobreexpressió de la proteïna en qüestió activin vies de senyalització que influeixin els altres gens. En aquest sentit cal tornar a tenir en compte el concepte abans esmentat que elements del metabolisme de nucleòtids i transportadors poden formar part de xarxes gèniques possiblement coregulades (Grane-Boladeras, Perez-Torras, et al. 2016). Tampoc es pot descartar que la manipulació d'elements d'aquesta xarxa pugui impactar en senyals extracel·lulars de tipus purinèrgic, mediats pels propis nucleòtids i l'adenosina. A més, en tant que el nostre propi grup ha descrit que en aquestes xarxes també s'hi inclouen receptors de factors de creixement, aquest és un element més a tenir en compte cara a entendre els mecanismes responsables d'aquestes interaccions.

És precisament en aquest context, en el qual cal reflexionar sobre la possibilitat que aquesta complexa regulació del metabolisme de nucleòtids que també respon a senyals externs (p.e. lligands de factors de creixement) pugui estar condicionant el tractament del càncer, especialment en teràpies combinades que són freqüents. No només és comú l'ús d'anàlegs de nucleòsids que depenen de les vies de recuperació de nucleòsids naturals per a la seva activació, si no que també, en alguns casos, es combinen amb inhibidors de receptors de factors de creixement, com és el cas de la teràpia combinada d'inhibidors d'FLT3 i l'anàleg de nucleòsids Ara-C en el tractament d'LMA. En un treball recent del nostre grup es va definir la regulació d'ENT1 pel receptor FLT3 en cèl·lules

de leucèmia aguda. En aquesta tesi s'ha ampliat a altres elements del metabolisme de nucleòtids. En mostres d'mRNA de pacients pediàtrics de leucèmia aguda s'ha observat una correlació positiva d'FLT3 i els enzims del metabolisme de nucleòtids dCK, cN-II i SAMHD1. Per estudiar la relació d'aquestes proteïnes s'ha treballat amb dues línies cel·lulars amb diferents alteracions d'FLT3 que es poden trobar en pacients (sobreeexpressió d'FLT3 en la línia cel·lular SEM i la mutació FLT3-ITD en la línia cel·lular MV4-11). Amb els nostres resultats hem vist que FLT3 pot regular d'alguna manera els enzims del metabolisme de nucleòtids però amb resultats diferents dependent de la línia cel·lular. La variabilitat de resposta en funció de la línia es pot explicar en part, perquè la mutació FLT3-ITD s'associa a un patró transcriptòmic que li és propi (Cauchy et al. 2015). Encara que un altre factor que pot contribuir a la variabilitat en els resultats és la capacitat endògena de secretar FLT3L que presenten aquestes línies cel·lulars. Aquest fet podria emmascarar l'efecte de l'inhibidor d'FLT3 (Zheng et al. 2004). En la línia cel·lular MV4-11, per la inhibició d'FLT3 per part d'AC220 s'ha pogut veure una augment de l'expressió de cN-II i de SAMHD1, la qual cosa podria portar a la quimiorresistència d'Ara-C quan es combina amb AC220. De totes maneres, per la combinació dels dos fàrmacs s'ha pogut veure sinèrgia que podria venir determinada per l'acció d'AC220 sobre el cicle cel·lular (Abe et al. 2016). Tot i així, per la inhibició de cN-II s'ha pogut augmentar la citotoxicitat dels fàrmacs a baixes dosis d'Ara-C, demostrant que cN-II també hi juga un paper. També s'ha pogut observar una disminució en la forma fosforilada de SAMHD1 que està relacionada amb la restricció viral, així com s'ha pogut veure pel canvi de fosforilació de SAMHD1 provocat per PKC412 (Garcia-Vidal et al. 2019). No obstant, no està clar que el canvi de fosforilació pugui provocar alteracions en l'activitat trifosfohidrolasa (Ballana and Este 2015; White et al. 2013) que és la que genera la resistència a Ara-C degut a la defosforilació de la forma activa Ara-CTP. SAMHD1 es regula per fosforilació al llarg del cicle cel·lular però manté l'activitat trifosfohidrolasa durant les diferents fases del cicle cel·lular (Tramentozzi et al. 2018; Cribier et al. 2013).

Encara que s'havia vist la correlació positiva de FLT3 amb els enzims del metabolisme de nucleòtids en els pacients de leucèmia aguda, en les línies cel·lulars no s'han confirmat aquests resultats tot i que sí s'ha vist que estan relacionats. S'ha de tenir en compte que les mostres clíniques mostren un estat estable en els pacients en el moment del diagnòstic. Una situació que és difícil de mimetitzar en cèl·lules que es tracten durant temps curts. En conjunt, aquests resultats mostren que modulant l'activitat del receptor FLT3 es poden modificar elements del metabolisme de nucleòtids, el que podria afectar a la disponibilitat i activació d'Ara-C. La FDA i l'EMA han aprovat la utilització de

l'inhibidor d'FLT3 PKC412 en combinació amb Ara-C i daunorubicina, administrant primer l'inhibidor del receptor (Kim 2017). En el mateix sentit, s'estant portant a terme assajos clínics amb AC220 (Daver et al. 2019). Amb els resultats que s'han generat en aquesta tesi queda de manifest la importància de l'ordre de l'administració dels fàrmacs per assegurar que la inhibició d'FLT3 no pugui causar problemes en l'efecte d'Ara-C. Això demostra la rellevància d'estudiar els mecanismes de regulació del metabolisme de nucleòtids per receptors tirosina quinasa considerant que les cèl·lules tumorals presenten reprogramació metabòlica.

En global, hem observat que es poden formar complexos proteics que interrelacionen les diferents vies de la síntesi de nucleòtids el que ens pot suggerir que poden treballar de manera coordinada per aportar els substrats necessaris per la cèl·lula per dur a terme la generació dels nucleòtids per al correcte funcionament de la cèl·lula. A més, en processos tumorals es pot veure una desregulació d'aquests elements degut a l'adaptació que pateix la cèl·lula en la nova situació i això es pot aprofitar per aconseguir dianes específiques per aquestes cèl·lules sense afectar a les sanes. De manera que el coneixement de la relació entre aquestes vies també pot servir per millorar el tractament. Ja sigui ampliant el ventall de dianes disponibles o mitjançant la introducció de teràpies combinades que puguin aprofitar la regulació del metabolisme de nucleòtids per afavorir l'efecte dels anàlegs de nucleòsids.



CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

1. Les dues isoformes d'ADK: ADK-S i ADK-L interaccionen amb CNT3 de forma intracel·lular en models cel·lulars no polaritzats. En aquestes condicions, la sobreexpressió d'ADK-S no afecta la funció de CNT3 a la membrana plasmàtica. La interacció es manté quan es treballa amb la proteïna truncada de CNT3 en la zona N-terminal $\Delta 10$.
2. La interacció entre SAMHD1 i CNT3 sembla dependent de la fase del cicle cel·lular G2/M. Aquestes proteïnes també presenten una relació funcional ja que la disminució dels nivells de SAMHD1 provoca canvis en els nivells dels transportadors de nucleòsids així com en la seva activitat.
3. CNT3 pot interaccionar amb QDPR. A més, la sobreexpressió de CNT3 provoca canvis en els nivells de diversos derivats de purines i pirimidines, en 5-MTHF i aminoàcids, el que pot anticipar una relació funcional amb QDPR sense variar els nivells d'mRNA d'aquesta proteïna. En el sentit contrari, per la sobreexpressió de QDPR es donen canvis en els nivells dels CNTs relacionats amb la translocació de pirimidines.
4. En pacients pediàtrics de leucèmies agudes, els nivells d'mRNA del receptor tirosina quinasa FLT3 correlacionen positivament amb els enzims del metabolisme de nucleòtids dCK, cN-II i SAMHD1. La inhibició d'FLT3 amb AC220 o l'activació amb FLT3L, modulen el metabolisme de nucleòtids. La inhibició d'FLT3 induïx l'expressió de cN-II i SAMHD1 en la línia cel·lular MV4-11. D'acord amb això, la inhibició de cN-II amb AdiS es tradueix en una millora de l'efecte citotòxic de la combinació d'AC220 a baixes dosis d'Ara-C. A la vegada, la inhibició d'FLT3 també disminueix la fosforilació de SAMHD1.
5. Els resultats d'aquest treball suggereixen que existeixen xarxes proteïques que permeten regular coordinadament diferents elements implicats en el metabolisme de nucleòtids. A més, hi ha fàrmacs que poden modular l'expressió i activitat d'aquestes proteïnes pel que és important tenir en compte aquest coneixement per millorar l'eficiència de tractaments com és el del càncer.



MATERIALS I MÈTODES



MATERIALS I MÈTODES

1. Cultiu cel·lular

El cultiu cel·lular consisteix en el manteniment de cèl·lules fora de l'organisme (*in vitro*) en condicions fisiològiques. Es pot distingir entre cultius primaris i línies cel·lulars.

Els cultius primaris són cèl·lules que provenen d'un teixit original sense modificacions, disgregades en el cas de provenir d'un teixit sòlid. Aquests cultius presenten una sèrie de limitacions com és la dificultat d'obtenció de la mostra (pacients o animals) i la capacitat de divisió limitada ja que al poc temps entren en senescència. Les línies cel·lulars, en canvi, es generen mitjançant la immortalització de les cèl·lules, el que els dona una capacitat il·limitada de proliferació i fa més assequible la seva utilització al laboratori. S'ha de tenir en compte que tot i ser una bona eina, perden certes característiques (com el control de la proliferació) i al llarg del temps poden acumular mutacions.

1.1. Manteniment dels cultius

Per treballar amb cultius cel·lulars s'han de mantenir condicions d'esterilitat per evitar possibles contaminacions per microorganismes. Es treballa en campanes de flux laminar, tot el material que entra dins és estèril i es ruixa amb etanol al 70% just abans de ser introduït dins la campana. Les línies cel·lulars que s'han fet servir en aquesta tesi es mantenen en incubadors amb condicions controlades: temperatura de 37 °C, 5% CO₂ i humitat relativa del 95%. Creixen en medi de cultiu suplementat amb sèrum fetal boví (FBS) que aporta factors circulants i micronutrients necessaris pel correcte creixement de les cèl·lules i amb antibiòtics per evitar contaminacions bacterianes.

Depenent del seu origen, les cèl·lules poden créixer adherides a un suport formant una monocapa o en suspensió. Les cèl·lules es divideixen i arriben a una confluència (monocapa) o densitat cel·lular (suspensió) que fan necessaris el replaqueig d'una part del cultiu perquè pugui seguir creixent. A aquest procés se l'anomena passatge i variarà depenent del tipus de cèl·lules amb què es treballa.

1.1.1. Passatge de cèl·lules en monocapa

Per desadherir les cèl·lules es duu a terme la tripsinització, mètode enzimàtic que permet debilitar i rompre les unions cèl·lula-cèl·lula. Es fa servir una combinació de tripsina i àcid etilendiamintetraacètic (EDTA), enzim proteolític del grup de les serina proteases i un quelant de Ca²⁺, respectivament.

Per tripsinitzar les cèl·lules s'aspira el medi de cultiu amb una pipeta Pasteur i es fa un rentat amb PBS autoclavat (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.4 mM y Na_2HPO_4 4.3 mM, pH 7.4) per treure les restes de FBS que pot interferir en l'acció de la tripsina. Una vegada aspirat el PBS s'afegeix tripsina a 37°C que cobreixi tota la superfície del cultiu. La placa es manté a l'incubador fins que les cèl·lules es comencen a deshadir.

Passat el temps necessari (variable depenent de la línia cel·lular) s'afegeix com a mínim el mateix volum de medi amb FBS, prèviament atemperat, per aturar l'acció de la tripsina. Es disgreguen les cèl·lules amb una pipeta de plàstic i s'afegeix 1 mL de la dilució de cèl·lules a una altra placa amb 9 mL de medi fresc. Es farà la dilució necessària perquè les cèl·lules estiguin a la confluència desitjada al cap d'uns 3 o 4 dies. A més, cada dos dies es canviarà el medi de cultiu.

1.1.2. Passatge de cèl·lules en suspensió

En aquest cas, les cèl·lules s'han de diluir a la densitat desitjada.

Es disgreguen les cèl·lules amb una pipeta de plàstic ja que en alguns casos formen agregats, es contenen, es passa el volum necessari a un tub i es centrifuga a 900 rpm durant 6 minuts. S'aspira el medi, les cèl·lules es resuspenen en 10 mL de medi fresc i es passen a un flascó. Al cap de dos dies es tornen a afegir 10 mL de medi i passats 3 o 4 dies es fa un nou passatge.

1.2. Comptatge i sembra

Tant per sembrar els experiments com per fer el passatge de les cèl·lules en suspensió, és necessari dur a terme el comptatge de les cèl·lules. Es fa mitjançant la cambra de Neubauer i la tinció de blau tripà que permet distingir entre les cèl·lules vives i les mortes degut a la permeabilitat d'aquestes darreres que adquiriran una tonalitat blavosa.

S'afegeixen 10 μL de medi de cultiu amb les cèl·lules a 10 μL de blau tripà, 10 μL d'aquesta mescla es col·loquen a la cambra de Neubauer i es compten al microscopi. Per calcular el nombre de cèl·lules per mL s'ha de desfer la dilució i tenir en compte la superfície i profunditat de la cambra.

Una vegada comptades, es prepara una dilució de les cèl·lules en medi fresc i es posa el volum necessari depenent de la superfície de la placa que es fa servir. El nombre de cèl·lules varia depenent de la línia cel·lular degut a que la mida i la taxa de divisió de les cèl·lules pot variar entre línies.

1.3. Criopreservació i descongelació

Quan es treballa amb línies cel·lulars és necessari tenir en compte el número de passades de les cèl·lules ja que al llarg del temps es poden acumular mutacions el que pot donar canvis fenotípics a les cèl·lules i això pot afectar a la reproductibilitat dels experiments. Per això és necessari mantenir un estoc de cèl·lules amb un nombre baix de passades congelades en nitrogen líquid. Per assegurar la viabilitat cel·lular després de la congelació es fan servir agents criopreservadors com el dimetilsulfòxid (DMSO).

Per la criopreservació, en el cas de les cèl·lules en monocapa es tripsinitza i centrifuga una placa confluent de 10 mm de diàmetre a 1200 rpm durant 4 minuts. Per les cèl·lules en suspensió es centrifuguen entre 3 i 5 milions de cèl·lules a 900 rpm durant 6 minuts. Una vegada centrifugades s'aspira el medi i es resuspenen en 1.5 mL d'FBS estèril amb un 10% de DMSO. Es passa a un criovial que es col·loca en un tanc d'isopropanol al congelador a -80°C . El tanc d'isopropanol permet que la congelació es doni de manera progressiva (1°C per minut), es poden mantenir aquí entre 4 hores i un mes, per conservar-les un temps més llarg s'han de passar a un tanc de nitrogen líquid.

El procés de descongelació s'ha de fer de manera ràpida ja que el DMSO és tòxic per les cèl·lules. Es col·loca el criovial en el bany a 37°C fins que està totalment descongelat, es passa el volum a un tub que conté medi fresc i es centrifuga amb les mateixes condicions que en la criopreservació. S'aspira el medi que també conté DMSO i es resuspenen les cèl·lules en medi nou i es passen a una placa o flascó.

1.4. Test de micoplasma

La contaminació per micoplasma varia l'expressió de gran quantitat de gens, entre ells els transportadors de nucleòsids, en les cèl·lules infectades pel que es poden modificar les característiques de les cèl·lules i afectar als resultats. És un microorganisme resistent als antibiòtics que es fan servir de manera habitual en cultiu cel·lular i que és pràcticament indetectable al microscopi òptic.

Per analitzar la presència de micoplasma al cultiu cel·lular es recull medi que ha estat en contacte amb les cèl·lules dos o tres dies, es realitza una reacció en cadena de la polimerasa (PCR) de 35 cicles (desnaturalització a 94°C durant 1 min, *annealing* a 55°C durant 1 min i elongació a 72°C durant 1 min 30 s) amb primers específics pel genoma del micoplasma (Fw: GGCGAATGGGTGAGTAACACG; Rv: CGGATAACGCTTGCGACTATG) i es corre un gel d'agarosa per detectar la presència o absència del DNA. Aquest test es realitza cada dues setmanes i en el cas de que sigui positiu es tracten les cèl·lules amb PlasmocinTM a una concentració de 25 mg/mL.

1.5. Inactivació del sèrum

Les cèl·lules en suspensió es mantenen en medi suplementat amb FBS inactivat. Mitjançant l'exposició a calor s'inactiva el sistema del complement que podria afectar negativament a aquestes línies cel·lulars. Per inactivar l'FBS es col·loca en un bany a 56 °C durant 30 minuts agitant de tant en tant perquè la temperatura sigui homogènia.

1.6. Dialització del sèrum

S'ha fet servir sèrum dialitzat per aconseguir medi amb depleció de nucleòsids. Per això s'utilitza la membrana de diàlisi Spectra/Por™ 3 amb pors de 3.5 kDa que permeten el pas de les molècules amb un pes molecular inferior, entre les que hi trobem els nucleòsids.

Per dialitzar el sèrum, s'hidrata la membrana, s'emplena amb 50 mL de sèrum inactivat i es tanca. Seguidament, la membrana es deixa en flotació en aigua de l'aixeta, es manté en agitació constant a 4 °C durant 24 h, canviant l'aigua unes 2-3 vegades. Passat aquest temps, es reestableix l'equilibri iònic mitjançant l'addició de 9 mg/mL de NaCl al sèrum dialitzat.

1.7. Línies cel·lulars

1.7.1. Línies cel·lulars en monocapa

Les línies cel·lulars en monocapa que s'han fet servir en aquesta tesi són derivades de teixits epitelials i creixen adherides a la placa.

HEK293 (ATCC CRL 1573)

La línia cel·lular es va establir a partir de la immortalització de cèl·lules de ronyó embrionari sa. Es cultiven en medi DMEM amb 10% FBS, 1% de glutamina (Gln) i els antibiòtics penicil·lina i estreptomicina (P/S). Aquesta línia cel·lular és fàcilment transfectable i per això s'ha fet servir com a primera aproximació de molts dels experiments de l'estudi de l'interactoma de CNT3. Addicionalment, en el grup es van generar línies cel·lulars amb l'expressió estable de cada un dels transportadors concentratius de nucleòsids, són les línies HEK-CNT1, HEK-CNT2 i HEK-CNT3. Es van generar al laboratori mitjançant el sistema Flp-In™ que permet la integració i expressió del gen d'interès en cèl·lules de mamífer en un lloc específic del genoma, per tant, totes les línies cel·lulars han incorporat la seqüència al mateix lloc. Es van generar per estudiar la interacció de fàrmacs amb aquests transportadors ja que en les línies cel·lulars és complicat degut a que l'expressió dels CNTs es perd en les cèl·lules en

cultiu. En aquest cas, han estat una bona eina per a l'estudi de les interaccions amb CNT3.

HepG2 (ATCC® HB-8065™)

La línia cel·lular es va establir a partir de cèl·lules d'hepatoblastoma d'un nen de 15 anys d'ètnia caucàsica. Es mantenen en medi EMEM suplementat amb 10% FBS, 1% Gln i P/S.

HT-29 (ATCC® HTB-38™)

La línia cel·lular es va establir a partir de cèl·lules d'adenocarcinoma colorectal d'una dona. Creixen formant agrupacions de cèl·lules i no arriben a formar una monocapa uniforme a tota la placa. El medi que s'utilitza per al seu manteniment és DMEM suplementat amb 10% FBS, 1% Gln i P/S.

PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)

La línia cel·lular es va establir a partir de carcinoma ductal pancreàtic a partir del tumor d'un home. El medi que s'utilitza per al seu manteniment és DMEM suplementat amb 10% FBS, 1% Gln i P/S.

1.7.2. Línies cel·lulars en suspensió

Aquestes línies es generen a partir de cèl·lules sanguínies i creixen dins el medi sense adherir-se als flascons.

MV4-11 (ACC 102 - DSMZ)

És una línia cel·lular derivada de monòcits d'un nen de 10 anys amb leucèmia mielomonocítica bifenotípica aguda B. Presenten translocació t(4;11), reordenament *KMT2A* i la mutació FLT3-ITD amb pèrdua del segon al·lel d'FLT3 de manera que no expressen FLT3 WT. Es mantenen en medi RPMI-1640 suplementat amb 10% FBS inactivat, 1% Gln i P/S.

SEM (ACC 546 - DSMZ)

Són precursors de cèl·lules B. La línia cel·lular es va establir a partir de les cèl·lules d'una nena de 5 anys a la recidiva de leucèmia limfàtica aguda. Presenten translocació t(4;11) amb reordenament *KMT2A* i sobreexpressió d'FLT3. Es mantenen en medi IMDM suplementat amb 10% FBS inactivat, 1% Gln i P/S

THP-1 (ACC 16 - DSMZ)

Es tracta de monòcits derivats d'un pacient pediàtric amb leucèmia monocítica aguda. Presenten reordenament *KMT2A* i *FLT3* WT. Es mantenen en medi RPMI-1640 suplementat amb 10 % d'FBS inactivat, 1% Gln i P/S.

MEC-1 (ACC 497 - DSMZ)

És una línia cel·lular derivada de limfòcits B de leucèmia limfàtica crònica (B-LLC). Es va establir a partir de sang perifèrica d'un home amb aquesta leucèmia. El medi que es va fer servir és IMDM suplementat amb 10% FBS inactivat, 1% Gln i P/S.

1.8. Cultiu primari. Diferenciació de monòcits a macròfags

Aquest protocol el van dur a terme en el grup de la Dra. Ester Ballana (Badia et al. 2018). S'obtenen cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) a partir de la capa leucoplaquetària de sang de donants sans. La capa leucoplaquetària es compra al Banc de Sang i Teixits Català (<http://www.bancsang.net/en/index.html>; Barcelona, Espanya). Les capes leucoplaquetàries són anònimes i són impossibles de rastrejar. Breument, els PBMCs s'obtenen per centrifugació amb el gradient de densitat Ficoll-Paque i després es fan servir per seleccionar monòcits per selecció negativa (StemCell Technologies). Els monòcits es cultiven en medi complet i es diferencien a macròfags derivats de monòcits (MDM) per la presència del factor estimulador de colònies de monòcits (M-CSF, Peprotech) a 100 ng/mL durant 4 dies. Seguidament, s'infecten amb partícules virals Vpx.

2. Biologia molecular

Les tècniques de biologia molecular que s'han fet servir en aquesta tesi serveixen per amplificar els vectors que contenen cDNA de les proteïnes d'interès per posteriorment utilitzar-los per augmentar l'expressió de cada una de les proteïnes. Addicionalment, s'han fet talls amb enzims de restricció per comprovar la mida dels inserts. I per subclonar el cDNA en altres vectors.

2.1. Subclonació

2.1.1. Digestió amb enzims de restricció

La digestió amb enzims de restricció permet tallar seqüències de DNA en regions conegudes.

En primer lloc, s'han d'elegir les dianes de restricció que es faran servir per això s'ha de tenir en compte que tallin el vector en el *multicloning site* i que no hi hagi cap diana en la seqüència de l'insert. També s'ha de mirar que els dos enzims necessitin les mateixes

condicions per dur a terme la seva activitat i puguin actuar dins un mateix tampó i la mateixa temperatura d'incubació, sinó la digestió s'ha de fer seqüencial.

Per dur a terme la digestió, es fan servir 1 – 2 µg de DNA, 2 µl de tampó 10x, 1 µl de cada enzim de restricció i aigua estèril fins al volum final de 20 µl. En el cas de que el que s'estigui digerint sigui el vector, a més, s'ha d'afegir fosfatasa alcalina per treure el fosfat de l'extrem per evitar que hi hagi autolligació. En la mateixa preparació anterior s'afegeix 1 µl de fosfatasa alcalina i 3 µl del tampó de l'enzim, en aquest cas el volum final és de 30 µl ja que els enzims estan conservats en glicerol i aquest no pot superar el 10 % del volum total de la reacció per evitar la inhibició per excés de glicerol. S'incuba 1,5 h a 37 °C. Seguidament, s'ha de purificar el producte, per això es corre un gel d'agarosa, es retalla la banda d'interès i es purifica amb el kit Quiaquick Gel Extraction (Quiagen) seguint les seves intruccions. En el cas del vector, també es pot purificar sense necessitat de córrer un gel, es fa per purificació per columna amb el kit *DNA Clean and Concentrator* (ZymoResearch) segons les especificacions descrites.

2.1.2. Lligació

Mitjançant la lligació es poden unir el vector i l'insert prèviament digerits amb la mateixa combinació d'enzims de restricció. Per aquest propòsit es fa servir l'enzim T4 lligasa.

Es preparen relacions molars de vector:insert diferents. 1:0 per mesurar autolligació, 1:1 i 1:3. Per fer aquests càlculs es té en compte la mida de cada tros de DNA seguint la següent relació: $\text{ng insert} = \text{ng vector} * (\text{kb insert} / \text{kb vector})$.

Per dur a terme la reacció es preparen les quantitats necessàries de DNA per cada una de les relacions, 1 µl de tampó 10x de l'enzim, 0,5 µg d'enzim T4 lligasa (Promega) i aigua estèril fins al volum final de 10 µl. S'incuba durant 3 h a temperatura ambient.

2.2. Generació de bacteris competents

Els bacteris capaços d'incorporar DNA de l'exterior es coneixen com a bacteris competents. Per aconseguir aquest estat, els bacteris han de patir una sèrie d'alteracions a la seva membrana que permeten una major permeabilitat cel·lular. Els bacteris competents utilitzats en aquesta tesi s'han generat a partir d'*Escherichia coli* X-Blue.

Per generar els bacteris competents, s'inoculen bacteris *E. coli* de la soca XL1-Blue en 3 mL de medi LB i s'incuben a 37 °C en agitació durant la nit. Al dia següent s'inoculen 2 mL d'aquest creixement en 100 mL d'LB (1 % p/v bacto-triptona, 0,5 % p/v extracte de llevat, 1 % p/v NaCl i 2 mM NaOH pH = 7) i es deixa créixer a 37 °C en agitació fins que

els bacteris es troben en la fase de creixement exponencial (quan la densitat òptica a 550 nm és 0.4). El cultiu bacterià es traspassa a tubs de polipropilè estèrils i es deixa en gel durant 15 minuts. Es centrifuga a 3000 rpm a 4 °C durant 5 minuts, es descarta el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* de cèl·lules suaument amb el vòrtex en 30 ml de tampó TfBI (30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂ a pH = 5,8 i 15% de glicerol). Els tubs s'incuben 20 minuts en gel i es centrifuguen a 3000 rpm a 4 °C durant 15 minuts. Finalment, es descarta el sobrenedant i es resuspèn el *pellet* en 4 mL de tampó TfBII (10 mM Mops a pH = 7, 75m M CaCl₂, 10 mM RbCl i 15% glicerol). En aquest punt els bacteris competents ja es poden fer servir o se'n poden congelar alíquotes amb nitrogen líquid que es poden conservar a – 80 °C fins al moment de fer-se servir.

2.3. Transformació

La transformació és el procés pel qual s'insereix un DNA plasmídic dins un bacteri per poder-lo amplificar. Tot aquest procés es fa a la flama per evitar contaminacions. En primer lloc, es posa en contacte el DNA plasmídic amb 50 µl de bacteris competents en un eppendorf i es deixa en gel uns 15 minuts. Es genera un xoc tèrmic durant 1,5 minuts a 42 °C i es col·loca en gel per recuperar la temperatura. Seguidament, s'afegeix un ml d'LB i es deixa a 37 °C en agitació durant una hora. Es centrifuga a 3500 rpm durant 5 minuts i es descarten uns 600 – 800 µl de sobrenedant, la resta es resuspèn i es plaqueja en les plaques d'agar amb l'antibiòtic corresponent prèviament atemperades. Es deixen les plaques a l'estufa a 37 °C durant la nit. Al matí següent es guarda la placa a 4 °C fins que s'hagi de fer servir.

2.4. Amplificació dels bacteris i aïllament del DNA plasmídic.

Depenent de la quantitat de DNA que es necessiti es poden fer servir diferents protocols d'aïllament. Per obtenir una menor quantitat de DNA i de menor puresa es fa servir la mini-prep, si se'n necessita major quantitat i de major puresa el protocol que es fa servir és la midi-prep. El mètode es basa en la lisi alcalina i una neutralització on s'eliminen les restes cel·lulars. El DNA s'uneix a una resina d'intercanvi iònic i es realitzen diversos rentats per eliminar RNA, proteïnes i altres impureses per finalment eluir el DNA plasmídic.

L'amplificació per a una mini-prep es fa en 3 ml d'LB amb antibiòtic a partir d'una colònia de bacteris i es deixa en agitació a 37 °C ON. Això també serveix com a precultiu per a l'amplificació de la midi-prep. Per a la mini-prep es fa servir el kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps Purification Systems*® (Promega) seguint les indicacions del comerciant.

Per a amplificar el cultiu per a realitzar una midi-prep, en un erlenmeyer es posen 50 ml d'LB amb antibiòtic i 150 µl del precultiu, es deixa créixer en agitació a 37 °C ON. Seguidament es centrifuga a 4 °C, 6000 rpm durant 15 min. Per dur a terme l'extracció es fa servir el kit *Nucleobond midi-maxi-prep* (Cultek) seguint les instruccions del fabricant.

3. Manipulació dels nivells de proteïna

Degut a la baixa expressió d'algunes proteïnes com són els transportadors de nucleòsids en cèl·lules en cultiu és necessari transfectar el DNA per tenir nivells de proteïna suficients. La transfecció i silenciament també serveixen per augmentar o disminuir els nivells de proteïna i estudiar el seu efecte biològic.

3.1. Transfecció

S'han fet servir mètodes químics de transfecció. En concret, la lipofecció que consisteix en la formació de complexos entre lípids catiónics i el DNA que està carregat negativament. Aquest complex té afinitat per la membrana i permet l'entrada del DNA al citoplasma.

S'han utilitzat dos reactius diferents depenent de la línia cel·lular que s'ha transfectat. Lipofectamina 2000 (Invitrogen) per HepG2, i Lipotransfectina (Nitorlab) per HEK293. El protocol és molt similar, canvia el temps d'incubació necessari. El volum del reactiu i la concentració de DNA s'han adaptat a cada línia cel·lular. Els volums que s'indiquen són els utilitzats per plaques de 24 pous.

Lipofectamina 2000		Lipotransfectina	
25 µL opti-MEM	25 µL opti-MEM	25 µL opti-MEM	25 µL opti-MEM
1 µg DNA total	2 µL lipofectamina	300 ng DNA total	1 µL lipotranfectina
5 minuts d'incubació		15 minuts d'incubació	

Taula 10. Condicions de transfecció

En un tub s'afegeixen el volum necessari d'opti-MEM i DNA. En un altre es prepara l'opti-MEM i el reactiu de lipofecció corresponent (**Taula 10**). Es col·loca la barreja que conté el DNA a sobre de l'altra, es pipeteja (només una vegada en el cas de la lipotransfectina) i s'incuba el temps corresponent (**Taula 10**). Mentre es canvia el medi a les plaques afegint 450 µL de medi fresc a cada un dels pous. Seguidament, s'afegeixen 50 µL de la mescla de transfecció a cada pou gota a gota. Es deixa en contacte amb les cèl·lules

4-5 h amb la lipofectamina i 6 h amb la lipotransfectina, punt on es canvia el medi. Es deixa el temps necessari per a l'experiment, normalment 48 h.

3.2. Silenciament

Per dur a terme el silenciament s'ha utilitzat el reactiu TransiT-siQUEST (Mirus Bio). Els volums indicats corresponen als necessaris per silenciar una placa de 60 mm.

En un tub s'afegeixen 500 µL d'opti-MEM temperat, s'incorporen 15 µL de TransiT-siQUEST i es pipeteja, a continuació s'afegeix el volum necessari d'estoc de siRNA 100 µM per aconseguir una concentració 250 nM per que al afegir-la a la placa amb medi quedarà a 25 nM. Es pipeteja i s'incuba durant 15 min. Mentre, es canvia el medi de les cèl·lules per 4.5 mL de medi fresc i després s'afegeix gota a gota la mescla que s'ha incubat.

Els siRNA que s'ha fet servir és Silencer® Select (Termofisher) pre-dissenyat. SAMHD1 (s24791).

4. Anàlisi de l'expressió de proteïna

4.1. Extracció de proteïna a partir de cultius cel·lulars

Per generar els extractes proteics és necessari disgregar les cèl·lules amb tampó de lisi. En el cas de les cèl·lules que creixen en monocapa es partirà d'una placa de cèl·lules. En les cèl·lules en suspensió es començarà amb un *pellet* de cèl·lules.

Per l'extracció de proteïna de cèl·lules en monocapa s'ha fet servir el tampó NP40 i per les cèl·lules en suspensió el tampó cell signaling.

NP40: 50 mM TRIS base pH 7.4, 250 mM NaCl, 1 % NP40, 5 mM pirofosfat sòdic i 50 mM NaF

Cell signaling: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Tritó X-100

Per l'extracció proteica es fan dos rentats amb PBS i es congelen les plaques. En el cas de les cèl·lules en suspensió, per fer els rentats s'han de centrifugar les cèl·lules a 900 rpm durant 6 min. Després d'això s'aspira el medi i es congela el *pellet*. Es mantenen en gel. Per disgregar les cèl·lules s'afegeix el tampó de lisi corresponent suplementat al moment amb ortovanadat sòdic (concentració final 1 mM), inhibidors de proteases (*Complete Mini*, Roche) i inhibidor de fosfatases (PhosSTOP, Roche) quan es vulgui estudiar la fosforilació de proteïnes. Amb l'ajuda d'un *scraper* es recull la suspensió cel·lular quan es parteix d'un cultiu en monocapa. En les cèl·lules en suspensió es

disgrega el *pellet* amb l'ajuda d'una micropipeta. A partir d'aquí l'extracció tant de cèl·lules en monocapa com en suspensió són iguals. Es passa la suspensió cel·lular a un tub *ependorf* i amb l'ajuda d'un xeringa 25 G s'acaba de disgregar bé la mostra passant-la com a mínim 10 vegades. Es manté 15 min en gel i es centrifuga durant 15 min a 13200 rpm a 4°C. Es recull el sobrenedant que és el nostre extracte proteic.

4.1.1. Quantificació de proteïna pel mètode Bradford.

El mètode Bradford és un mètode colorimètric que es basa en el canvi de coloració en medi àcid de la solució comercial Bio-Rad *Protein Assay kit* quan s'uneix als residus bàsics de les proteïnes.

Es preparen dues dilucions en PBS de cada mostra. En general 1:20 i 1:40, en mostres menys concentrades 1:15 i 1:30, i per més concentrades 1:30 i 1:60. De manera que tinguin valors que entrin dins la recta patró. Aquesta consisteix en dilucions d'albúmina bovina sèrica (BSA) en PBS a concentracions (0, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL). En una placa de 96 pous es carreguen 10 µL per triplicat de les diferents dilucions de la recta patró i per duplicat les dilucions de cada mostra.

S'afegeixen 200 µL per pou de la solució Bio-Rad diluïda 1:5 en aigua destil·lada. Es llegeix l'absorbància a longitud d'ona 595 nm en un espectrofotòmetre lector de plaques.

4.2. Electroforesi en SDS-PAGE

La tècnica que es fa servir per separar proteïnes pel seu pes molecular és l'electroforesi en gel de poliàcrilamida (PAGE) en presència de dodecil sulfat sòdic (SDS). Les proteïnes es preparen en un medi de càrrega que conté SDS, el que li confereix càrrega negativa que servirà per separar les proteïnes a través de la xarxa d'acrilamida i bisacrilamida del gel gràcies al corrent elèctric.

4.2.1. Preparació de les mostres.

La quantitat de proteïna que es carrega dependrà de l'expressió d'aquesta. En general, es carreguen uns 20-40 µg. La proteïna es dilueix en aigua destil·lada i s'afegeix el volum necessari de tampó de càrrega 5x (50 % glicerol, 5% SDS, 0.5 % blau de bromofenol, 625 mM Tris pH 6.8, 5% β-mercaptoetanol afegit a l'hora de fer-lo servir) perquè quedi 1x, en un volum final de 20-25 µL.

Les mostres s'incuben 5 min a 95°C. Quan es vol estudiar l'expressió dels transportadors s'incuben 30 min a 37°C ja que de l'altra manera s'agreguen i no es veu bé la banda.

4.2.2. Preparació dels gels de poliacrilamida.

Els gels de poliacrilamida consten de dues fases, el gel concentrador on es posen les mostres i permet que entrin alineades al gel resolutiu on es separaran les proteïnes. Aquest gel pot variar en percentatge depenent del pes molecular de les proteïnes d'interès, per separar bé proteïnes de baix pes molecular es faran servir gels amb major percentatge de poliacrilamida i viceversa. En aquest treball s'han fet servir gels resolutius al 8% i al 10%.

Gel concentrador (per 4 mL): 2.7 mL d'aigua destil·lada; 670 µL de mescla d'acrilamides comercial (Bio-Rad); 500 µL Tris 1 M pH 6.8; 40 µL SDS al 10%; 40 µL de persulfat d'amoni (APS, Bio-Rad) al 10% i 4 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED, Bio-Rad).

Gel resolutiu (per 10 mL): 2.3 mL d'aigua al 8% o 1.9 mL al 10%; 1.3 mL mescla d'acrilamides comercial al 8% i 3.3 mL al 10%; 2.5 mL Tris 1.5 M pH 8.8; 100 µL SDS al 10%; 100 µL APS al 10% i 4 µL de TEMED.

Els reactius s'han d'afegir per aquest ordre ja que l'APS i el TEMED són els que permeten la polimerització del gel i s'han d'afegir al final.

Es prepara primer el gel resolutiu i se n'afegeixen 7.5 mL entre els vidres, es deixa polimeritzar i després s'afegeix el gel concentrador on s'afegeix la tinta amb el número de pous desitjat.

4.2.3. Electroforesi

Es col·loca el gel en una cubeta d'electroforesi (Sistema Mini Protean 3 Bio-Rad), s'afegeix tampó d'electroforesi (Tris-Base 250 mM, Glicina 1.91 M i SDS a l'1%), es carreguen les mostres i el marcador de pes molecular *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (Bio-Rad) i es connecta a una font de voltatge a 40 mA amb un gel o 60 mA quan se'n col·loquen dos.

4.2.4. Western Blot

Consisteix en transferir les proteïnes a una membrana de polifluorur de vinidilè (PVDF Inmobilon-P, Millipore). En primer lloc, s'activa la membrana durant 15 segons amb metanol, es renta 2 minuts amb aigua mili-Q i es deixa en tampó de transferència (Tris-Base 250 mM, Glicina 1.91 M i metanol al 20% (v/v)).

Per muntar la transferència es col·loquen dins el *cassette* la membrana i el gel entre tres papers whatman i una esponja a cada costat. El muntatge es posa en una cubeta amb gel per mantenir la temperatura i tampó de transferència. Es connecta a una font de voltatge a 180 mA durant 70-90 minuts depenent del pes de la proteïna d'interès.

Una vegada transferit s'incuba en ponceau per assegurar-se que ha funcionat la transferència i es renta amb aigua destil·lada. Seguidament es bloqueja amb llet al 10% (p/v) preparada en TBS-tween (TBST) (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20 (Bio-Rad), pH 7,6).

Finalment, s'incuba amb l'anticòs d'interès en la corresponent dilució (en 5% llet en TBST o 5 % de BSA en TBST pels anticossos que detecten fosforilacions) indicada en la **Taula 11**.

Proteïna	Casa comercial	Referència o clon	Pes molecular	Espècie	Dilució
HA	Roche	3F10	Tag + proteïna	rata	1:1000
c-myc	Santa Cruz	sc-40	Tag + proteïna	ratolí	1:500
SAMHD1	Abcam	ab67820	72 kDa	ratolí	1:1000
p-SAMHD1 (Thr592)	Cell Signaling	D702M	72 kDa	conill	1:1000
CNT3	Sigma	HPA024729	75 – 100 kDa	conill	1:1000
QDPR	Abcam	ab174310	26 kDa	conill	1:1000
NFκB p65	Abcam	ab7970	65 kDa	conill	1:400
NFκB p106/p50	Abcam	ab7971	50	conill	1:400
c-Rel	Abcam	ab31413	69	conill	1:1000
RelB	Abcam	ab33907	62	conill	1:5000
FLT3	Cell Signalling	3462	130 – 160 kDa	conill	1:1000
p-FLT3 (Tyr591)	Cell Signalling	3461	130	conill	1:1000
Actina	Sigma	A2066	42	conill	1:2000
Tubulina	Sigma	T6074	50	ratolí	1:5000

Taula 11. Característiques dels anticossos primaris utilitzats per immunodetecció de proteïna.

Passat el temps d'incubació amb l'anticòs primari es duen a terme tres rentats de 5 minuts en TBST i s'incuba amb l'anticòs secundari unit a horseradish peroxidase (HRP) durant un mínim de dues hores. Es fan tres rentats de 5 minuts en TBST.

Per a la immunodetecció es fa servir el reactiu *Enhanced ChemoLuminiscent Method* (ECL, Biological Industries). Es barregen els reactius A i B i s'incuba la membrana durant 5 minuts, la barreja conté luminol que reacciona amb l'HRP i seguidament es fotografia la membrana amb l'aparell Las-3000 (Fujifilm).

5. Anàlisi de la interacció de proteïnes

5.1. Coimmunoprecipitació (coIP)

La immunoprecipitació permet concentrar una proteïna concreta a partir d'un extracte proteic gràcies a la utilització d'un anticòs específic. Aquesta tècnica es pot aprofitar per estudiar interaccions de proteïnes ja que juntament amb la proteïna d'interès s'arrossegueuen les proteïnes que estiguin interaccionant amb aquesta. En la coimmunoprecipitació una vegada s'ha immunoprecipitat la proteïna d'estudi es poden detectar, mitjançant un western blot, les proteïnes que es creu que estan interaccionant amb aquesta.

El material d'inici és un extracte proteic (apartat 4.1). En un volum total de 500 µl de tampó d'extracció amb inhibidor de proteases (normalment es fa servir el tampó NP40 perquè és poc astringent i permet mantenir les interaccions) s'incuben 500 µg de proteïna amb 3.5 µg d'anticòs. Es deixa ON a 4 °C en rotació en un orbital. Es fan tres rentats de les bolles magnètiques *Dynabeads® Protein G* (Life Technologies) amb tampó d'extracció amb l'ajuda d'un imant. Seguidament, es posa en contacte la solució de proteïnes i anticòs amb les bolles magnètiques, a les que s'uneix l'anticòs, entre 15 minuts i 2 hores en rotació en un orbital. Passat aquest temps, es recull el sobrenedant i es fan 5 rentats de les bolles amb l'ajuda d'un imant. Finalment, s'elueixen les proteïnes que s'han unit a les bolles amb la incubació en 25 µl de tampó de càrrega 2x a 50 °C durant 10 minuts. Després s'afegeix 0.25 µl de β-mercaptoetanol i s'incuba a 37 °C durant 30 minuts.

5.2. Immunodetecció de proteïnes per immunofluorescència.

Consisteix en la detecció de proteïnes mitjançant anticossos marcats units a fluoròfors en cèl·lules prèviament fixades. En aquest cas s'ha fet servir com a mètode per a estudiar interaccions de proteïnes ja que s'assumeix que perquè dues proteïnes puguin interaccionar han d'estar properes. Si es marquen les dues proteïnes i es veu co-

localització ens porta a pensar que la interacció que s'està estudiant es pot donar per la proximitat de les proteïnes.

5.2.1. En línies cel·lulars

Es sembren les cèl·lules en plaques de 24 pous on prèviament s'han afegit cobreobjectes. Una vegada transcorregut el temps necessari, es duen a terme dos rentats en PBS estèril i es fixen durant 15 minuts en paraformaldehid (PFA) 4% (p/v). Passat aquest temps es fan dos rentats de 5 minuts en PBS. En aquest punt es pot seguir amb el marcatge o es poden guardar a la nevera per dur-lo a terme més endavant.

Es duu a terme la permeabilització i bloqueig de les cèl·lules mitjançant tres rentats de 5 minuts amb 10 % de sèrum en PBS + 0,1 % tritó X-100. Es prepara l'anticòs/os primaris en 4 % de sèrum en PBS a la dilució indicada en la **Taula 12**. Es pipetegen 35 µL, es col·loquen sobre parafilm i la gota es cobreix amb el cobreobjectes i s'incuba tota la nit. Es torna a col·locar el cobreobjectes a la placa i es duen a terme quatre rentats de 10 minuts. S'incuba l'anticòs/os secundaris marcats amb els fluoròfors amb el mateix procediment que el primari durant 1,5 h. Es marquen els nuclis amb Hoescht (Sigma). Després es duen a terme 4 rentats de 10 minuts amb PBS. Es treu l'excés de PBS i es col·loca sobre el portaobjectes amb 3 µL de medi de muntatge *ProLong Gold Antifade Mountant* (Thermo Fischer Scientific). Es deixa 24 h a temperatura ambient i després es guarda a 4°C. Es generen les imatges amb el microscopi SP2 (Leica) amb l'objectiu d'immersió en oli 63x. Després es processen amb els programes LAS AF i ImageJ.

Proteïna	Casa comercial	Referència o clon	Espècie	Dilució
HA	Roche	3F10	rata	1:300
HA	Sigma	H6908	conill	1:300
c-myc	Santa Cruz	sc-40	ratolí	1:300
CNT3	Sigma	HPA024729	conill	1:100
SAMHD1	Abcam	ab67820	ratolí	1:50
QDPR	Santa Cruz	sc-376218	ratolí	1:50
Tom20	Santa Cruz	sc-11415	conill	1:100

Taula 12. Anticossos primaris utilitzats per immunofluorescència.

5.2.2. En teixit congelat inclòs en OCT

El material d'inici que s'ha fet servir han estat els talls de teixit inclosos en OCT i col·locats en el portaobjectes. A partir d'aquí es descongelen les mostres a temperatura ambient durant 30 minuts. Es fixen amb PFA 4 % en PBS durant 10 minuts. Es realitzen tres rentats de dos minuts en aigua destil·lada. Es permeabilitzen amb Tween 20 + 0,3 % en PBS durant 5 minuts. Es delimita la zona amb un retolador (Dako) que impermeabilitza i així es minimitza la quantitat d'anticòs que es fa servir. S'incuba durant una hora amb sèrum de cabra 10 % en PBS + 0,3 % Tween 20 per bloquejar. Seguidament, s'incuben els anticossos primaris, preparats en 4 % sèrum de cabra en PBS + 0,3 % Tween 20, ON a 4 °C en una cambra humida. Es fan tres rentats de 5 minuts en PBS + 0,3 % Tween 20. S'incuba amb els anticossos secundaris, preparats en 4 % sèrum de cabra en PBS + 0,3 % Tween 20, durant 1 h a temperatura ambient en una cambra humida. S'incuba durant 4 minuts amb Hoestch 1/1000 en PBS. Es realitzen tres rentats de 5 minuts en PBS + 0,3 % Tween 20. S'afegeix el medi de muntatge *ProLong Gold Antifade Mountant* (Thermo Fischer Scientific) i es col·loca un cobreobjectes a sobre. Es deixa 24 h a temperatura ambient i després es guarda a 4°C. Es generen les imatges amb el microscopi SP2 (Leica) amb l'objectiu d'immersió en oli 63x. Després es processen amb els programes LAS AF i ImageJ.

6. Anàlisi de l'expressió d'mRNA

Per mesurar els nivells d'mRNA es fa servir la PCR a temps real (RT-PCR) per la que es necessita l'extracció d'mRNA total de la cèl·lula i la retrotranscripció del mRNA a DNA complementari (cDNA). Tots aquests passos s'han de fer amb molta cura ja que hi pot haver problemes de degradació i contaminació. L'RNA és una molècula molt sensible a la temperatura i a la degradació per ribonucleases (RNAses) exògenes i endògenes. Per això, és necessari fer servir bata, material autoclavat i dur a terme les manipulacions en gel. A més, en la síntesi de cDNA i la preparació de la placa d'RT-PCR s'han d'evitar possibles contaminacions amb DNA ja que la tècnica de detecció és molt sensible. Per això, es treballa en una campana que s'ultraviola abans i després de cada ús i es treballa amb puntes estèrils lliures d'RNAses amb filtre.

6.1. Extracció d'RNA

Per l'extracció d'RNA es fa servir el kit comercial *SV Total RNA Isolation System* (Promega) seguint el protocol, en general es fa servir un volum més petit d'aigua per a l'elució (30-50 µL) per aconseguir concentracions més elevades. El material d'inici són plaques de cèl·lules congelades després de dos rentats amb PBS. El protocol conté

passos que permeten la lisi de les cèl·lules, la desnaturalització de complexos de nucleoproteïna, la inactivació d'RNAses i degradació del DNA que podria interferir en els mètodes d'amplificació posteriors.

6.2. Quantificació d'RNA per espectrofotometria

Per a la quantificació d'RNA es fa servir l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000. S'analitza a una longitud d'ona de 260 nm, a la que presenten la màxima absorbància els àcids nucleics. També es fa una mesura a 280 nm per detectar els nivells de proteïna i així s'obté la ràtio 260/280 que permet determinar la puresa de les mostres. El valor òptim està entre 1,8-2. El valor menor a 1,8 indicaria contaminació amb proteïnes i un valor superior a 2 podria indicar degradació de la mostra.

6.3. Retrotranscripció

Per poder dur a terme la posterior PCR és necessari la retrotranscripció del RNA a cDNA amb la transcriptasa reversa M-MLV. En concret, es retrotranscriu l'mRNA per l'ús de *random primers* (Invitrogen).

Es preparen 1 µg de RNA total en un volum final de 10 µL d'aigua lliure de nucleases. Es desnaturalitza a 65 °C durant 5 minuts en el termociclador, es posa en gel i a cada tub s'afegeixen 10 µL de cDNA mix (en tampó de l'enzim: 0.1 M DTT, 10 mM dNTPs i 240 ng *random primers*) que contenen RNAsin (Promega) i M-MLV (Gibco) (Per cada 100 µL de dDNA mix s'afegeixen 10 µL de RNAsin i 10 µL de M-MLV). La reacció s'incuba 50 min a 37°C i es finalitza amb la inactivació de l'enzim durant 10 min a 65°C. Finalment, s'afegeixen 140 µL d'aigua estèril per diluir el cDNA que ja estarà preparat per a la preparació de la placa de PCR.

6.4. PCR a temps real

Es tracta d'una PCR que permet detectar l'amplificació del producte a mesura que s'acumula. De manera que permet comparar els nivells d'expressió respecte un control o determinar el nombre de còpies presents si es fa servir una patró. En aquesta treball només s'han fet determinacions relatives. S'ha fet servir el sistema TaqMan d'Applied Biosystems, basat en l'ús d'una sonda fluorogènica. La sonda conté un marcador fluorescent en la posició 5' (*reporter*) i un reductor de l'emissió en l'extrem 3' (*quencher*). En aquesta reacció també són necessaris la polimerasa i encebadors específics del gen d'estudi. Així com la polimerasa avança va degradant el *quencher* de manera que es pot emetre la fluorescència de la sonda. A cada cicle la fluorescència va augmentant i el

cicle de PCR que arriba al llindar de detecció determina la C_t que es necessita per calcular la quantitat relativa d'expressió d'mRNA.

En cada pou de la placa de 96 pous que es fa servir per a la RT-PCR es posen 11 μ L de polimerasa amb la sonda (10 μ L mastermix 2x que conté la polimerasa (TaqMan™ Universal PCR MasterMix) i 1 μ L de la sonda 20x i primers corresponents (**Taula 13** i **Taula 14**) i 9 μ L de cDNA. La reacció (1 cicle a 50 °C 2 minuts, 1 cicle 95 °C 10 minuts, 40 cicles a 95 °C 15 segons i 1 cicle a 60 °C 60 segons) es duu a terme en el termociclador que pot detectar la fluorescència i s'analitza amb el software 7500 v2.0.1.

Càlculs

- 1) Fer la mitjana de les C_t de cada mostra i del control endogen.
- 2) Calcular el valor ΔC_t com la diferència de la C_t de la mostra i de la C_t del control endogen.
- 3) L'error estàndard de ΔC_t es calcula com $\sqrt{(SE_{\text{mostra}})^2 - (SE_{\text{control endogen}})^2}$.
- 4) Calcular $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{mostra}) - \Delta C_t(\text{mostra control})$.
- 5) Per determinar l'expressió de la mostra relativitzada a la mostra control s'ha de calcular $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (unitats arbitràries).

Sondes

Gen	Identificador	Sonda	Quencher
SAMHD1	Hs00210019_m1	FAM	NFQ
QDPR	Hs01077088_m1	FAM	NFQ
DCK	Hs01040726_m1	FAM	NFQ
NT5C2	Hs01056741_m1	FAM	NFQ
GUS	4310888E	VIC	TAMRA
GAPDH	4310884E	VIC	TAMRA

Taula 13. LListat de sondes comercials utilitzades.

Gen	Encebadors	Sonda	Quencher
SLC28A1	Fw: TGATTTCTTGAAAAGCCTGGA Rv: CTGCTCCTGATCTCTGCGG	FAM: AAGGCCAGCTCCCTAG- GAGTGAAGTTGAG	TAMRA
SLC28A2	Fw: AAGTAGAGCCTGAGGGAAGCAA Rv: GCCCAGTCCATCCCC	FAM: AGGACTGACGCACAAGGA- CACAGCC	TAMRA
SLC28A3	Fw: GAGCTGTGCAAAGCAGGGA Rv: TGGAGAATCCTGCTCAACTGTG	FAM: CACACAAACACCAAACAG- GATGAAGAACAGG	TAMRA
SLC29A1	Fw: GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA Rv: TTCATTGGTGGGCTGAGAGTT	FAM: CAGGCAAAGAGGAATCTG- GAGTTTCAGTCTC	TAMRA
SLC29A2	Fw: CCCTGGATCTTGACCTGGAG Rv: GGTTTTCTGGCTTCTGGG	FAM: AGGAGCCGGAATCAGAGC- CAGATGA	TAMRA

Taula 14. Llistat de sondes i encebadors dissenyats al laboratori.

7. Assajos de transport de nucleòsids

Els assajos de transport permeten mesurar l'activitat dels transportadors. Consisteix en mesurar els nivells de substrat marcat radioactivament que les cèl·lules en cultiu capten durant un temps determinat d'incubació, és necessari que sigui un temps on es manté la velocitat inicial ja que sinó s'estaria mesurant l'acumulació i no el transport. Els assajos es duen a terme en dos medis de cultiu diferents que permeten diferenciar entre els transportadors concentratius i equilibratius de nucleòsids. En el medi que conté sodi seran actius tots els transportadors mentre que en el medi colina (sense sodi) només actuaran els equilibratius. En ambdós casos també es mesurarà la unió inespecífica i la difusió. El valor d'activitat dels transportadors concentratius s'aconseguirà calculant la diferència entre els dos medis.

Al medi se l'hi afegeix substrat radioactiu (MoravekBiotech) i el mateix nucleòsid sense marcar (Sigma) en concentracions properes a la Km del transportador que s'estudia. En general s'afegeix 1 μM de substrat sense marcar. Els substrats radioactius s'emmagatzemen en la unitat de radioisòtops de la facultat i se'n va a cercar la quantitat necessària en el moment de fer l'experiment, que es durà a terme en el laboratori en una zona habilitada per això.

Per acotar l'activitat d'algun transportador en concret es poden fer inhibicions d'alguns transportadors. Per inhibir els transportadors equilibratius es poden fer servir NBTI o dipiridamol. NBTI 1 μM inhibeix ENT1 mentre que a 10 μM pot inhibir tant ENT1 com ENT2. Dipiridamol 10 μM inhibeix els dos transportadors també. Per als CNTs no es

coneixen inhibidors específics per cada un dels transportadors. Per distingir entre ells s'aprofita la diferència d'especificitat de substrat entre els CNTs per fer servir inhibicions creuades (100 µM) amb concentracions elevades de substrats no marcats.

7.1. Medis de transport i substrats radioactius

El medi sodi (Na) està compost per 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM Hepes i 0.1 mg/l roig fenol. pH = 7.4

El medi colina (CHO) està compost per 137 mM ChoCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM Hepes i 15 mg/l roig fenol. pH = 7.4

Medi STOP 137 mM NaCl, 10 mM Hepes i 0.3 mg/l roig fenol. pH = 7.4

Els substrats marcats radioactivament amb triti que s'han fet servir són [5,6-³H]uridina, [5-³H(N)]citidina, [8-³H]guanosina, [2,8-³H]adenosina. En general es fan servir a 1 µCi d'activitat radioactiva per la dilució 1:1000 de l'estoc. En alguns casos on s'indica s'han arribat a utilitzar 2 µCi. La concentració de nucleòsid en aquesta dilució queden d'aproximadament 50 nM (depèn de la concentració exacte de l'estoc), normalment aquesta concentració és negligible ja que s'afegeix 1 µM de nucleòsid sense marcar que determinarà la concentració de treball. Però, en el cas concret dels assajos de transport de l'apartat d'ADK no es va afegir substrat fred. Per això la concentració que s'ha de tenir en compte per fer els càlculs és la concentració del radioactiu. Una vegada feta la dilució 1:1000 la concentració concreta que s'ha fet servir en cada cas és per adenosina 48.35 nM o 53.2 nM i per citidina 45.76 nM o 49.28 nM, per dos estocs diferents per cada un dels nucleòsids.

7.2. Assajos de transport en monocapa.

Es fan servir cèl·lules sembrades en plaques de 24 pous. Les condicions es sembren per triplicat o quadruplicat, tenint en compte que els pous on es farà el transport en medi sodi i colina s'han de trobar en la mateixa placa perquè siguin comparables.

Es fan dos rentats amb el medi corresponent i posteriorment cada pou s'incuba amb 240 µL del medi que conté el substrat radioactiu durant el temps corresponent, indicat en cada un dels experiments. Seguidament, es fan dos rentats amb medi STOP fred, s'aspira bé el pou perquè no quedin restes de medi i es congela a -20°C.

Per analitzar la radioactivitat incorporada, s'afegeixen 100 µL de tampó de lisi (Tritó X-100 0,5% i NaOH 100 mM) i es deixa en agitació durant 1 hora. Amb l'ajuda d'una pipeta es disgrega bé la mostra. D'aquí s'agafen 10 µL per mesurar la concentració de proteïna pel mètode BCA (apartat 7.3) i la resta es recullen en un vial que conté 3 mL de líquid

centelleig (Ecoscint™ H, National Diagnostics). També es preparen vials que contenen líquid de centelleig amb 5 µL de de medi de transport per analitzar l'activitat específica (AE) del medi utilitzat.

La radioactivitat que conté cada un dels vials es mesura en comptadors beta que es troben en la unitat de radioisòtops. S'obtenen valors de desintegracions per minut (dpm).

7.3. Valoració de la quantitat de proteïna

Per mesurar la quantitat de proteïna total es fa servir el mètode BCA. Es basa en el fet de que les proteïnes poden reduir Cu^{2+} a Cu^+ en una solució alcalina (reacció de biuret) que reacciona amb l'àcid bicinconínic donant una coloració lila. La reducció del coure es dona majoritàriament pels aminoàcids cisteïna, cistina, tirosina i triptòfan. A més, a diferència d'altres mètodes de quantificació de proteïna com el Bradford, la cadena peptídica també està involucrada en la formació de color.

Es posen 10 µL de mostra de cada un dels pous a una placa de 96 pous. També es carreguen les mostres per generar la recta patró. Són duplicat amb 10 µL d'un banc de dilucions de BSA (0, 125, 250, 500, 1000 i 2000 µg/mL) preparat en tampó de lisi. Es fa servir el *kit* comercial BCA™ Proteinassay kit (Pierce). Es barregen els reactius A i B en la proporció 1:50 i se n'afegeixen 200 µL per pou. S'incuba 30 minuts a 37°C i 10 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps es llegeix l'absorbància a longitud d'ona de 550 nm.

7.4. Càlculs

$$AE \text{ (dpm/pmol)} = \frac{dpm \text{ estàndard}}{Volum \text{ estàndard} \cdot [substrat]}$$

La concentració de substrat que es té en compte és la de substrat fred, excepte en els casos on somés es fa servir substrat radioactiu. Comparada amb la concentració de substrat fred, la concentració del substrat radioactiu és despreciable.

$$\begin{aligned} & \text{Activitat (pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot} \cdot \text{t}^{-1}) \\ &= \frac{dpm \text{ mostra} \cdot 1000}{AE \cdot Volum \text{ mostra } (\mu\text{L}) \cdot [proteïna (\mu\text{g}/\mu\text{L})] \cdot temps} \end{aligned}$$

8. Assajos de viabilitat de cèl·lules en suspensió

Per mesurar la viabilitat cel·lular s'analitza l'activitat metabòlica que només està present en les cèl·lules vives. S'incuben amb bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que per l'acció de l'enzim succinat deshidrogenasa genera cristalls de formazan que són insolubles en aigua i presenten una tonalitat blavosa. Per espectrofotometria es mesuren els nivells de sal de tetrazoli formada que indicarà la viabilitat del cultiu respecte al control.

Es sembren i es tracten les cèl·lules en plaques de 96 pous amb un volum final de 100 µL, amb un mínim de quatre pous per condició i es deixa el temps de tractament a l'incubador. Per determinar la viabilitat s'afegeixen 10 µL de la solució de 5 mg/mL en PBS i s'incuben durant 1,5-2 hores depenent de la línia cel·lular. S'afegeixen 100 µL d'una barreja d'isopropanol:HCl 1M 24:1 i es disgreguen les cèl·lules amb l'ajuda d'una pipeta. Finalment, s'agiten les cèl·lules durant un minut i es mesura l'absorbància a 550 nm amb un espectrofotòmetre lector de plaques.

9. Anàlisi del cicle cel·lular

Per determinar la distribució de les fases del cicle cel·lular d'una població de cèl·lules es mesura per citometria de flux la quantitat de DNA que presenta cada una de les cèl·lules. En G0 i G1 les cèl·lules no s'estan dividint i la càrrega cromosòmica és la formada pels cromosomes de la cèl·lula (n). Les cèl·lules que s'estan preparant per a la divisió (fase S) en presenten major quantitat fins a arribar a les cèl·lules en fase G2 i M que presenten la càrrega cromosòmica de $2n$. La quantitat de cèl·lules que presenten cada una de les fases es recull en un histograma i permet calcular el percentatge de cada població respecte a la distribució del control. L'histograma d'una població normal està format per un pic alt i major que correspon a les fases G0/G1, una fase de meseta de les cèl·lules en fase S que estan sintetitzant DNA, i un pic menor corresponent a les cèl·lules en fase G2/M.

Es sembren i es tracten les cèl·lules en les diferents condicions que es volen estudiar. Si es tracta de cèl·lules en monocapa es tripsinitzen o en el cas de les cèl·lules en suspensió simplement es recullen i es passen a un eppendorf. Es centrifuguen a 1500 rpm durant 5 minuts. Es fa un rentat amb PBS. Es resuspenen $5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ cèl·lules en 300 µl PBS i es va afegint gota a gota, en agitació constant i suau, 700 µl d'etanol absolut fred. Es mantenen les mostres en gel i es guarden a -20 °C durant un mínim de 24 h i un màxim de 15 dies. Passat aquest temps es centrifuguen, es fa un rentat amb PBS i es resuspenen en 300 µl de iodur de propidi 50 µg/ml que s'intercala als àcids

nucleics i els marca i RNAsa 10 µg/ml que degrada el RNA per així només tenir el senyal del DNA. S'incuba durant una hora protegit de la llum i es procedeix a l'anàlisi del cicle amb el citòmetre de flux Cell Lab Quanta LC (Beckman Coulter) amb el programa Quanta Collection.

10. Luciferasa

Els gens reporters permeten l'estudi de l'expressió gènica. Són gens que tenen alguna característica que permet la detecció de la seva expressió, com és el cas de la luciferasa que es tracta d'un enzim oxidatiu que produeix luminiscència. Per dur a terme la tècnica es generen construccions amb seqüències reguladores del gen que es vol estudiar i el gen reporter de manera que es podrà determinar l'activitat d'aquesta seqüència reguladora gràcies a la detecció de l'activitat luciferasa. Com a control de transfecció per relativitzar els resultats es fa servir renilla.

Aquesta tècnica es pot aprofitar per estudiar la regulació de l'expressió d'aquestes seqüències baix diferents condicions. En aquesta tesi, s'han co-transfectat amb la proteïna d'interès (QDPR). Per dur a terme l'assaig es transfecten les cèl·lules per triplicat (apartat 3.1) amb la meitat del DNA amb el vector buit pcDNA3.1 o QDPR, l'altra meitat amb els vectors de l'assaig en la proporció 1/9 renilla (pRL-TK) i 8/9 el vector de luciferasa (pGL3b-regió d'interès i els controls pGL3b-bàsic i pGL3b-control). Passades 48 h de transfecció es procedeix a la lectura de la luminiscència seguint el protocol del kit Luciferase Assay System (Promega). Breument, es fa un rentat amb PBS. En plaques de 24 pous s'afegeixen 100 µl del tampó de lisi PLB i es deixa en agitació durant 20 minuts, es resuspenen les cèl·lules i es passen a eppendorfs que es mantindran en gel, es centrifuga i es recull el sobrenedant. Finalment, es prepara el luminòmetre amb el tampó LAR que consta de LAS i LAB que es col·loquen cada un a un injector. Es carreguen 20 µl de cada un dels sobrenedants a una placa blanca i s'analitza amb el luminòmetre que injectarà 100 µl del tampó LAR.

Per fer els càlculs es relativitza al valor de renilla de cada punt i la mitjana dels triplicats es relativitza al valor del vector bàsic d'aquella condició.

11. Anàlisi dels nivells de folats i aminoàcids

S'han fet servir diferents anàlisis bioquímics que es duen a terme a l'Hospital Sant Joan de Déu en mostres de pacients. En aquest cas s'han aprofitat per analitzar canvis metabòlics per a la sobreexpressió de CNT3. Les cèl·lules es van sembrar i transfectar al nostre laboratori. L'anàlisi es va dur a terme pel grup del Dr. Rafael Artuch després

de resuspendre les cèl·lules en PBS. S'han fet servir diferents procediments depenent de la molècula d'estudi.

11.1. Anàlisi de 5-MTHF per HPLC

Per a la mesura del 5-MTHF es va fer servir el mètode descrit a (Ormazabal et al. 2006). Breument, es dilueix la mostra 1:2 en 5 mg/mL d'àcid ascòrbic diluït en tampó fosfat 5 mM (pH = 2.3) i es centrifuga 10 min a 3500 rpm. Seguidament, es filtra el sobrenedant amb un filtre de 0.45 µm (Millipore) i es recull directament en un vial d'HPLC (Waters). S'injecten 20 µL de la mostra a l'aparell d'HPLC Waters (Columna nucleosil C-18; Teknokroma) prèviament calibrat amb 5-MTHF (Sigma). Finalment, s'analitza el 5-MTHF per HPLC de fase inversa amb detecció de fluorescència amb excitació de 295 nm i emissió de 355 nm. La fase mòbil consisteix en tampó fosfat (5 mM, pH = 2.3) amb acetonitril (93:7 v/v) durant 5 min seguit d'un gradient lineal (curvatura = 6) fins a arribar a la proporció 83:17 (v/v).

11.2. Anàlisi d'aminoàcids per UPLC-MS/MS

Per a la mesura d'aminoàcids es va fer servir el mètode descrit a (Casado et al. 2018). Breument, la preparació de la mostra consisteix en vortejar 25 µL de la mostra amb 25 µL de solució estàndard interna i 150 µL de metanol/0.1% àcid fòrmic per precipitar les proteïnes. Després la mostra es centrifuga a 6000 g durant 10 min. Per la reacció de derivació, es mesclen 5 µL del sobrenedant amb 35 µL de tampó borat (pH = 8.8) en un vial de vidre del cromatògraf, es vorteja i s'afegeix 10 µL de la solució AQC (3 mg/mL en acetonitril; AccQ·Tag Ultra Derivation kit). La mescla s'encalenteix a 55 °C durant 10 min.

Per analitzar la mostra es fa servir cromatografia líquida d'alta resolució acoplada a un detector espectròmetre de masses en tàndem (UPLC-MS/MS). La separació cromatogràfica es duu a terme amb una columna CORTECS C18 (Waters) a 55 °C amb l'aparell Waters ACQUITY UPLC H-class. El gradient consta d'aigua (fase mòbil A) i acetonitril (fase mòbil B), els dos contenen 0.1% d'àcid fòrmic. Finalment, la detecció es duu a terme amb l'espectrofotòmetre de masses Waters Xevo TQD triple-quadruple.

11.3. Anàlisi dels nivells de purines i pirimidines per UPLC-MS/MS

La mesura dels nivells de purines i pirimidines s'està posant a punt a partir del mètode descrit recentment per (Monostori et al. 2019) que permet la detecció sensible i simultània d'un gran nombre de purines i pirimidines per UPLC-MS/MS.

12. Tractament estadístic de les dades

La representació gràfic i l'estudi estadístic de les dades s'han fet amb el software GraphPad Prism 6.1

Els resultats estan expressats com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana (SEM). El test que s'ha fet servir i el nombre de rèpliques s'indica al peu de cada figura. Dos grups es consideren estadísticament diferents quan * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

13. Principis ètics

La investigació s'ha portat a terme de conformitat amb les normes ètiques i d'acord amb la Declaració d'Hèlsinki i amb les directrius nacionals i internacionals. L'estudi ha estat aprovat pel comité ètic de l'Hospital Sant Joan de Déu. Tots els pacients i/o representants legals han firmat un consentiment informat.



REFERÈNCIES



REFERÈNCIES

A

- Abdulla, P., and I. R. Coe. 2007. 'Characterization and functional analysis of the promoter for the human equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1', *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 26: 99-110.
- Abe, M., L. M. Pelus, P. Singh, T. Hirade, C. Onishi, J. Purevsuren, T. Taketani, S. Yamaguchi, and S. Fukuda. 2016. 'Internal Tandem Duplication in FLT3 Attenuates Proliferation and Regulates Resistance to the FLT3 Inhibitor AC220 by Modulating p21Cdkn1a and Pbx1 in Hematopoietic Cells', *PLoS One*, 11: e0158290.
- Agarwal, R. P., B. Robison, and R. E. Parks, Jr. 1978. 'Nucleoside diphosphokinase from human erythrocytes', *Methods Enzymol*, 51: 376-86.
- Amsailale, R., E. Van Den Neste, A. Arts, E. Starczewska, F. Bontemps, and C. Smal. 2012. 'Phosphorylation of deoxycytidine kinase on Ser-74: impact on kinetic properties and nucleoside analog activation in cancer cells', *Biochem Pharmacol*, 84: 43-51.
- An, S., R. Kumar, E. D. Sheets, and S. J. Benkovic. 2008. 'Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells', *Science*, 320: 103-6.
- Andersson, A., K. Paulsson, H. Lilljebjorn, C. Lassen, B. Strombeck, J. Heldrup, M. Behrendtz, B. Johansson, and T. Fioretos. 2008. 'FLT3 mutations in a 10 year consecutive series of 177 childhood acute leukemias and their impact on global gene expression patterns', *Genes Chromosomes Cancer*, 47: 64-70.
- Angus, S. P., L. J. Wheeler, S. A. Ranmal, X. Zhang, M. P. Markey, C. K. Mathews, and E. S. Knudsen. 2002. 'Retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication', *J Biol Chem*, 277: 44376-84.
- Antonoli, L., R. Colucci, C. Pellegrini, G. Giustarini, M. Tuccori, C. Blandizzi, and M. Fornai. 2013. 'The role of purinergic pathways in the pathophysiology of gut diseases: pharmacological modulation and potential therapeutic applications', *Pharmacol Ther*, 139: 157-88.
- Arimany-Nardi, C., A. Claudio-Montero, A. Viel-Oliva, P. Schmidtke, C. Estarellas, X. Barril, A. Bidon-Chanal, and M. Pastor-Anglada. 2017. 'Identification and Characterization of a Secondary Sodium-Binding Site and the Main Selectivity Determinants in the Human Concentrative Nucleoside Transporter 3', *Mol Pharm*, 14: 1980-87.
- Arteaga, C. L., T. D. Brown, J. G. Kuhn, H. S. Shen, T. J. O'Rourke, K. Beougher, H. J. Brentzel, D. D. Von Hoff, and G. R. Weiss. 1989. 'Phase I clinical and pharmacokinetic trial of Brequinar sodium (DuP 785; NSC 368390)', *Cancer Res*, 49: 4648-53.
- Asby, D. J., F. Cuda, M. Beyaert, F. D. Houghton, F. R. Cagampang, and A. Tavassoli. 2015. 'AMPK Activation via Modulation of De Novo Purine Biosynthesis with an Inhibitor of ATIC Homodimerization', *Chem Biol*, 22: 838-48.

B

- Badia, R., E. Ballana, M. Castellvi, E. Garcia-Vidal, M. Pujantell, B. Clotet, J. G. Prado, J. Puig, M. A. Martinez, E. Riveira-Munoz, and J. A. Este. 2018. 'CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir', *Nat Commun*, 9: 2739.
- Baldwin, S. A., P. R. Beal, S. Y. Yao, A. E. King, C. E. Cass, and J. D. Young. 2004. 'The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29', *Pflugers Arch*, 447: 735-43.
- Baldwin, S. A., S. Y. Yao, R. J. Hyde, A. M. Ng, S. Foppolo, K. Barnes, M. W. Ritzel, C. E. Cass, and J. D. Young. 2005. 'Functional characterization of novel human and mouse equilibrative

- nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes', *J Biol Chem*, 280: 15880-7.
- Ballana, E., and J. A. Este. 2015. 'SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction', *Trends Microbiol*, 23: 680-92.
- Barankiewicz, J., R. Jimenez, G. Ronlov, M. Magill, and H. E. Gruber. 1990. 'Alteration of purine metabolism by AICA-riboside in human B lymphoblasts', *Arch Biochem Biophys*, 282: 377-85.
- Baresova, V., V. Skopova, J. Sikora, D. Patterson, J. Sovova, M. Zikanova, and S. Kmoch. 2012. 'Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency', *Hum Mol Genet*, 21: 1534-43.
- Baresova, V., V. Skopova, O. Souckova, M. Krijt, S. Kmoch, and M. Zikanova. 2018. 'Study of purinosome assembly in cell-based model systems with de novo purine synthesis and salvage pathway deficiencies', *PLoS One*, 13: e0201432.
- Barnes, K., H. Dobrzynski, S. Foppolo, P. R. Beal, F. Ismat, E. R. Scullion, L. Sun, J. Tellez, M. W. Ritzel, W. C. Claycomb, C. E. Cass, J. D. Young, R. Billeter-Clark, M. R. Boyett, and S. A. Baldwin. 2006. 'Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH', *Circ Res*, 99: 510-9.
- Ben-Sahra, I., J. J. Howell, J. M. Asara, and B. D. Manning. 2013. 'Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1', *Science*, 339: 1323-8.
- Ben-Sahra, I., G. Hoxhaj, S. J. H. Ricoult, J. M. Asara, and B. D. Manning. 2016. 'mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle', *Science*, 351: 728-33.
- Bhutia, Y. D., S. W. Hung, B. Patel, D. Lovin, and R. Govindarajan. 2011. 'CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells', *Cancer Res*, 71: 1825-35.
- Bianchi, V., and J. Szychala. 2003. 'Mammalian 5'-nucleotidases', *J Biol Chem*, 278: 46195-8.
- Bicket, A., and I. R. Coe. 2016. 'N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function', *Biosci Rep*, 36.
- Bjursell, M. K., H. J. Blom, J. A. Cayuela, M. L. Engvall, N. Lesko, S. Balasubramaniam, G. Brandberg, M. Halldin, M. Falkenberg, C. Jakobs, D. Smith, E. Struys, U. von Döbeln, C. M. Gustafsson, J. Lundeberg, and A. Wedell. 2011. 'Adenosine kinase deficiency disrupts the methionine cycle and causes hypermethioninemia, encephalopathy, and abnormal liver function', *Am J Hum Genet*, 89: 507-15.
- Blau, N. 2016. 'Genetics of Phenylketonuria: Then and Now', *Hum Mutat*, 37: 508-15.
- Boison, D. 2013. 'Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain', *Pharmacol Rev*, 65: 906-43.
- Boison, D., L. Scheurer, V. Zumsteg, T. Rulicke, P. Litynski, B. Fowler, S. Brandner, and H. Mohler. 2002. 'Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 6985-90.
- Bouchard, J., and R. L. Momparler. 1983. 'Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase', *Mol Pharmacol*, 24: 109-14.
- Bronckaers, A., F. Gago, J. Balzarini, and S. Liekens. 2009. 'The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy', *Med Res Rev*, 29: 903-53.
- Buj, R., and K. M. Aird. 2018. 'Deoxyribonucleotide Triphosphate Metabolism in Cancer and Metabolic Disease', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9: 177.
- Burness, C. B., and S. T. Duggan. 2016. 'Trifluridine/Tipiracil: A Review in Metastatic Colorectal Cancer', *Drugs*, 76: 1393-402.

C

- Camara, Y., E. Gonzalez-Vioque, M. Scarpelli, J. Torres-Torronteras, and R. Marti. 2013. 'Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to rescue mitochondrial DNA', *Drug Discov Today*, 18: 950-7.
- Carre, M., N. Andre, G. Carles, H. Borghi, L. Bricchese, C. Briand, and D. Braguer. 2002. 'Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel', *J Biol Chem*, 277: 33664-9.
- Casado, M., C. Sierra, M. Batllori, R. Artuch, and A. Ormazabal. 2018. 'A targeted metabolomic procedure for amino acid analysis in different biological specimens by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Metabolomics*, 14: 76.
- Catala, A., M. Pastor-Anglada, L. Caviedes-Cardenas, R. Malatesta, S. Rives, N. Vega-Garcia, M. Camos, and P. Fernandez-Calotti. 2016. 'FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia', *Oncotarget*, 7: 49786-99.
- Cauchy, P., S. R. James, J. Zacarias-Cabeza, A. Ptasinska, M. R. Imperato, S. A. Assi, J. Piper, M. Canestraro, M. Hoogenkamp, M. Raghavan, J. Loke, S. Akiki, S. J. Clokie, S. J. Richards, D. R. Westhead, M. J. Griffiths, S. Ott, C. Bonifer, and P. N. Cockerill. 2015. 'Chronic FLT3-ITD Signaling in Acute Myeloid Leukemia Is Connected to a Specific Chromatin Signature', *Cell Rep*, 12: 821-36.
- Chern, C. L., R. F. Huang, Y. H. Chen, J. T. Cheng, and T. Z. Liu. 2001. 'Folate deficiency-induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NF-kappaB in human Hep G2 cells', *Biomed Pharmacother*, 55: 434-42.
- Clifford, R., T. Louis, P. Robbe, S. Ackroyd, A. Burns, A. T. Timbs, G. Wright Colopy, H. Dreau, F. Sigaux, J. G. Judde, M. Rotger, A. Telenti, Y. L. Lin, P. Pasero, J. Maelfait, M. Titsias, D. R. Cohen, S. J. Henderson, M. T. Ross, D. Bentley, P. Hillmen, A. Pettitt, J. Rehwinkel, S. J. Knight, J. C. Taylor, Y. J. Crow, M. Benkirane, and A. Schuh. 2014. 'SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage', *Blood*, 123: 1021-31.
- Cribier, A., B. Descours, A. L. Valadao, N. Laguette, and M. Benkirane. 2013. 'Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1', *Cell Rep*, 3: 1036-43.
- Cristalli, G., S. Costanzi, C. Lambertucci, G. Lupidi, S. Vittori, R. Volpini, and E. Camaioni. 2001. 'Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors', *Med Res Rev*, 21: 105-28.
- Cui, X. A., T. Agarwal, B. Singh, and R. S. Gupta. 2011. 'Molecular characterization of Chinese hamster cells mutants affected in adenosine kinase and showing novel genetic and biochemical characteristics', *BMC Biochem*, 12: 22.
- Cui, X. A., B. Singh, J. Park, and R. S. Gupta. 2009. 'Subcellular localization of adenosine kinase in mammalian cells: The long isoform of AdK is localized in the nucleus', *Biochem Biophys Res Commun*, 388: 46-50.
- Cunningham, J. T., M. V. Moreno, A. Lodi, S. M. Ronen, and D. Ruggero. 2014. 'Protein and nucleotide biosynthesis are coupled by a single rate-limiting enzyme, PRPS2, to drive cancer', *Cell*, 157: 1088-103.

D

- Daver, N., R. F. Schlenk, N. H. Russell, and M. J. Levis. 2019. 'Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence', *Leukemia*, 33: 299-312.
- De Pinto, V., A. Messina, D. J. Lane, and A. Lawen. 2010. 'Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane', *FEBS Lett*, 584: 1793-9.
- Dhillon, S. 2019. 'Gilteritinib: First Global Approval', *Drugs*, 79: 331-39.
- Dietz, A. A., and V. Czebotar. 1977. 'Purine metabolic cycle in normal and leukemic leukocytes', *Cancer Res*, 37: 419-26.
- Dixon, A. S., M. K. Schwinn, M. P. Hall, K. Zimmerman, P. Otto, T. H. Lubben, B. L. Butler, B. F. Binkowski, T. Machleidt, T. A. Kirkland, M. G. Wood, C. T. Eggers, L. P. Encell, and K. V. Wood. 2016. 'NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells', *ACS Chem Biol*, 11: 400-8.
- Dominguez-Gonzalez, C., M. Madruga-Garrido, F. Mavillard, C. Garone, F. J. Aguirre-Rodriguez, M. A. Donati, K. Kleinstauber, I. Marti, E. Martin-Hernandez, J. P. Morealejo-Aycinena, F. Munell, A. Nascimento, S. G. Kalko, M. D. Sardina, C. Alvarez Del Vayo, O. Serrano, Y. Long, Y. Tu, B. Levin, J. L. P. Thompson, K. Engelstad, J. Uddin, J. Torres-Torronteras, C. Jimenez-Mallebrera, R. Marti, C. Paradas, and M. Hirano. 2019. 'Deoxynucleoside Therapy for Thymidine Kinase 2-Deficient Myopathy', *Ann Neurol*, 86: 293-303.
- Donze, D. 2012. 'Extra-transcriptional functions of RNA Polymerase III complexes: TFIIIC as a potential global chromatin bookmark', *Gene*, 493: 169-75.
- Dragan, Y., R. Valdes, M. Gomez-Angelats, A. Felipe, F. Javier Casado, H. Pitot, and M. Pastor-Anglada. 2000. 'Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas', *Hepatology*, 32: 239-46.
- Ducker, G. S., and J. D. Rabinowitz. 2015. 'ZMP: a master regulator of one-carbon metabolism', *Mol Cell*, 57: 203-4.
- Duflot, S., B. Riera, S. Fernandez-Veledo, V. Casado, R. I. Norman, F. J. Casado, C. Lluís, R. Franco, and M. Pastor-Anglada. 2004. 'ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors', *Mol Cell Biol*, 24: 2710-9.

E

- Elion, G. B. 1989. 'Nobel lecture in physiology or medicine--1988. The purine path to chemotherapy', *In Vitro Cell Dev Biol*, 25: 321-30.
- Elter, T., M. Hallek, and A. Engert. 2006. 'Fludarabine in chronic lymphocytic leukaemia', *Expert Opin Pharmacother*, 7: 1641-51.
- Eltzschig, H. K., P. Abdulla, E. Hoffman, K. E. Hamilton, D. Daniels, C. Schonfeld, M. Loffler, G. Reyes, M. Duszenko, J. Karhausen, A. Robinson, K. A. Westerman, I. R. Coe, and S. P. Colgan. 2005. 'HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia', *J Exp Med*, 202: 1493-505.
- Emmanuel, N., S. Ragunathan, Q. Shan, F. Wang, A. Giannakou, N. Huser, G. Jin, J. Myers, R. T. Abraham, and K. Unsal-Kacmaz. 2017. 'Purine Nucleotide Availability Regulates mTORC1 Activity through the Rheb GTPase', *Cell Rep*, 19: 2665-80.
- Eriksson, S. 2013. 'Is the expression of deoxynucleoside kinases and 5'-nucleotidases in animal tissues related to the biological effects of nucleoside analogs?', *Curr Med Chem*, 20: 4241-8.
- Eriksson, S., B. Munch-Petersen, K. Johansson, and H. Eklund. 2002. 'Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases', *Cell Mol Life Sci*, 59: 1327-46.

- Errasti-Murugarren, E., F. J. Casado, and M. Pastor-Anglada. 2010. 'Different N-terminal motifs determine plasma membrane targeting of the human concentrative nucleoside transporter 3 in polarized and nonpolarized cells', *Mol Pharmacol*, 78: 795-803.
- Errasti-Murugarren, E., P. Fernandez-Calotti, M. Veyhl-Wichmann, M. Diepold, I. Pinilla-Macua, S. Perez-Torras, H. Kipp, H. Koepsell, and M. Pastor-Anglada. 2012. 'Role of the transporter regulator protein (RS1) in the modulation of concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia', *Mol Pharmacol*, 82: 59-67.
- Errasti-Murugarren, E., M. Molina-Arcas, F. J. Casado, and M. Pastor-Anglada. 2009. 'A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum', *FASEB J*, 23: 172-82.
- Evans, D. R., and H. I. Guy. 2004. 'Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway', *J Biol Chem*, 279: 33035-8.

F

- Farber, S., and L. K. Diamond. 1948. 'Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid', *N Engl J Med*, 238: 787-93.
- Farre, X., E. Guillen-Gomez, L. Sanchez, D. Hardisson, Y. Plaza, J. Lloberas, F. J. Casado, J. Palacios, and M. Pastor-Anglada. 2004. 'Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors', *Int J Cancer*, 112: 959-66.
- Fernandez-Calotti, P., O. Casulleras, M. Antolin, F. Guarner, and M. Pastor-Anglada. 2016. 'Galectin-4 interacts with the drug transporter human concentrative nucleoside transporter 3 to regulate its function', *FASEB J*, 30: 544-54.
- Fernandez-Calotti, P., 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: 13589-98.
- Fernandez-Calotti, P. X., M. Lopez-Guerra, D. Colomer, and M. Pastor-Anglada. 2012. 'Enhancement of fludarabine sensitivity by all-trans-retinoic acid in chronic lymphocytic leukemia cells', *Haematologica*, 97: 943-51.
- Fernandez-Veledo, S., R. Jover, F. J. Casado, M. J. Gomez-Lechon, and M. Pastor-Anglada. 2007. 'Transcription factors involved in the expression of SLC28 genes in human liver parenchymal cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 353: 381-8.
- Fisher, M. N., and E. A. Newsholme. 1984. 'Properties of rat heart adenosine kinase', *Biochem J*, 221: 521-8.
- Franzolin, E., G. Pontarin, C. Rampazzo, C. Miazzi, P. Ferraro, E. Palumbo, P. Reichard, and V. Bianchi. 2013. 'The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 14272-7.
- Fredholm, B. B. 2007. 'Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair', *Cell Death Differ*, 14: 1315-23.
- French, J. B., S. A. Jones, H. Deng, A. M. Pedley, D. Kim, C. Y. Chan, H. Hu, R. J. Pugh, H. Zhao, Y. Zhang, T. J. Huang, Y. Fang, X. Zhuang, and S. J. Benkovic. 2016. 'Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria', *Science*, 351: 733-7.

G

- Galmarini, C. M., X. Thomas, K. Graham, A. El Jafaari, E. Cros, L. Jordheim, J. R. Mackey, and C. Dumontet. 2003. 'Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells

- predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine', *Br J Haematol*, 122: 53-60.
- Gao, X., S. M. Sanderson, Z. Dai, M. A. Reid, D. E. Cooper, M. Lu, J. P. Richie, Jr., A. Ciccarella, A. Calcagnotto, P. G. Mikhael, S. J. Mentch, J. Liu, G. Ables, D. G. Kirsch, D. S. Hsu, S. N. Nichenametla, and J. W. Locasale. 2019. 'Dietary methionine influences therapy in mouse cancer models and alters human metabolism', *Nature*, 572: 397-401.
- Garcia-Vidal, E., R. Badia, M. Pujantell, M. Castellvi, E. Felip, B. Clotet, E. Riveira-Munoz, E. Ballana, and J. A. Este. 2019. 'Dual effect of the broad spectrum kinase inhibitor midostaurin in acute and latent HIV-1 infection', *Antiviral Res*, 168: 18-27.
- Geiduschek, E. P., and G. A. Kassavetis. 2001. 'The RNA polymerase III transcription apparatus', *J Mol Biol*, 310: 1-26.
- Godoy, V., J. M. Banales, J. F. Medina, and M. Pastor-Anglada. 2014. 'Functional crosstalk between the adenosine transporter CNT3 and purinergic receptors in the biliary epithelia', *J Hepatol*, 61: 1337-43.
- Goldstone, D. C., V. Ennis-Adeniran, J. J. Hedden, H. C. Groom, G. I. Rice, E. Christodoulou, P. A. Walker, G. Kelly, L. F. Haire, M. W. Yap, L. P. de Carvalho, J. P. Stoye, Y. J. Crow, I. A. Taylor, and M. Webb. 2011. 'HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase', *Nature*, 480: 379-82.
- Gorraitz, E., M. Pastor-Anglada, and M. P. Lostao. 2010. 'Effects of Na⁺ and H⁺ on steady-state and presteady-state currents of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3)', *Pflugers Arch*, 460: 617-32.
- Govindarajan, R., G. P. Leung, M. Zhou, C. M. Tse, J. Wang, and J. D. Unadkat. 2009. 'Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296: G910-22.
- Grane-Boladeras, N., S. Perez-Torras, J. J. Lozano, M. R. Romero, A. Mazo, J. J. G. Marin, and M. Pastor-Anglada. 2016. 'Pharmacogenomic analysis of the responsiveness of gastrointestinal tumor cell lines to drug therapy: A transportome approach', *Pharmacol Res*, 113: 364-75.
- Grane-Boladeras, N., C. M. Spring, W. J. Hanna, M. Pastor-Anglada, and I. R. Coe. 2016. 'Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir', *Cell Mol Life Sci*, 73: 4559-75.
- Grane-Boladeras, N., D. Williams, Z. Tarmakova, K. Stevanovic, L. A. Villani, P. Mehrabi, K. W. M. Siu, M. Pastor-Anglada, and I. R. Coe. 2019. 'Oligomerization of equilibrative nucleoside transporters: a novel regulatory and functional mechanism involving PKC and PP1', *FASEB J*, 33: 3841-50.
- Grant, S. 1998. 'Ara-C: cellular and molecular pharmacology', *Adv Cancer Res*, 72: 197-233.
- Graves, L. M., H. I. Guy, P. Kozlowski, M. Huang, E. Lazarowski, R. M. Pope, M. A. Collins, E. N. Dahlstrand, H. S. Earp, 3rd, and D. R. Evans. 2000. 'Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase', *Nature*, 403: 328-32.
- Guigas, B., N. Taleux, M. Foretz, D. Detaille, F. Andreelli, B. Viollet, and L. Hue. 2007. 'AMP-activated protein kinase-independent inhibition of hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation by AICA riboside', *Biochem J*, 404: 499-507.
- Guzman-Gutierrez, E., C. Sandoval, E. Nova, J. L. Castillo, J. C. Vera, L. Lamperti, B. Krause, C. Salomon, C. Sepulveda, C. Aguayo, and L. Sobrevia. 2010. 'Differential expression of functional nucleoside transporters in non-differentiated and differentiated human endothelial progenitor cells', *Placenta*, 31: 928-36.

H

- Hamilton, S. R., S. Y. Yao, J. C. Ingram, D. A. Hadden, M. W. Ritzel, M. P. Gallagher, P. J. Henderson, C. E. Cass, J. D. Young, and S. A. Baldwin. 2001. 'Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1', *J Biol Chem*, 276: 27981-8.
- Herold, N., S. G. Rudd, L. Ljungblad, K. Sanjiv, I. H. Myrberg, C. B. Paulin, Y. Heshmati, A. Hagenkort, J. Kutzner, B. D. Page, J. M. Calderon-Montano, O. Loseva, A. S. Jemth, L. Bulli, H. Axelsson, B. Tesi, N. C. Valerie, A. Hoglund, J. Bladh, E. Wiita, M. Sundin, M. Uhlin, G. Rassidakis, M. Heyman, K. P. Tamm, U. Warpman-Berglund, J. Walfridsson, S. Lehmann, D. Grandner, T. Lundback, P. Kogner, J. I. Henter, T. Helleday, and T. Schaller. 2017. 'Targeting SAMHD1 with the Vpx protein to improve cytarabine therapy for hematological malignancies', *Nat Med*, 23: 256-63.
- Herold, N., S. G. Rudd, K. Sanjiv, J. Kutzner, I. H. Myrberg, C. B. J. Paulin, T. K. Olsen, T. Helleday, J. I. Henter, and T. Schaller. 2017. 'With me or against me: Tumor suppressor and drug resistance activities of SAMHD1', *Exp Hematol*, 52: 32-39.
- Hirschi, M., Z. L. Johnson, and S. Y. Lee. 2017. 'Visualizing multistep elevator-like transitions of a nucleoside transporter', *Nature*, 545: 66-70.
- Hofer, A., M. Crona, D. T. Logan, and B. M. Sjoberg. 2012. 'DNA building blocks: keeping control of manufacture', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47: 50-63.
- Hoxhaj, G., J. Hughes-Hallett, R. C. Timson, E. Ilagan, M. Yuan, J. M. Asara, I. Ben-Sahra, and B. D. Manning. 2017. 'The mTORC1 Signaling Network Senses Changes in Cellular Purine Nucleotide Levels', *Cell Rep*, 21: 1331-46.
- Huber-Ruano, I., E. Errasti-Murugarren, V. Godoy, A. Vera, A. L. Andreu, E. Garcia-Arumi, R. Marti, and M. Pastor-Anglada. 2012. 'Functional outcome of a novel SLC29A3 mutation identified in a patient with H syndrome', *Biochem Biophys Res Commun*, 428: 532-7.
- Huber-Ruano, I., I. Pinilla-Macua, G. Torres, F. J. Casado, and M. Pastor-Anglada. 2010. 'Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells', *J Cell Physiol*, 225: 620-30.
- Hughes, S. J., X. Cravetchi, G. Vilas, and J. R. Hammond. 2015. 'Adenosine A1 receptor activation modulates human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) activity via PKC-mediated phosphorylation of serine-281', *Cell Signal*, 27: 1008-18.

I

- Ichinose, H., T. Nomura, and C. Sumi-Ichinose. 2008. 'Metabolism of tetrahydrobiopterin: its relevance in monoaminergic neurons and neurological disorders', *Chem Rec*, 8: 378-85.

J

- James, S. J., S. Melnyk, M. Pogribna, I. P. Pogribny, and M. A. Caudill. 2002. 'Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology', *J Nutr*, 132: 2361S-66S.
- Ji, X., C. Tang, Q. Zhao, W. Wang, and Y. Xiong. 2014. 'Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E4305-14.
- Johansson, P., L. Klein-Hitpass, A. Choidas, P. Habenberger, B. Mahboubi, B. Kim, A. Bergmann, R. Scholtysik, M. Brauser, A. Lollies, R. Siebert, T. Zenz, U. Duhrsen, R. Kuppens, and J. Durig. 2018. 'SAMHD1 is recurrently mutated in T-cell prolymphocytic leukemia', *Blood Cancer J*, 8: 11.

- Johnson, Z. L., C. G. Cheong, and S. Y. Lee. 2012. 'Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å', *Nature*, 483: 489-93.
- Jordheim, L. P., D. Durantel, F. Zoulim, and C. Dumontet. 2013. 'Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 12: 447-64.
- Jordheim, L. P., Z. Marton, M. Rhimi, E. Cros-Perrial, C. Lionne, S. Peyrottes, C. Dumontet, N. Aghajari, and L. Chaloin. 2013. 'Identification and characterization of inhibitors of cytoplasmic 5'-nucleotidase cN-II issued from virtual screening', *Biochem Pharmacol*, 85: 497-506.
- Jurecka, A. 2009. 'Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism', *J Inherit Metab Dis*, 32: 247-63.

K

- Kanarek, N., H. R. Keys, J. R. Cantor, C. A. Lewis, S. H. Chan, T. Kunchok, M. Abu-Remaileh, E. Freinkman, L. D. Schweitzer, and D. M. Sabatini. 2018. 'Histidine catabolism is a major determinant of methotrexate sensitivity', *Nature*, 559: 632-36.
- Kang, H., C. S. Wilson, R. C. Harvey, I. M. Chen, M. H. Murphy, S. R. Atlas, E. J. Bedrick, M. Devidas, A. J. Carroll, B. W. Robinson, R. W. Stam, M. G. Valsecchi, R. Pieters, N. A. Heerema, J. M. Hilden, C. A. Felix, G. H. Reaman, B. Camitta, N. Winick, W. L. Carroll, Z. E. Dreyer, S. P. Hunger, and C. L. Willman. 2012. 'Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study', *Blood*, 119: 1872-81.
- Karran, P. 2006. 'Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer', *Br Med Bull*, 79-80: 153-70.
- Kaufman, S., N. A. Holtzman, S. Milstien, L. J. Butler, and A. Krumholz. 1975. 'Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase', *N Engl J Med*, 293: 785-90.
- Kim, E. S. 2017. 'Midostaurin: First Global Approval', *Drugs*, 77: 1251-59.
- Kim, P. B., J. W. Nelson, and R. R. Breaker. 2015. 'An ancient riboswitch class in bacteria regulates purine biosynthesis and one-carbon metabolism', *Mol Cell*, 57: 317-28.
- Klein, K., G. A. Kullak-Ublick, M. Wagner, M. Trauner, and J. J. Eloranta. 2009. 'Hepatocyte nuclear factor-4alpha and bile acids regulate human concentrative nucleoside transporter-1 gene expression', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296: G936-47.
- Knecht, K. M., O. Buzovetsky, C. Schneider, D. Thomas, V. Srikanth, L. Kaderali, F. Tofoleanu, K. Reiss, N. Ferreiros, G. Geisslinger, V. S. Batista, X. Ji, J. Cinatl, Jr., O. T. Keppler, and Y. Xiong. 2018. 'The structural basis for cancer drug interactions with the catalytic and allosteric sites of SAMHD1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E10022-E31.
- Koch, J., J. A. Mayr, B. Alhaddad, C. Rauscher, J. Bierau, R. Kovacs-Nagy, K. L. Coene, I. Bader, M. Holzhaecker, H. Prokisch, H. Venselaar, R. A. Wevers, F. Distelmaier, T. Polster, S. Leiz, C. Betzler, T. M. Strom, W. Sperl, T. Meitinger, S. B. Wortmann, and T. B. Haack. 2017. 'CAD mutations and uridine-responsive epileptic encephalopathy', *Brain*, 140: 279-86.
- Kollareddy, M., E. Dimitrova, K. C. Vallabhaneni, A. Chan, T. Le, K. M. Chauhan, Z. I. Carrero, G. Ramakrishnan, K. Watabe, Y. Haupt, S. Haupt, R. Pochampally, G. R. Boss, D. G. Romero, C. G. Radu, and L. A. Martinez. 2015. 'Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities', *Nat Commun*, 6: 7389.
- Kumar, D., A. L. Abdulovic, J. Viberg, A. K. Nilsson, T. A. Kunkel, and A. Chabes. 2011. 'Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools', *Nucleic Acids Res*, 39: 1360-71.

L

- Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Segeral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz, and M. Benkirane. 2011. 'SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx', *Nature*, 474: 654-7.
- Lai, Y., C. M. Tse, and J. D. Unadkat. 2004. 'Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs', *J Biol Chem*, 279: 4490-7.
- Lane, A. N., and T. W. Fan. 2015. 'Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis', *Nucleic Acids Res*, 43: 2466-85.
- Larrayoz, I. M., F. J. Casado, M. Pastor-Anglada, and M. P. Lostao. 2004. 'Electrophysiological characterization of the human Na(+)/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function', *J Biol Chem*, 279: 8999-9007.
- Larrosa-Garcia, M., and M. R. Baer. 2017. 'FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions', *Mol Cancer Ther*, 16: 991-1001.
- Levis, M., R. Pham, B. D. Smith, and D. Small. 2004. 'In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects', *Blood*, 104: 1145-50.
- Liu, M., Y. Zhang, J. Yang, X. Cui, Z. Zhou, H. Zhan, K. Ding, X. Tian, Z. Yang, K. A. Fung, B. H. Edil, R. G. Postier, M. S. Bronze, M. E. Fernandez-Zapico, M. P. Stemmler, T. Brabletz, Y. P. Li, C. W. Houchen, and M. Li. 2019. 'ZIP4 Increases Expression of Transcription Factor ZEB1 to Promote Integrin alpha3beta1 Signaling and Inhibit Expression of the Gemcitabine Transporter ENT1 in Pancreatic Cancer Cells', *Gastroenterology*.
- Liu, Y. C., F. Li, J. Handler, C. R. Huang, Y. Xiang, N. Neretti, J. M. Sedivy, K. I. Zeller, and C. V. Dang. 2008. 'Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc', *PLoS One*, 3: e2722.
- Locasale, J. W. 2013. 'Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle', *Nat Rev Cancer*, 13: 572-83.
- Luengo, A., D. Y. Gui, and M. G. Vander Heiden. 2017. 'Targeting Metabolism for Cancer Therapy', *Cell Chem Biol*, 24: 1161-80.
- Luhby, A. L., and J. M. Cooperman. 1962. 'Aminoimidazolecarboxamide excretion in vitamin-B12 and folic-acid deficiencies', *Lancet*, 2: 1381-2.

M

- Maddocks, O. D. K., D. Athineos, E. C. Cheung, P. Lee, T. Zhang, N. J. F. van den Broek, G. M. Mackay, C. F. Labuschagne, D. Gay, F. Kruiswijk, J. Blagih, D. F. Vincent, K. J. Campbell, F. Ceteci, O. J. Sansom, K. Blyth, and K. H. Vousden. 2017. 'Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation', *Nature*, 544: 372-76.
- Mannava, S., V. Grachtchouk, L. J. Wheeler, M. Im, D. Zhuang, E. G. Slavina, C. K. Mathews, D. S. Shewach, and M. A. Nikiforov. 2008. 'Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells', *Cell Cycle*, 7: 2392-400.
- Mathews, C. K. 2006. 'DNA precursor metabolism and genomic stability', *FASEB J*, 20: 1300-14.
- . 2015. 'Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer', *Nat Rev Cancer*, 15: 528-39.
- Mauney, C. H., and T. Hollis. 2018. 'SAMHD1: Recurring roles in cell cycle, viral restriction, cancer, and innate immunity', *Autoimmunity*, 51: 96-110.
- Medina-Pulido, L., M. Molina-Arcas, C. Justicia, E. Soriano, F. Burgaya, A. M. Planas, and M. Pastor-Anglada. 2013. 'Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity

- concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells', *Biochem J*, 454: 437-45.
- Meshinchi, S., T. A. Alonzo, D. L. Stirewalt, M. Zwaan, M. Zimmerman, D. Reinhardt, G. J. Kaspers, N. A. Heerema, R. Gerbing, B. J. Lange, and J. P. Radich. 2006. 'Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML', *Blood*, 108: 3654-61.
- Minuesa, G., S. Purcet, I. Erkizia, M. Molina-Arcas, M. Bofill, N. Izquierdo-Useros, F. J. Casado, B. Clotet, M. Pastor-Anglada, and J. Martinez-Picado. 2008. 'Expression and functionality of anti-human immunodeficiency virus and anticancer drug uptake transporters in immune cells', *J Pharmacol Exp Ther*, 324: 558-67.
- Molho-Pessach, V., I. Lerer, D. Abeliovich, Z. Agha, A. Abu Libdeh, V. Broshtilova, O. Elpeleg, and A. Zlotogorski. 2008. 'The H syndrome is caused by mutations in the nucleoside transporter hENT3', *Am J Hum Genet*, 83: 529-34.
- Molina-Arcas, M., B. Bellosillo, F. J. Casado, E. Montserrat, J. Gil, D. Colomer, and M. Pastor-Anglada. 2003. 'Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia', *Blood*, 101: 2328-34.
- Monostori, P., G. Klinke, J. Hauke, S. Richter, J. Bierau, S. F. Garbade, G. F. Hoffmann, C. D. Langhans, D. Haas, and J. G. Okun. 2019. 'Extended diagnosis of purine and pyrimidine disorders from urine: LC MS/MS assay development and clinical validation', *PLoS One*, 14: e0212458.
- Montero, T. D., D. Racordon, L. Bravo, G. I. Owen, M. L. Bronfman, and A. V. Leisewitz. 2012. 'PPARalpha and PPARgamma regulate the nucleoside transporter hENT1', *Biochem Biophys Res Commun*, 419: 405-11.
- Moreno-Morcillo, M., A. Grande-Garcia, A. Ruiz-Ramos, F. Del Cano-Ochoa, J. Boskovic, and S. Ramon-Maiques. 2017. 'Structural Insight into the Core of CAD, the Multifunctional Protein Leading De Novo Pyrimidine Biosynthesis', *Structure*, 25: 912-23 e5.

N

- Nair, S., A. M. Strohecker, A. K. Persaud, B. Bissa, S. Muruganandan, C. McElroy, R. Pathak, M. Williams, R. Raj, A. Kaddoumi, A. Sparreboom, A. M. Beedle, and R. Govindarajan. 2019. 'Adult stem cell deficits drive Slc29a3 disorders in mice', *Nat Commun*, 10: 2943.
- Nikkanen, J., S. Forsstrom, L. Euro, I. Paetau, R. A. Kohnz, L. Wang, D. Chilov, J. Viinamaki, A. Roivainen, P. Marjamaki, H. Liljenback, S. Ahola, J. Buzkova, M. Terzioglu, N. A. Khan, S. Pirnes-Karhu, A. Paetau, T. Lonnqvist, A. Sajantila, P. Isohanni, H. Tynnismaa, D. K. Nomura, B. J. Battersby, V. Velagapudi, C. J. Carroll, and A. Suomalainen. 2016. 'Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism', *Cell Metab*, 23: 635-48.
- Nilsson, R., M. Jain, N. Madhusudhan, N. G. Sheppard, L. Strittmatter, C. Kampf, J. Huang, A. Asplund, and V. K. Mootha. 2014. 'Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer', *Nat Commun*, 5: 3128.
- Nishino, I., A. Spinazzola, and M. Hirano. 1999. 'Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder', *Science*, 283: 689-92.
- Noe, D. A., E. K. Rowinsky, H. S. Shen, B. V. Clarke, L. B. Grochow, W. B. McGuire, A. Hantel, D. B. Adams, M. D. Abeloff, D. S. Ettinger, and et al. 1990. 'Phase I and pharmacokinetic study of brequinar sodium (NSC 368390)', *Cancer Res*, 50: 4595-9.
- Nordlund, P., and P. Reichard. 2006. 'Ribonucleotide reductases', *Annu Rev Biochem*, 75: 681-706.
- Nyiri, K., H. D. T. Mertens, B. Tihanyi, G. N. Nagy, B. Kohegyi, J. Matejka, M. J. Harris, J. E. Szabo, V. Papp-Kadar, V. Nemeth-Pongracz, O. Ozohanics, K. Vekey, D. I. Svergun, A. J. Borysik, and B. G. Vertessy. 2018. 'Structural model of human dUTPase in complex with a novel proteinaceous inhibitor', *Sci Rep*, 8: 4326.

O

- Ochs, H. D., J. E. Yount, E. R. Giblett, S. H. Chen, C. R. Scott, and R. J. Wedgwood. 1973. 'Adenosine-deaminase deficiency and severe combined immunodeficiency syndrome', *Lancet*, 1: 1393-4.
- Oeckinghaus, A., and S. Ghosh. 2009. 'The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a000034.
- Ormazabal, A., A. Garcia-Cazorla, B. Perez-Duenas, V. Gonzalez, E. Fernandez-Alvarez, M. Pineda, J. Campistol, and R. Artuch. 2006. 'Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients: reference values for a paediatric population', *Clin Chim Acta*, 371: 159-62.
- Ostruszka, L. J., and D. S. Shewach. 2003. 'The role of DNA synthesis inhibition in the cytotoxicity of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine', *Cancer Chemother Pharmacol*, 52: 325-32.
- Ozeki, K., H. Kiyoi, Y. Hirose, M. Iwai, M. Ninomiya, Y. Kodera, S. Miyawaki, K. Kuriyama, C. Shimazaki, H. Akiyama, M. Nishimura, T. Motoji, K. Shinagawa, A. Takeshita, R. Ueda, R. Ohno, N. Emi, and T. Naoe. 2004. 'Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia', *Blood*, 103: 1901-8.

P

- Parker, W. B. 2009. 'Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer', *Chem Rev*, 109: 2880-93.
- Parker, W. B., S. C. Shaddix, C. H. Chang, E. L. White, L. M. Rose, R. W. Brockman, A. T. Shortnacy, J. A. Montgomery, J. A. Secrist, 3rd, and L. L. Bennett, Jr. 1991. 'Effects of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)adenine on K562 cellular metabolism and the inhibition of human ribonucleotide reductase and DNA polymerases by its 5'-triphosphate', *Cancer Res*, 51: 2386-94.
- Pastor-Anglada, M., P. Cano-Soldado, E. Errasti-Murugarren, and F. J. Casado. 2008. 'SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins', *Xenobiotica*, 38: 972-94.
- Pastor-Anglada, M., and S. Perez-Torras. 2015. 'Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets', *Front Pharmacol*, 6: 13.
- . 2018a. 'Emerging Roles of Nucleoside Transporters', *Front Pharmacol*, 9: 606.
- . 2018b. 'Who Is Who in Adenosine Transport', *Front Pharmacol*, 9: 627.
- Pastor-Anglada, M., N. Urtasun, and S. Perez-Torras. 2018. 'Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation', *Compr Physiol*, 8: 1003-17.
- Pedley, A. M., and S. J. Benkovic. 2017. 'A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome', *Trends Biochem Sci*, 42: 141-54.
- Pelet, A., V. Skopova, U. Steuerwald, V. Baresova, M. Zarhrate, J. M. Plaza, A. Hnizda, M. Krijt, O. Souckova, F. Wibrand, G. Andorsdottir, F. Joensen, D. Sedlak, A. J. Bleyer, S. Knoch, S. Lyonnet, and M. Zikanova. 2019. 'PAICS deficiency, a new defect of de novo purine synthesis resulting in multiple congenital anomalies and fatal outcome', *Hum Mol Genet*, 28: 3805-14.
- Perello-Reus, C. M., A. Catala, L. Caviedes-Cardenas, N. Vega-Garcia, M. Camos, S. Perez-Torras, and M. Pastor-Anglada. 2020. 'FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) modulates key enzymes of nucleotide metabolism implicated in cytarabine responsiveness in pediatric acute leukemia', *Pharmacol Res*, 151: 104556.
- Perez-Torras, S., A. Mata-Ventosa, B. Drogemoller, M. Tarailo-Graovac, J. Meijer, R. Meinsma, A. G. van Cruchten, W. Kulik, A. Viel-Oliva, A. Bidon-Chanal, C. J. Ross, W. W. Wassermann, C. D. M. van Karnebeek, M. Pastor-Anglada, and A. B. P. van Kuilenburg. 2019. 'Deficiency of perforin and hCNT1, a novel inborn error of pyrimidine metabolism,

- associated with a rapidly developing lethal phenotype due to multi-organ failure', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865: 1182-91.
- Perez-Torras, S., A. Vidal-Pla, P. Cano-Soldado, I. Huber-Ruano, A. Mazo, and M. Pastor-Anglada. 2013. 'Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner', *Cell Death Dis*, 4: e648.
- Peters, G. J., I. Kraal, and H. M. Pinedo. 1992. 'In vitro and in vivo studies on the combination of Brequinar sodium (DUP-785; NSC 368390) with 5-fluorouracil; effects of uridine', *Br J Cancer*, 65: 229-33.
- Pollock, R. J., and S. Kaufman. 1978. 'Dihydropteridine reductase may function in tetrahydrofolate metabolism', *J Neurochem*, 31: 115-23.
- Ponzone, A., M. Spada, S. Ferraris, I. Dianzani, and L. de Sanctis. 2004. 'Dihydropteridine reductase deficiency in man: from biology to treatment', *Med Res Rev*, 24: 127-50.
- Puebla, C., M. Farias, M. Gonzalez, A. Vecchiola, C. Aguayo, B. Krause, M. Pastor-Anglada, P. Casanello, and L. Sobrevia. 2008. 'High D-glucose reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving specific protein 1 in human umbilical vein endothelium', *J Cell Physiol*, 215: 645-56.
- Pugmire, M. J., and S. E. Ealick. 2002. 'Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases', *Biochem J*, 361: 1-25.

Q

- Queisser, N., P. I. Oteiza, H. Stopper, R. G. Oli, and N. Schupp. 2011. 'Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-kappaB-activation in kidney tubule cells', *Mol Carcinog*, 50: 123-35.

R

- Rakovich, T., C. Boland, I. Bernstein, V. M. Chikwana, D. Iwata-Reuyl, and V. P. Kelly. 2011. 'Queuosine deficiency in eukaryotes compromises tyrosine production through increased tetrahydrobiopterin oxidation', *J Biol Chem*, 286: 19354-63.
- Rampazzo, C., C. Miazzi, E. Franzolin, G. Pontarin, P. Ferraro, M. Frangini, P. Reichard, and V. Bianchi. 2010. 'Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances', *Mutat Res*, 703: 2-10.
- Rampazzo, C., M. G. Tozzi, C. Dumontet, and L. P. Jordheim. 2016. 'The druggability of intracellular nucleotide-degrading enzymes', *Cancer Chemother Pharmacol*, 77: 883-93.
- Reichard, P. 1988. 'Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis', *Annu Rev Biochem*, 57: 349-74.
- Reyes, G., N. M. Nivillac, M. Z. Karim, L. Desouza, K. W. Siu, and I. R. Coe. 2011. 'The Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT1) can be phosphorylated at multiple sites by PKC and PKA', *Mol Membr Biol*, 28: 412-26.
- Rice, G. I., J. Bond, A. Asipu, R. L. Brunette, I. W. Manfield, I. M. Carr, J. C. Fuller, R. M. Jackson, T. Lamb, T. A. Briggs, M. Ali, H. Gornall, L. R. Couthard, A. Aeby, S. P. Attard-Montalto, E. Bertini, C. Bodemer, K. Brockmann, L. A. Brueton, P. C. Corry, I. Desguerre, E. Fazzi, A. G. Cazorla, B. Gener, B. C. Hamel, A. Heiberg, M. Hunter, M. S. van der Knaap, R. Kumar, L. Lagae, P. G. Landrieu, C. M. Lourenco, D. Marom, M. F. McDermott, W. van der Merwe, S. Orcesi, J. S. Prendiville, M. Rasmussen, S. A. Shalev, D. M. Soler, M. Shinawi, R. Spiegel, T. Y. Tan, A. Vanderver, E. L. Wakeling, E. Wassmer, E. Whittaker, P. Lebon, D. B. Stetson, D. T. Bonthron, and Y. J. Crow. 2009. 'Mutations involved in Aicardi-Goutieres syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response', *Nat Genet*, 41: 829-32.

- Ritzel, M. W., A. M. Ng, S. Y. Yao, K. Graham, S. K. Loewen, K. M. Smith, R. G. Ritzel, D. A. Mowles, P. Carpenter, X. Z. Chen, E. Karpinski, R. J. Hyde, S. A. Baldwin, C. E. Cass, and J. D. Young. 2001. 'Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib)', *J Biol Chem*, 276: 2914-27.
- Robitaille, A. M., S. Christen, M. Shimobayashi, M. Cornu, L. L. Fava, S. Moes, C. Prescianotto-Baschong, U. Sauer, P. Jenoe, and M. N. Hall. 2013. 'Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis', *Science*, 339: 1320-3.
- Rodriguez-Mulero, S., E. Errasti-Murugarren, J. Ballarin, A. Felipe, A. Doucet, F. J. Casado, and M. Pastor-Anglada. 2005. 'Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: effect of diabetes', *Kidney Int*, 68: 665-72.
- Rostovtseva, T. K., K. L. Sheldon, E. Hassanzadeh, C. Monge, V. Saks, S. M. Bezrukov, and D. L. Sackett. 2008. 'Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 18746-51.

S

- Saada, A., A. Shaag, H. Mandel, Y. Nevo, S. Eriksson, and O. Elpeleg. 2001. 'Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy', *Nat Genet*, 29: 342-4.
- Sabatini, D. M. 2017. 'Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 11818-25.
- Schaller, T., and N. Herold. 2019. 'Evidence for SAMHD1 Tumor Suppressor Functions in Acute Myeloid Leukemia', *Acta Haematol*: 1-2.
- Schneider, C., T. Oellerich, H. M. Baldauf, S. M. Schwarz, D. Thomas, R. Flick, H. Bohnenberger, L. Kaderali, L. Stegmann, A. Cremer, M. Martin, J. Lohmeyer, M. Michaelis, V. Hornung, C. Schliemann, W. E. Berdel, W. Hartmann, E. Wardelmann, F. Comoglio, M. L. Hansmann, A. F. Yakunin, G. Geisslinger, P. Strobel, N. Ferreiros, H. Serve, O. T. Keppler, and J. Cinatl, Jr. 2017. 'SAMHD1 is a biomarker for cytarabine response and a therapeutic target in acute myeloid leukemia', *Nat Med*, 23: 250-55.
- Serdjebi, C., G. Milano, and J. Ciccolini. 2015. 'Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs', *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 11: 665-72.
- Sexauer, A. N., and S. K. Tasian. 2017. 'Targeting FLT3 Signaling in Childhood Acute Myeloid Leukemia', *Front Pediatr*, 5: 248.
- Sigoillot, F. D., D. R. Evans, and H. I. Guy. 2002. 'Growth-dependent regulation of mammalian pyrimidine biosynthesis by the protein kinase A and MAPK signaling cascades', *J Biol Chem*, 277: 15745-51.
- Sigoillot, F. D., D. H. Kotsis, E. M. Masko, M. Bame, D. R. Evans, and H. I. Evans. 2007. 'Protein kinase C modulates the up-regulation of the pyrimidine biosynthetic complex, CAD, by MAP kinase', *Front Biosci*, 12: 3892-8.
- Small, D., M. Levenstein, E. Kim, C. Carow, S. Amin, P. Rockwell, L. Witte, C. Burrow, M. Z. Ratajczak, A. M. Gewirtz, and et al. 1994. 'STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34⁺ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 459-63.
- Smith, I., and J. Lloyd. 1974. 'Proceedings: Atypical phenylketonuria accompanied by a severe progressive neurological illness unresponsive to dietary treatment', *Arch Dis Child*, 49: 245.
- Smith, K. M., L. Bauer, M. Fischer, R. Barkley, and B. A. Navia. 2005. 'Identification and characterization of human NR4A2 polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 133B: 57-63.

- Snider, J., S. Kittanakom, D. Damjanovic, J. Curak, V. Wong, and I. Stagljar. 2010. 'Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast', *Nat Protoc*, 5: 1281-93.
- Stecula, A., A. Schlessinger, K. M. Giacomini, and A. Sali. 2017. 'Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 (hCNT3, SLC28A3) Forms a Cyclic Homotrimer', *Biochemistry*, 56: 3475-83.
- Steliarova-Foucher, E., M. Colombet, L. A. G. Ries, F. Moreno, A. Dolya, F. Bray, P. Hesselting, H. Y. Shin, C. A. Stiller, and IICC contributors. 2017. 'International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study', *Lancet Oncol*, 18: 719-31.
- Stirewalt, D. L., and J. P. Radich. 2003. 'The role of FLT3 in haematopoietic malignancies', *Nat Rev Cancer*, 3: 650-65.
- Sundaram, M., S. Y. Yao, A. M. Ng, C. E. Cass, S. A. Baldwin, and J. D. Young. 2001. 'Equilibrative nucleoside transporters: mapping regions of interaction for the substrate analogue nitrobenzylthioinosine (NBMPR) using rat chimeric proteins', *Biochemistry*, 40: 8146-51.
- Sykes, D. B. 2018. 'The emergence of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) as a therapeutic target in acute myeloid leukemia', *Expert Opin Ther Targets*, 22: 893-98.
- Sykes, D. B., Y. S. Kfoury, F. E. Mercier, M. J. Wawer, J. M. Law, M. K. Haynes, T. A. Lewis, A. Schajnovitz, E. Jain, D. Lee, H. Meyer, K. A. Pierce, N. J. Tolliday, A. Waller, S. J. Ferrara, A. L. Eheim, D. Stoeckigt, K. L. Maxcy, J. M. Cobert, J. Bachand, B. A. Szekely, S. Mukherjee, L. A. Sklar, J. D. Kotz, C. B. Clish, R. I. Sadreyev, P. A. Clemons, A. Janzer, S. L. Schreiber, and D. T. Scadden. 2016. 'Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase Overcomes Differentiation Blockade in Acute Myeloid Leukemia', *Cell*, 167: 171-86 e15.

T

- Takahashi, K., K. Yoshisue, M. Chiba, T. Nakanishi, and I. Tamai. 2018. 'Contribution of equilibrative nucleoside transporter(s) to intestinal basolateral and apical transports of anticancer trifluridine', *Biopharm Drug Dispos*, 39: 38-46.
- Tanaka, H., H. Arakawa, T. Yamaguchi, K. Shiraiishi, S. Fukuda, K. Matsui, Y. Takei, and Y. Nakamura. 2000. 'A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage', *Nature*, 404: 42-9.
- Thony, B., and N. Blau. 2006. 'Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase', *Hum Mutat*, 27: 870-8.
- Tibbetts, A. S., and D. R. Appling. 2010. 'Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism', *Annu Rev Nutr*, 30: 57-81.
- Torres, R. J., and J. G. Puig. 2007. 'Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome', *Orphanet J Rare Dis*, 2: 48.
- Tramontozzi, E., P. Ferraro, M. Hossain, B. Stillman, V. Bianchi, and G. Pontarin. 2018. 'The dNTP triphosphohydrolase activity of SAMHD1 persists during S-phase when the enzyme is phosphorylated at T592', *Cell Cycle*, 17: 1102-14.
- Tsesmetzis, N., C. B. J. Paulin, S. G. Rudd, and N. Herold. 2018. 'Nucleobase and Nucleoside Analogues: Resistance and Re-Sensitisation at the Level of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Metabolism', *Cancers (Basel)*, 10.

U

- Urtasun, N., C. Boces-Pascual, L. Boix, J. Bruix, M. Pastor-Anglada, and S. Perez-Torras. 2017. 'Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma', *Oncotarget*, 8: 90185-96.

V

- Valdes, R., F. J. Casado, and M. Pastor-Anglada. 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: 575-9.
- Valvezan, A. J., M. Turner, A. Belaid, H. C. Lam, S. K. Miller, M. C. McNamara, C. Baglini, B. E. Housden, N. Perrimon, D. J. Kwiatkowski, J. M. Asara, E. P. Henske, and B. D. Manning. 2017. 'mTORC1 Couples Nucleotide Synthesis to Nucleotide Demand Resulting in a Targetable Metabolic Vulnerability', *Cancer Cell*, 32: 624-38 e5.
- Van Rompay, A. R., M. Johansson, and A. Karlsson. 1999. 'Phosphorylation of deoxycytidine analog monophosphates by UMP-CMP kinase: molecular characterization of the human enzyme', *Mol Pharmacol*, 56: 562-9.
- Vander Heiden, M. G., and R. J. DeBerardinis. 2017. 'Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology', *Cell*, 168: 657-69.
- Vergis, J. M., K. G. Bullock, K. G. Fleming, and G. P. Beardsley. 2001. 'Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity', *J Biol Chem*, 276: 7727-33.
- Vickers, M. F., R. S. Mani, M. Sundaram, D. L. Hogue, J. D. Young, S. A. Baldwin, and C. E. Cass. 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.
- Villa, E., E. S. Ali, U. Sahu, and I. Ben-Sahra. 2019. 'Cancer Cells Tune the Signaling Pathways to Empower de Novo Synthesis of Nucleotides', *Cancers (Basel)*, 11.

W

- Wang, C., and J. K. Buolamwini. 2019. 'A novel RNA variant of human concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) that is a potential cancer biomarker', *Exp Hematol Oncol*, 8: 18.
- Ward, E., C. DeSantis, A. Robbins, B. Kohler, and A. Jemal. 2014. 'Childhood and adolescent cancer statistics, 2014', *CA Cancer J Clin*, 64: 83-103.
- Ward, J. L., G. P. Leung, S. V. Toan, and C. M. Tse. 2003. 'Functional analysis of site-directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2', *Arch Biochem Biophys*, 411: 19-26.
- Wei, C. W., C. Y. Lee, D. J. Lee, C. F. Chu, J. C. Wang, T. C. Wang, W. N. Jane, Z. F. Chang, C. M. Leu, I. L. Dzhagalov, and C. L. Hsu. 2018. 'Equilibrative Nucleoside Transporter 3 Regulates T Cell Homeostasis by Coordinating Lysosomal Function with Nucleoside Availability', *Cell Rep*, 23: 2330-41.
- Weidberg, H., E. Shvets, T. Shpilka, F. Shimron, V. Shinder, and Z. Elazar. 2010. 'LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis', *EMBO J*, 29: 1792-802.
- Werner, E. R., N. Blau, and B. Thony. 2011. 'Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology', *Biochem J*, 438: 397-414.
- White, T. E., A. Brandariz-Nunez, J. C. Valle-Casuso, S. Amie, L. A. Nguyen, B. Kim, M. Tuzova, and F. Diaz-Griffero. 2013. 'The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation', *Cell Host Microbe*, 13: 441-51.
- Wright, N. J., and S. Y. Lee. 2019. 'Structures of human ENT1 in complex with adenosine reuptake inhibitors', *Nat Struct Mol Biol*, 26: 599-606.

X

- Xia, M., Y. Zhang, K. Jin, Z. Lu, Z. Zeng, and W. Xiong. 2019. 'Communication between mitochondria and other organelles: a brand-new perspective on mitochondria in cancer', *Cell Biosci*, 9: 27.
- Xu, F., Y. Sudo, S. Sanechika, J. Yamashita, S. Shimaguchi, S. Honda, C. Sumi-Ichinose, M. Mori-Kojima, R. Nakata, T. Furuta, M. Sakurai, M. Sugimoto, T. Soga, K. Kondo, and H. Ichinose. 2014. 'Disturbed bipterin and folate metabolism in the Qdpr-deficient mouse', *FEBS Lett*, 588: 3924-31.
- Xu, Y., M. Johansson, and A. Karlsson. 2008. 'Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria', *J Biol Chem*, 283: 1563-71.

Y

- Yao, S. Y., A. M. Ng, C. E. Cass, S. A. Baldwin, and J. D. Young. 2011. 'Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1)', *J Biol Chem*, 286: 32552-62.
- Yao, S. Y., A. M. Ng, M. F. Vickers, M. Sundaram, C. E. Cass, S. A. Baldwin, and J. D. Young. 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: 24938-48.

Z

- Zheng, R., M. Levis, O. Piloto, P. Brown, B. R. Baldwin, N. C. Gorin, M. Beran, Z. Zhu, D. Ludwig, D. Hicklin, L. Witte, Y. Li, and D. Small. 2004. 'FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells', *Blood*, 103: 267-74.
- Zheng, Y., T. Y. Lin, G. Lee, M. N. Paddock, J. Momb, Z. Cheng, Q. Li, D. L. Fei, B. D. Stein, S. Ramsamooj, G. Zhang, J. Blenis, and L. C. Cantley. 2018. 'Mitochondrial One-Carbon Pathway Supports Cytosolic Folate Integrity in Cancer Cells', *Cell*, 175: 1546-60 e17.
- Zhu, J., and C. B. Thompson. 2019. 'Metabolic regulation of cell growth and proliferation', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 436-50.

TESIS DOCTORALS

Arimany-Nardi, Cristina. 2013. Impact of membrane transporters polymorphisms on nucleoside-derived drug bioavailability and action. Universitat de Barcelona.

Casulleras, Olga. 2018. Regulació del transportador de nucleòsids d'alta afinitat hCNT3 per proteïnes d'interacció.

Caviedes, Liska. 2018. Proteína multifuncional ADE2 como nexa entre vías de recuperación y síntesis *de novo* de nucleótidos.

Mata, Aida. 2019. Implicacions fisiopatològiques de l'alteració del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1. Universitat de Barcelona

Viel, Albert. 2017. Determinants estructurals i implicacions funcionals de l'interactoma proteic d'hCNT1. Universitat de Barcelona



ANNEX





FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) modulates key enzymes of nucleotide metabolism implicated in cytarabine responsiveness in pediatric acute leukemia



Catalina M. Perelló-Reus^{a,b,c}, Albert Català^{c,d,f}, Liska Caviedes-Cárdenas^{a,b,c},
Nerea Vega-García^{c,e}, Mireia Camós^{c,e,f}, Sandra Pérez-Torras^{a,b,c,*}, Marçal Pastor-Anglada^{a,b,c,*}

^a Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institute of Biomedicine, University of Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de enfermedades hepáticas y digestivas (CIBER EHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona (IRP-HSJD), Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

^d Pediatric Hematology Department, Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^e Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Deu (IR SJD), Esplugues de Llobregat, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^f Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER ER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

AC220: 24889392

FLT3L: 178101630

AdiS: 70070

Ara-C: 6253

Keywords:

FLT3

Nucleotide metabolism

Pediatric acute leukemia

Quizartinib

Cytarabine

cN-II

ABSTRACT

Treatment of pediatric acute leukemia might involve combined therapies targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) receptor (i.e. quizartinib – AC220) and nucleotide metabolism (cytarabine – AraC). This study addressed the possibility of FLT3 modulating nucleoside salvage processes and, eventually, cytarabine action. Bone marrow samples from 108 pediatric leukemia patients (B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, BCP-ALL: 83; T-ALL: 9; acute myeloid leukemia, AML: 16) were used to determine the mRNA expression levels of FLT3, the cytarabine activating kinase dCK, and the nucleotidases cN-II and SAMHD1. FLT3 mRNA levels positively correlated with dCK, cN-II and SAMHD1 in the studied cohort. FLT3 inhibition using AC220 promoted the expression of cN-II in MV4-11 cells. Indeed, inhibition of cN-II with anthraquinone-2,6-disulfonic acid (AdiS) further potentiated the synergistic action of AC220 and cytarabine, at low concentrations of this nucleoside analog. FLT3 inhibition also down-regulated phosphorylated forms of SAMHD1 in MV4-11 and SEM cells. Thus, inhibition of FLT3 may also target the biochemical machinery associated with nucleoside salvage, which may modulate the ability of nucleoside-derived drugs. In summary, this contribution highlights the need to expand current knowledge on the mechanistic events linking tyrosine-kinase receptors, likely to be druggable in cancer treatment, and nucleotide metabolism, particularly considering tumor cells undergo profound metabolic reprogramming.

1. Introduction

Treatment of pediatric acute leukemia might involve combined therapies incorporating the nucleoside analog cytarabine (Ara-C) and inhibitors of the tyrosine kinase receptor FLT3 (FMS-Like Tyrosine kinase 3), such as PKC412 (midostaurin) and AC220 (quizartinib) [1], the latter apparently showing higher target specificity than the former inhibitor. FLT3 abnormalities, either overexpression of the gene or FLT3 mutations derived from Internal Tandem Duplications (ITDs) within the FLT3 gene, have been suggested as poor prognosis factors in Acute

Myeloblastic Leukemia (AML) and Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) [2–6].

Nevertheless, cancer treatment using tyrosine kinase inhibitors has often neglected the possibility of target receptors themselves being able to modulate either the uptake, metabolism, or both, of nucleoside-derived drugs. We have recently reported that FLT3 regulates human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1) [7]. In a selected cohort of 50 pediatric patients with leukemia subtypes associated with high FLT3 expression, a significant positive correlation between FLT3- and hENT1-related mRNA levels was observed. The possibility of FLT3

* Corresponding authors at: Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

E-mail addresses: s.perez-torras@ub.edu (S. Pérez-Torras), mpastor@ub.edu (M. Pastor-Anglada).

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104556>

Received 2 August 2019; Received in revised form 13 November 2019; Accepted 18 November 2019

Available online 25 November 2019

1043-6618/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

regulating hENT1 was functionally assessed later using pediatric acute leukemia-derived cell lines. Cytarabine uptake in MV4-11 cells was mostly mediated by hENT1, human Equilibrative Nucleoside Transporter 2 (hENT2) and human Concentrative Nucleoside Transporter 1 (hCNT1), but inhibition of FLT3, using PKC412, specifically inhibited hENT1 expression and, accordingly, hENT1- but not hENT2-, neither hCNT1-mediated cytarabine transport. This observation may be relevant to the clinics because the schedule of drug administration would either favor or compromise the expected and desired synergy when using combined therapies involving a FLT3 inhibitor and cytarabine. In practice, cytarabine administration prior to inhibition of FLT3 would result in increased cytotoxicity than when using the opposite schedule, administering the FLT3 inhibitor prior to the nucleoside-derived drug. This is indeed what the clinical practice has revealed [8]. Nevertheless, it should be taken into account that cytarabine is in fact a pro-drug that once transported into target cells requires metabolic activation (phosphorylation) to exert its action. Deoxycytidine kinase (dCK) catalyzes the first phosphorylation step, whereas cytosolic nucleotidase cN-II can reverse this process by dephosphorylation of Ara-CMP. In this regard, the balance between dCK and cN-II may be relevant for therapeutic purposes [9], as it has been previously suggested for another nucleoside-derived drug, often used in the treatment of solid tumors, such as gemcitabine, which follows the same activation pathway than cytarabine [10]. Therefore, dCK deficiency determines gemcitabine resistance in cancer cells [11], whereas, in a complementary manner, cN-II is considered a suitable target to be pharmacologically inhibited thereby increasing drug responsiveness [12]. Interestingly, fludarabine, another nucleoside analog used in the treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) but also used in many treatment protocols for AML and ALL, has been shown to inhibit, albeit at relatively high concentrations, cN-II function [13]. Overall, these observations suggest that selected nucleoside-derived drug transporters and enzymes of nucleotide metabolism may be suitable biomarkers of drug responsiveness [14,15]. In this sense, SAMHD1 has been recently suggested to play a major role in cytarabine action in hematological malignancies [16,17]. SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate (dNTP) triphosphohydrolase which is able to directly dephosphorylate deoxynucleoside triphosphates into deoxynucleosides [18]. Considering SAMHD1 retains its catalytic specificity on the triphosphate form of some deoxynucleoside-derived drugs, such as cytarabine triphosphate (ara-CTP) [17,19–21], this enzyme is now being considered as a major contributor to cytarabine resistance in the treatment of both pediatric and adult hematological malignancies. Therefore, SAMHD1 holds the same dual role as the one suggested for cN-II, both as a biomarker of drug action but also as a suitable target to be inhibited, as a tool to increase nucleoside-derived drug responsiveness [20,21].

In our previous work focusing on FLT3 and cytarabine uptake mechanisms in pediatric leukemia cells we generated some preliminary observations showing that FLT3 mRNA levels positively correlated with dCK mRNA amounts in pediatric acute leukemia patients [7]. This observation opened the possibility of FLT3 regulating key enzymes of nucleotide metabolism implicated in cytarabine drug action. Thus, we have addressed both in the clinical set and in leukemia-derived cell lines whether FLT3 is modulating the expression of dCK, cN-II and SAMHD1. Clinical correlations in gene expression have been studied in an extended cohort of up to 108 patients without any prior stratification based upon FLT3 expression. The hypothetical mechanistic link between FLT3 and these crucial enzymes for drug action has been studied *in vitro* using two cell lines, MV4-11, derived from AML, showing a FLT3-ITD, and SEM cells, derived from BCP-ALL, with high FLT3 expression but no FLT3 mutations. Our data are consistent with the occurrence of coordinate regulation of cytarabine uptake and metabolism, which may be relevant for a better understanding of the biochemical events leading to cytarabine chemoresistance in pediatric acute leukemia patients.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

This study has been conducted in accordance with ethical standards within the framework of the Declaration of Helsinki and according to national and international guidelines. It has been approved by the authors' institutional review board. According to the Local Ethics Committee of our institution, all samples were stored in the legally competent Biobank of our Hospital and were used after informed consent was obtained either from the patients or their legal tutors.

2.2. Patient samples

Among 265 pediatric patients aged 0–18 years diagnosed with acute leukemia from 2003 to 2013 in Hospital Sant Joan de Déu, we selected 108 cases (BCP-ALL: 83; T-ALL: 9; AML: 16) with available biological samples for the study. All samples were obtained at diagnosis. The main clinical and biological characteristics of patients are described in Supplementary Table 1. Patients were all uniformly treated according to the Spanish Society of Pediatric Hematology and Oncology (SEHOP) consecutive protocols SHOP-LAL-99 & 05 (ALL cases) and SHOP-LAM-00 & 07 (AML cases).

2.3. Reagents and antibodies

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) and RPMI-1640 medium were obtained from Lonza (Basel, Switzerland), fetal bovine serum (FBS), antibiotics and glutamine were purchased from Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ara-C was acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anthraquinone-2,6-disulfonic acid (AdiS) obtained from Acros Organics (Thermo Fisher Scientific). AC220 was purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). Flt3-ligand (FLT3L) was obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). TaqMan Gene Expression Assays were purchased from Applied Biosystems (Life Technologies, Foster City, CA, USA) dCK (Hs01040726_m1), cN-II (Hs01056741_m1), SAMHD1 (Hs00210019_m1), GUSB (4310888E), hENT1 [22]. FLT3 (3462), phospho-FLT3 (3461) and phospho-SAMHD1 (89930) antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). SAMHD1 antibody (ab67820) was obtained from Abcam (Cambridge, UK). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse and rabbit secondary antibodies were acquired from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

2.4. Cell lines

Three pediatric acute leukemia cell lines were used. MV4-11 cell line (DSMZ ACC 102) was derived from AML with translocation t(4;11) and *KMT2A* (*MLL*) rearrangement, carries a FLT3-ITD; SEM cell line (DSMZ ACC 546) was derived from BCP-ALL with translocation t(4;11) and *KMT2A* rearrangement with high FLT3 expression but no FLT3 mutation; THP-1 cell line (DSMZ ACC 16) with *KMT2A* rearrangement and FLT3 wild type. Cell lines were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany). MV4-11 and THP-1 were maintained in RPMI-1640 medium and SEM was cultured in IMDM. Both media were supplemented with 10 % heat-inactivated FBS, penicillin-streptomycin and glutamine. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ and subcultured every 3–4 days. Mycoplasma assays were performed routinely for all cell lines.

2.5. RNA extraction and quantitative RT-PCR

Cells were treated with either FLT3L (50 ng/ml) or AC220 (10 nM). Then, total RNA was isolated using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. A total of 1 µg of RNA was reverse transcribed to cDNA using M-

MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and random hexamers (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of nucleotide metabolism elements and GUSB (internal control) were performed with TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) using the TaqMan Universal master mix (Applied Biosystems) in the ABI Prism 7700 sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative mRNA level of each gene was calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (User bulletin no. 2; Applied Biosystems) normalized to GUSB expression level and control cells for each time. The amounts of mRNA were expressed as arbitrary units.

2.6. Protein extraction and immunoblotting

After treatment with either FLT3L (50 ng/ml) or AC220 (10 nM) cells were lysed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM EDTA, 1 % Triton X-100 freshly supplemented with 1 mM sodium orthovanadate, 1 % protease inhibitor (Complete mini; Roche, Basel, Switzerland) and 1 % phosphatase inhibitor (PhosSTOP; Roche). Protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad). Proteins were resolved by SDS-PAGE on either 8 % (SAMHD1 blots) or 10 % gels and transferred to PVDF membranes by standard methods. Membranes were immunoblotted with the indicated primary antibodies. After washing with TBS-Tween, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected using a chemoluminescence detection kit (ECL; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel).

2.7. Cell viability assay

2.5×10^4 cells were treated with 10 nM AC220 for 24 h. Afterwards media was changed and treated with Adis (250 μ M) and increasing concentrations of Ara-C for 72 h. Viability was assayed using a MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] colorimetric assay (Sigma-Aldrich). Optical density (OD) was measured at 550 nm. The coefficient of drug interaction (CDI) was used to analyze the effect of drug combination. CDI was calculated based on OD in each group, as $CDI = AB/(A \times B)$, where AB is the ratio for the combination group relative to the control group, and A and B are the ratios of each single agent group relative to the control group. Thus, a CDI value < 1 indicates synergy, a CDI value = 1 indicates additive effects, and a CDI value > 1 indicates antagonism. CDIs less than 0.7 indicate a significant synergistic effect.

2.8. Statistical analysis

Correlations, paired *t*-test and dose-response curves were performed with GraphPad Prism program version 6.01 (La Jolla, California, USA). All *p* values were considered significant when < 0.05.

3. Results

3.1. Correlation between the mRNA expression levels of FLT3 and cytarabine metabolic enzymes

The levels of mRNAs encoding FLT3, dCK and cN-II were measured in a non-segregated cohort of 108 patients (BCP ALL: 83; T-ALL: 9; AML: 16). FLT3 and dCK mRNA levels showed a highly significant positive correlation (Fig. 1). Interestingly, the same positive correlation was observed when plotting FLT3 mRNA levels with those encoding the Ara-C inactivating enzyme cN-II (Fig. 1). Positive correlation was still retained in the reduced cohort (Supplementary Fig. 1) used in our previous study, where only selected patients (50 individuals) presenting leukemia subtypes with high FLT3 expression had been included [7]. Indeed, this positive relationship was even stronger at the statistical

level in this new cohort of patients, a feature which was not observed when plotting FLT3 and hENT1 mRNA levels (Supplementary Fig. 2).

3.2. Modulation of hENT1, dCK and cN-II mRNA expression by FLT3

The functional link between FLT3 and hENT1, dCK and cN-II, was further assessed in SEM cells, cultured either in the absence or in the presence of the FLT3 ligand (FLT3L) at a concentration of 50 ng/ml. We used SEM cells in these experiments because FLT3 is overexpressed but does not contain in its structure mutations resulting in constitutive hyperactivation of the receptor, thereby being able to respond to its ligand. In fact, under these conditions, FLT3 phosphorylation was rapidly induced being already evident at the first time point here analyzed (1 h after FLT3L addition) (Fig. 2A). FLT3 was still phosphorylated above basal levels 4 h after treatment whereas phosphorylation decayed completely at 24 h (Fig. 2A). In accordance with this rapid activation of the FLT3 kinase, fast changes in selected target genes were observed (Fig. 2B). dCK mRNA levels significantly decreased 4 h after FLT3 receptor activation and its expression remained low at 24 h. cN-II showed a trend to increase its mRNA amounts at 4 h but its expression was also significantly down-regulated at 24 h. hENT1 mRNA levels showed a tendency to increase both at 4 h and 24 h although this effect was not statistically significant.

The impact of the pharmacological inhibition of FLT3 was also assessed using the specific FLT3 blocker AC220 at a concentration of 10 nM. Here both cell lines, MV4-11 and SEM were used because no matter whether FLT3 is constitutively activated (MV4-11) or overexpressed (SEM) it can be similarly targeted using inhibitors such as AC220. Indeed, this inhibitor was able to decrease the basal phosphorylated status of FLT3 in both cell lines (Fig. 3A). FLT3 inhibition by AC220 also resulted in the down-regulation of hENT1 mRNA levels in both cell lines (Fig. 3B). No effect on dCK and cN-II mRNA levels were observed in SEM cells after FLT3 inhibition, whereas a trend to increase their mRNA levels was observed in MV4-11 cells, although it was statistically significant only for cN-II at 24 h after AC220 treatment (Fig. 3B).

3.3. Effect of the pharmacological inhibition of cN-II on cytarabine-induced cytotoxicity

Based upon the previous observation suggesting that FLT3 inhibition by AC220 can induce cN-II expression, we aimed at determining the impact of cN-II inhibition on cytarabine-induced cytotoxicity. MV4-11 cells were either pre-treated or not for 24 h with 10 nM AC220 and were exposed to increasing concentrations of cytarabine either alone or in the presence of the cN-II inhibitor Adis at a concentration of 250 μ M. This concentration was chosen because it was the highest one that, when added alone, did not induce any significant loss in cell viability (Supplementary Fig. 3). Cell viability was measured 72 h after the beginning of the Ara-C treatment. AC220 and Adis alone induced a limited decrease in cell viability in the absence of Ara-C (Fig. 4). Their combination slightly potentiated the effect triggered by AC220. Cytarabine alone was effective in inducing cell death with an IC_{50} value of 9.96 μ M, whereas the presence of Adis did not significantly affect cell viability (IC_{50} 7.4 μ M). Under this schedule, when cells were exposed to Ara-C for 72 h, AC220 potentiated cytarabine-induced cytotoxicity in a synergistic manner (IC_{50} 1.7 μ M). Concomitant inhibition of cN-II under these conditions further potentiated cytarabine cytotoxicity. Even though no significant changes were observed in the IC_{50} value (0.7 μ M), cN-II inhibition did promote an increase in the cytotoxic effect on the combined AC220/Cytarabine treatment, particularly at low cytarabine concentrations (0.25–1 μ M). Although apparent synergy effects were not statistically significant, and additional investigation is still required, the CDI values in this concentration range were 0.71 (0.25 μ M), 0.75 (0.5 μ M) and 0.77 (1 μ M).

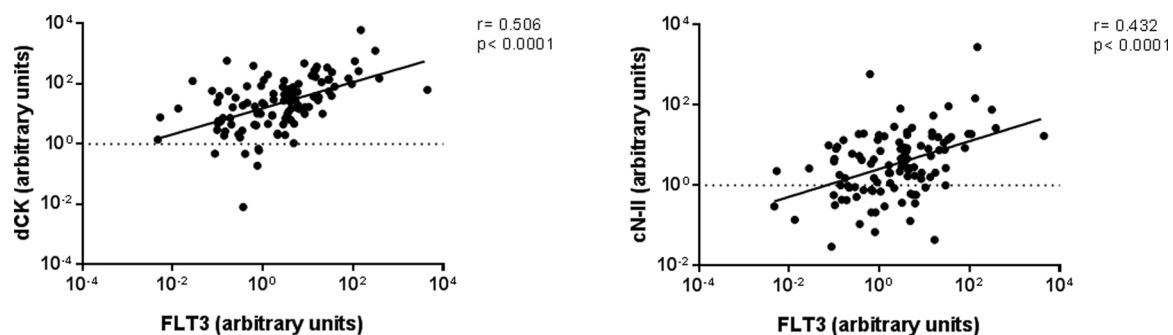


Fig. 1. Correlations between FLT3 and elements of nucleoside salvage (dCK, cN-II) in pediatric acute leukemia samples. Relative dCK or cN-II mRNA levels were plotted against the FLT3 mRNA level (patients of the studied cohort n = 108). Correlation coefficient and p-value are shown in the figure.

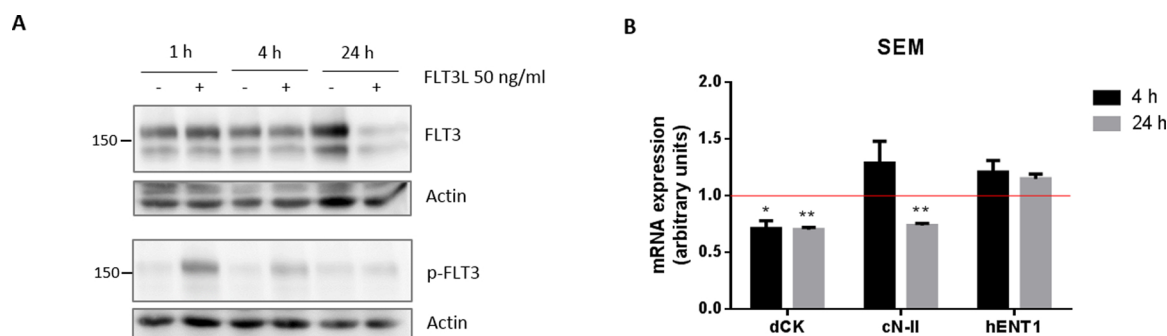


Fig. 2. Modulation of dCK, cN-II and hENT1 mRNA expression by FLT3 ligand. SEM cells were treated with FLT3L 50 ng/ml for the times indicated in the figure. A) FLT3L effect on FLT3 phosphorylation was analyzed by western blot. B) RT-PCR were performed in order to study dCK, cN-II and hENT1 mRNA expression levels. Results are based on measurements from 3 to 5 different experiments. *p < 0.05 **p < 0.01 (paired t-test relative to control cells).

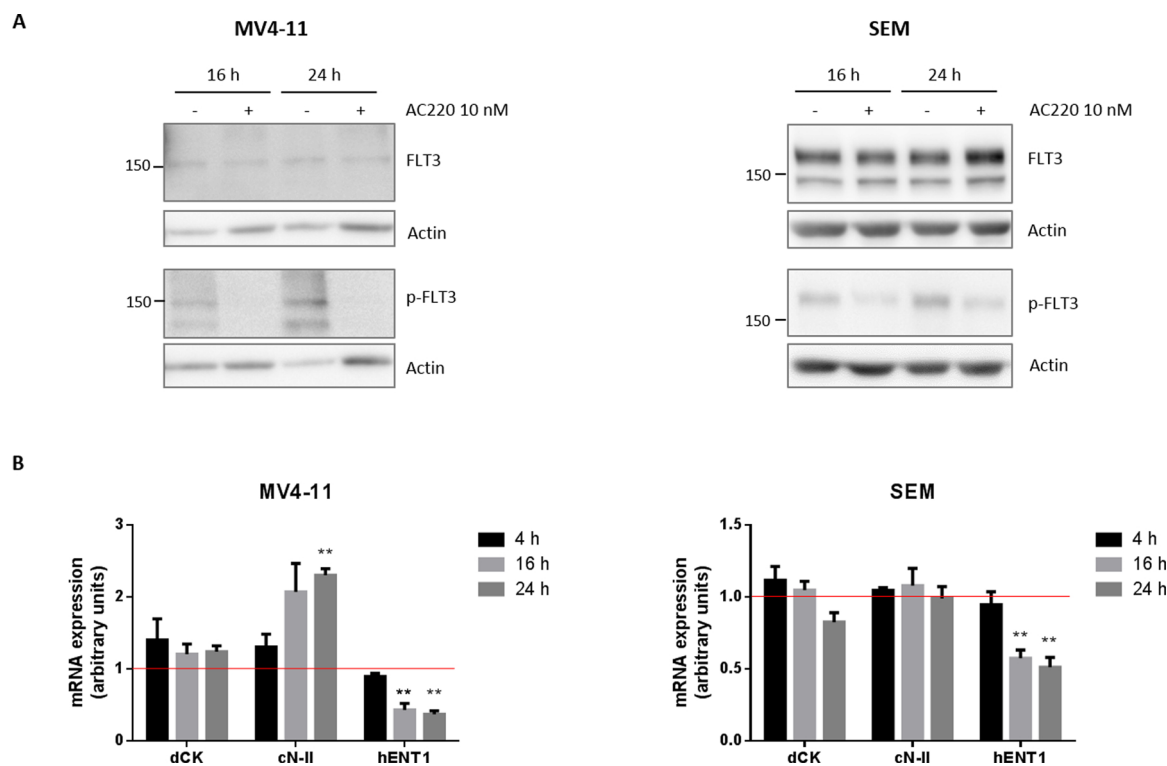


Fig. 3. Effect of FLT3 inhibition by AC220 in dCK, cN-II and hENT1 expression. MV4-11 and SEM cells were treated with 10 nM AC220 for different periods of time. A) FLT3 and phospho-FLT3 were analyzed by western blot. B) dCK, cN-II and hENT1 mRNA expression levels were assayed by RT-PCR. Data are expressed as means ± SEM of 3–4 independent experiments. Statistical significance between each condition and control cells of the corresponding time was determined with paired t-test; *p < 0.05 **p < 0.01.

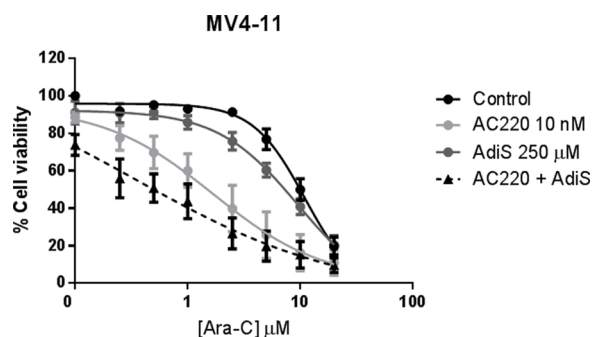


Fig. 4. Involvement of cN-II in the cytotoxicity mediated by Ara-C after AC220 treatment. MV4-11 cells were pre-treated with either AC220 or not for 24 h. Then were treated with increasing concentrations of Ara-C alone as a control and in combination with Adis. Cell viability was measured by MTT assay 72 h after the start of treatment. Data are presented as means \pm SEM of 4 independent experiments.

3.4. Regulatory link between FLT3 and SAMHD1

As introduced above the deoxynucleoside triphosphate phosphohydrolase SAMHD1 appears to be a major determinant of cytarabine cytotoxicity likely to determine the clinical outcome of leukemia patients. Thus, we addressed the possibility of FLT3 being also a modulator of SAMHD1 expression. Interestingly, a significant positive correlation between FLT3 and SAMHD1 mRNA levels was observed in the patient cohort here studied which was also observed in the smaller cohort biased for high FLT3 mRNA expression levels (Fig. 5A), suggesting a probable mechanistic link between this receptor and SAMHD1.

Inhibition of FLT3 kinase activity in MV4-11 cells using AC220, under the conditions shown in Fig. 3A, resulted in an increase in SAMHD1 mRNA levels, which was statistically significant after a 24 h

treatment (Fig. 5B). Nevertheless, FLT3 inhibition with AC220 in SEM cells resulted in a significant decrease in SAMHD1 mRNA levels but only 24 h after treatment (Fig. 5B).

SAMHD1 protein, under the experimental conditions used, showed up as two bands (Fig. 5C). The one at the highest molecular weight is likely to be the phosphorylated form of the enzyme. Inhibition of FLT3 with AC220 resulted in a decrease in the phosphorylated form of SAMHD1 in both cell lines, although the effect was much weaker in SEM than in MV4-11 cells, where this band was almost undetectable after 24 h treatment with AC220 (Fig. 5C). These results were confirmed with the use of a specific antibody against Thr592 phosphorylated SAMHD1 (Fig. 5D). This antibody recognized a single band of the expected molecular weight that behaved similarly to the upper band in Fig. 5C. Interestingly, AC220 treatment in FLT3 wild type THP-1 cells was unable to alter the SAMHD1 phosphorylation pattern, even when higher doses (100 nM) were used (Supplementary Fig. 4).

4. Discussion

Targeting nucleotide metabolism has been a long-standing strategy to treat cancer. Pharmacological interference with nucleoside salvage processes has been used for this purpose using either nucleoside analogs or other structurally unrelated drugs (i.e. antifolates) targeting enzymes of nucleoside salvage (i.e. thymidylate synthase) [10,23,24]. Chemoresistance can be attributed in some cases to alterations in the metabolic processes implicated in activation and inactivation of nucleoside-derived pro-drugs. Indeed, proteins such as transporters (i.e. hENT1) and enzymes implicated in the first steps of nucleoside phosphorylation (i.e. dCK) have been associated with the clinical outcome of patients suffering from poor prognosis solid tumors, such as pancreatic ductal adenocarcinoma, under adjuvant nucleoside-derived (i.e. gemcitabine) therapy [14,15]. Recently, SAMHD1 has been identified as a new player of nucleotide metabolism associated with chemoresistance events, whose ability to dephosphorylate Ara-CTP into Ara-C has been

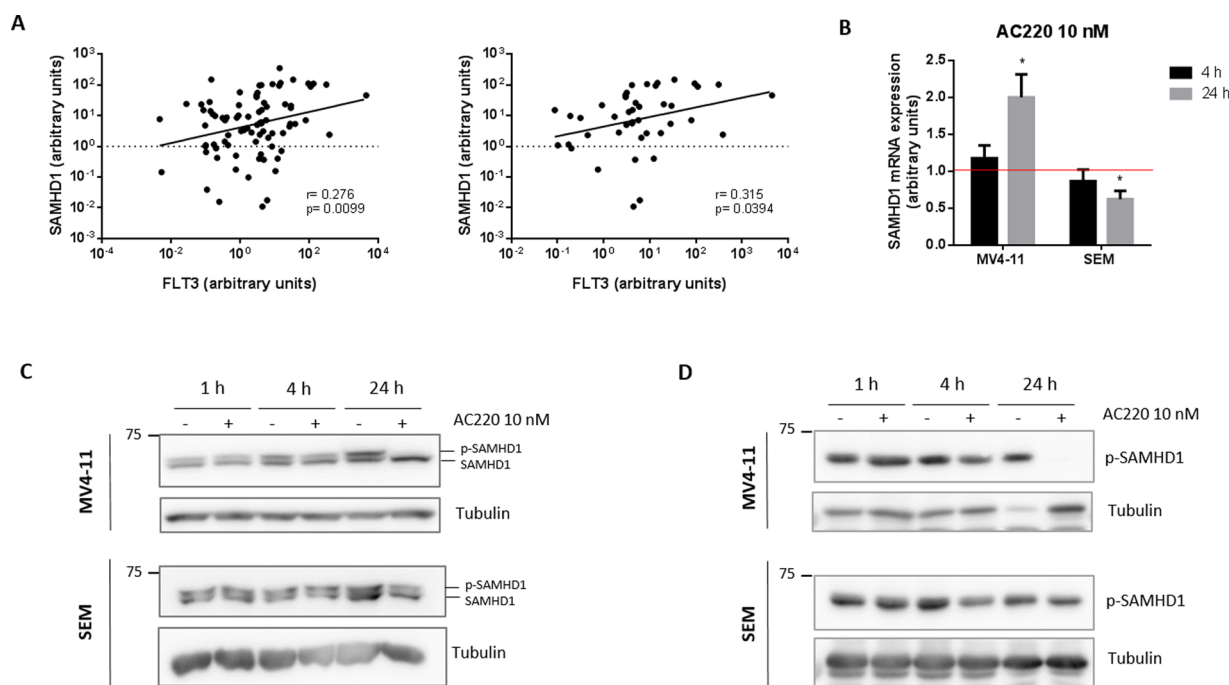


Fig. 5. Regulation of SAMHD1 by FLT3. A) Relative SAMHD1 levels of pediatric acute leukemia patients samples were plotted against FLT3 in a cohort of 86 patients (left panel) and 50 selected patients with higher expression of FLT3 (right panel). B) MV4-11 and SEM cells were treated for 4 h and 24 h with AC220 10 nM and SAMHD1 levels were analyzed by RT-PCR and normalized to the control of each time point. Data are expressed as means \pm SEM 3–4 individual experiments. Paired *t*-test * $p < 0.05$. C, D) MV4-11 and SEM cells were treated with AC220 10 nM for 1 h, 4 h and 24 h. (C) SAMHD1 levels were plotted in conditions that allow to separate the phosphorylated and non-phosphorylated bands. (D) p-SAMHD1 levels were analyzed by western blot with an antibody against the phosphorylated Thr592.

linked to worse therapeutic responses in acute leukemia patients showing increased SAMHD1 expression [16,17].

Combined therapies often incorporate inhibitors of a variety of tyrosine kinase receptors implicated in cell proliferation and tumor growth. Possible gene networks coordinately regulated in cancer cells may involve genes encoding growth factor receptors, enzymes of nucleotide metabolism and a variety of proteins implicated in DNA repair and apoptosis [25]. In biological terms, it seems logical that growth factors modulate nucleotide metabolism as long as nucleotide supply is essential to support nucleic acid synthesis and cell replication. Growth-regulated activation of mTORC1 signaling results in the up-regulation of *de novo* purine and pyrimidine nucleotide biosynthesis by promoting purinosome formation [26] and CAD activation [27,28], respectively. Interestingly, to what extent growth factors impact on nucleoside salvage (a more efficient way of providing nucleotides for nucleic acid synthesis than *de novo* synthesis) is less well known. Interestingly, some kinases implicated in nucleoside salvage, such as dCK, appear to be crucial for hematopoiesis and lymphocyte development [29,30]. Genetic deletion of dCK in mice, results in a dramatic depletion of the dCTP pools in erythroid and lymphoid lineages, which in turn promotes S-phase arrest, replication stress and DNA damage [29]. Moreover, a broad panel of enzymes implicated in nucleoside salvage, such as dCK, TK1, TYMS, DHFR and RRM1 and 2, are up-regulated at the transcriptional level in breast cancer cells by particular p53 mutations [31]. These observations are consistent with coordinate regulation of the enzyme machinery required for nucleic acid synthesis and growth of tumor cells.

FLT3 has proven to be a suitable target in the treatment of acute leukemia because this tyrosine kinase receptor shows either constitutive activating mutations or over-expression. Indeed, its increased function is a marker of poor prognosis. In non-pathological conditions, FLT3, a tyrosine kinase receptor almost uniquely expressed in hematopoietic cells, is crucial for cell survival, proliferation and differentiation. Therefore, FLT3 itself is a suitable candidate to modulate nucleotide metabolism, nucleic acid synthesis and cell growth.

In this study, a significant clinical correlation between the mRNA levels of the FLT3-encoding gene and mRNAs of a variety of enzymes implicated in the fine tuning of nucleoside salvage processes, involving both phosphorylating and de-phosphorylating enzymes, has been observed. Based upon this evidence and as previously done for the FLT3-dependent regulation of hENT1 expression, we have addressed here the possibility of this tyrosine kinase receptor being able of modulating key enzymes of nucleoside metabolism. For this purpose two cell lines, representative of both types of FLT3 alterations occurring in pediatric acute leukemia (FLT3 overexpression –SEM cells-, and ITD mutations –MV4-11 cells-) have been used. Our *in vitro* data support the view that FLT3 is somehow regulating enzymes of nucleotide metabolism, although the ability of this tyrosine kinase receptor to do so is not the same depending on the cell line used, which may reflect functional differences depending on whether the receptor is either overexpressed or constitutively activated due to ITD. In this regard, AML primary cells display FLT3-ITD specific gene expression signatures that might explain differential responses to FLT3 modulation [32]. However, another contributing event might be the endogenous capacity of each cell line to secrete FLT3L [33] which would mask to a variable extent the impact of inhibiting FLT3. Indeed, using these cell lines and despite the important role of dCK in hematopoiesis discussed above, we could not effectively modulate dCK expression via FLT3 inhibition. Nevertheless, the positive and highly significant clinical correlation between FLT3 and dCK mRNA levels in the pediatric leukemia cohort here studied, would be consistent with both genes being required for hematopoiesis and, eventually, to metabolic reprogramming in cancer.

On the other hand, at least in MV4-11 cells, inhibition of FLT3 resulted in a progressive increase in cN-II expression, which might be functionally relevant, because inhibition of this nucleotidase with AdiS

resulted in some additional cytotoxic effects when AC220 and Ara-C were combined, particularly at low doses of the nucleoside analog drug.

The possibility of FLT3 modulating SAMHD1 function is also consistent with our data. Although mRNA expression results are not conclusive, it seems FLT3 inhibition induces a significant down-regulation of the phosphorylated form of this protein. This again is particularly relevant in MV4-11 cells where p-SAMHD1 is almost undetectable 24 h after AC220 treatment. However, in THP-1 cells, which show normal expression of the wild type FLT3 receptor, AC220 did not modify FLT3 phosphorylation and, accordingly, did not change the phosphorylation pattern of SAMHD1, which further reinforces the functional link between the kinase and the enzyme under pathological conditions.

SAMHD1 has, at least, a dual role in nucleic acid metabolism. It has triphosphate hydrolase activity being a key modulator of dNTP pools but also shows a nuclease activity, which has been lately related to the permissive role of SAMHD1 inactivation on retroviral (i.e. HIV-1) infection [34]. SAMHD1 is phosphorylated by the cell cycle regulated kinases cyclin A2/CDK1 [35,36]. Phosphorylation differentially impacts on its biological function, because it appears to restrict retroviral infection, probably by blocking its RNase activity, although still might retain its dNTPase function [34,36]. Moreover, it has recently been shown that SAMHD1 dNTP triphosphohydrolase activity persists during cell-cycle progression [37]. Although the structural and functional consequences of SAMHD1 phosphorylation have been controversial for the past few years, the latter observations would favor the view that FLT3 inhibition can modulate SAMHD1 function, probably by impairing its cell-cycle related activity. To what extent that would impact on the Ara-CTP pools, considering non-phosphorylated SAMHD1 retains dNTPase activity, remains to be established.

In any case this study shows a consistent positive correlation among mRNA expression levels of the hematopoietic tyrosine kinase receptor FLT3 and a variety of genes encoding proteins implicated in nucleoside salvage processes in patient samples. However, negative correlation between FLT3 activity and some of these genes was observed in pediatric acute leukemia cell lines. Nevertheless, clinical data corresponds to steady-state bone marrow levels in naïve (untreated) patients at diagnosis, a situation difficult to mimic *in vitro* when testing relatively short-term responses of this panel of genes following FLT3 modulation. Despite these limitations, the fact that FLT3 inhibition down-regulates hENT1 and induce cN-II would promote chemoresistance. However, regardless of the anticipated chemoresistance in the combination of AC220 and Ara-C, an improvement in their cytotoxic effects was observed even when AC220 was previously applied. This could be attributed to changes in cell cycle related proteins due to the FLT3-ITD signature. AC220 treatment in FLT3-ITD cells decrease p21 levels and, in the context of p21 silencing, cells become more sensitive to the cell cycle chemotherapeutic agent cytarabine [38]. Overall, these observations, taken together, strongly support the concept that by targeting FLT3, concomitant changes in nucleotide metabolism, likely to affect Ara-C disposal and therapeutic responses are plausible. Regulatory agencies, such as the United States Food and Drug Administration (US FDA) and the European Medicines Agency (EMA), have recently approved the use of the FLT3 inhibitor midostaurine (PKC412) in combination with standard cytarabine and daunorubicin induction and cytarabine consolidation in adults with newly diagnosed FLT3-mutated AML, being the nucleoside-analog administered before the FLT3 inhibitor [39]. Clinical trials with AC220 are also under way [40]. Therefore, the time-scale schedule in this type of combined therapies would be relevant in order to avoid any putative antagonism associated with the possibility of FLT3 inhibition impairing Ara-C efficacy. This contribution also highlights the need to expand current knowledge on the mechanistic events linking tyrosine-kinase receptors, likely to be druggable in cancer treatment, and nucleotide metabolism, particularly considering tumor cells undergo profound nucleotide metabolic reprogramming.

5. Conclusions

This study shows a consistent positive correlation among mRNA expression levels of the hematopoietic tyrosine kinase receptor FLT3 and dCK, cN-II and SAMHD1 in samples from acute leukemia pediatric patients. FLT3 inhibition using AC220 or activation with FLT3L, modulated nucleotide metabolism enzymes. In particular, FLT3 inhibition decreased the phosphorylation of SAMHD1. Moreover, FLT3 inhibition induced cN-II expression in a FLT3-ITD cell line. Accordingly, inhibition of cN-II with AdiS showed an apparent synergistic effect on cell viability when combined with AC220 and low doses of cytarabine. These results, taken together, support the concept that nucleotide metabolism changes induced by targeting FLT3 should be considered in combined treatments with nucleoside-derived drugs.

Funding

This study was supported by MPA grants RTI2018-094655-B-100 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades), Fundación Ramón Areces (CIVP18A3914) and FEDER (European Union). MPA laboratory belongs to the National Biomedical Research Institute on Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBER EHD). CIBER is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación).

CMPR was holding ADR fellowship (University of Barcelona) and was recipient of a FPI fellowship (Ministerio de Economía y Empresa). LCC was holding a fellowship from Becas Chile (Gobierno de Chile).

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interests.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104556>.

References

- P.P. Zarrinkar, R.N. Gunawardane, M.D. Cramer, M.F. Gardner, D. Brigham, B. Belli, M.W. Karaman, K.W. Pratz, G. Chao, K.G. Sprankle, H.K. Patel, M. Levis, R.C. Armstrong, J. James, S.S. Bhagwat, AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML), *Blood* 114 (14) (2009) 2984–2992.
- A. Andersson, K. Paulsson, H. Lilljebjorn, C. Lassen, B. Strombeck, J. Heldrup, M. Behrendtz, B. Johansson, T. Fioretos, FLT3 mutations in a 10 year consecutive series of 177 childhood acute leukemias and their impact on global gene expression patterns, *Genes Chromosomes Cancer* 47 (1) (2008) 64–70.
- K. Kuriyama, K. Kiyoi, Y. Hirose, M. Iwai, M. Ninomiya, Y. Kodera, S. Miyawaki, K. Kuriyama, C. Shimazaki, H. Akiyama, M. Nishimura, T. Motoji, K. Shinagawa, A. Takeshita, R. Ueda, R. Ohno, N. Emi, T. Naoe, Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia, *Blood* 103 (5) (2004) 1901–1908.
- A. Staffas, M. Kanduri, R. Hovland, R. Rosenquist, H.B. Ommen, J. Abrahamsson, E. Forestier, K. Jahnukainen, O.G. Jonsson, B. Zeller, J. Palle, G. Lonnerholm, H. Hasle, L. Palmqvist, H. Ehrencrona, H. Nordic, Society of Pediatric, Oncology, Presence of FLT3-ITD and high BAALC expression are independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia, *Blood* 118 (22) (2011) 5905–5913.
- R.W. Stam, M.L. den Boer, P. Schneider, M. Meier, H.B. Beverloo, R. Pieters, D-HPLC analysis of the entire FLT3 gene in MLL rearranged and hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia, *Haematologica* 92 (11) (2007) 1565–1568.
- R.W. Stam, M.L. den Boer, P. Schneider, P. Nollau, M. Horstmann, H.B. Beverloo, E. van der Voort, M.G. Valsecchi, P. de Lorenzo, S.E. Sallan, S.A. Armstrong, R. Pieters, Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 106 (7) (2005) 2484–2490.
- A. Catala, M. Pastor-Anglada, L. Caviedes-Cardenas, R. Malatesta, S. Rives, N. Vega-Garcia, M. Camos, P. Fernandez-Calotti, FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia, *Oncotarget* 7 (31) (2016) 49786–49799.
- M. Levis, R. Pham, B.D. Smith, D. Small, In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects, *Blood* 104 (4) (2004) 1145–1150.
- C.M. Galmarini, X. Thomas, G. Graham, A. El Jafaari, E. Cros, L. Jordheim, J.R. Mackey, C. Dumontet, Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine, *Br. J. Haematol.* 122 (1) (2003) 53–60.
- L.P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet, Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (6) (2013) 447–464.
- L.P. Jordheim, C.M. Galmarini, C. Dumontet, Gemcitabine resistance due to deoxycytidine kinase deficiency can be reverted by fruitfly deoxynucleoside kinase, DmdNK, in human uterine sarcoma cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58 (4) (2006) 547–554.
- L.P. Jordheim, L. Chaloin, Therapeutic perspectives for cN-II in cancer, *Curr. Med. Chem.* 20 (34) (2013) 4292–4303.
- F. Cividini, R. Pesi, L. Chaloin, S. Allegrini, M. Camici, E. Cros-Perrial, C. Dumontet, L.P. Jordheim, M.G. Tozzi, The purine analog fludarabine acts as a cytosolic 5'-nucleotidase II inhibitor, *Biochem. Pharmacol.* 94 (2) (2015) 63–68.
- R. Marechal, J.B. Bachet, J.R. Mackey, C. Dalban, P. Demetter, K. Graham, A. Couvelard, M. Svrcek, A. Bardier-Dupas, P. Hammel, A. Sauvanet, C. Louvet, F. Paye, P. Rougier, C. Penna, T. Andre, C. Dumontet, C.E. Cass, L.P. Jordheim, E.L. Matera, J. Closset, I. Salmon, J. Deviere, J.F. Emile, J.L. Van Laethem, Levels of gemcitabine transport and metabolism proteins predict survival times of patients treated with gemcitabine for pancreatic adenocarcinoma, *Gastroenterology* 143 (3) (2012) 664–674 e6.
- M. Pastor-Anglada, S. Perez-Torras, Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 13.
- N. Herold, S.G. Rudd, L. Ljungblad, K. Sanjiv, I.H. Myrberg, C.B. Paulin, Y. Heshmati, A. Hagenkort, J. Kutzner, B.D. Page, J.M. Calderon-Montano, O. Loseva, A.S. Jemth, L. Bulli, H. Axelsson, B. Tesi, N.C. Valerie, A. Hoglund, J. Bladh, E. Wiita, M. Sundin, M. Uhlin, G. Rassidakis, M. Heyman, K.P. Tamm, U. Warpman-Berglund, J. Walfridsson, S. Lehmann, D. Grandt, T. Lundback, P. Kogner, J.I. Henter, T. Helleday, T. Schaller, Targeting SAMHD1 with the Vpx protein to improve cytarabine therapy for hematological malignancies, *Nat. Med.* 23 (2) (2017) 256–263.
- C. Schneider, T. Oellerich, H.M. Baldauf, S.M. Schwarz, D. Thomas, R. Flick, H. Bohnenberger, L. Kaderali, L. Stegmann, A. Cremer, M. Martin, J. Lohmeyer, M. Michaelis, V. Hornung, C. Schliemann, W.E. Berdel, W. Hartmann, E. Wardelmann, F. Comoglio, M.L. Hansmann, A.F. Yakunin, G. Geisslinger, P. Strobel, N. Ferreiros, H. Serve, O.T. Keppler, J. Cinatl Jr., SAMHD1 is a biomarker for cytarabine response and a therapeutic target in acute myeloid leukemia, *Nat. Med.* 23 (2) (2017) 250–255.
- D.C. Goldstone, V. Ennis-Adeniran, J.J. Hedden, H.C. Groom, G.I. Rice, E. Christodoulou, P.A. Walker, G. Kelly, L.F. Haire, M.W. Yap, L.P. de Carvalho, J.P. Stoye, Y.J. Crow, I.A. Taylor, M. Webb, HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase, *Nature* 480 (7377) (2011) 379–382.
- N. Herold, S.G. Rudd, K. Sanjiv, J. Kutzner, J. Bladh, C.B.J. Paulin, T. Helleday, J.I. Henter, T. Schaller, SAMHD1 protects cancer cells from various nucleoside-based antimetabolites, *Cell Cycle* 16 (11) (2017) 1029–1038.
- N. Herold, S.G. Rudd, K. Sanjiv, J. Kutzner, I.H. Myrberg, C.B.J. Paulin, T.K. Olsen, T. Helleday, J.I. Henter, T. Schaller, With me or against me: tumor suppressor and drug resistance activities of SAMHD1, *Exp. Hematol.* 52 (2017) 32–39.
- C. Rampazzo, M.G. Tozzi, C. Dumontet, L.P. Jordheim, The druggability of intracellular nucleotide-degrading enzymes, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77 (5) (2016) 883–893.
- M. Molina-Arcas, B. Bellosillo, F.J. Casado, E. Montserrat, J. Gil, D. Colomer, M. Pastor-Anglada, Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 101 (6) (2003) 2328–2334.
- M. Pastor-Anglada, A. Felipe, F.J. Casado, Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies, *Trends Pharmacol. Sci.* 19 (10) (1998) 424–430.
- P.M. Wilson, P.V. Danenberg, P.G. Johnston, H.J. Lenz, R.D. Ladner, Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11 (5) (2014) 282–298.
- N. Grane-Boladeras, S. Perez-Torras, J.J. Lozano, M.R. Romero, A. Mazo, J.J.G. Marin, M. Pastor-Anglada, Pharmacogenomic analysis of the responsiveness of gastrointestinal tumor cell lines to drug therapy: a transportome approach, *Pharmacol. Res.* 113 (Pt A) (2016) 364–375.
- J.B. French, S.A. Jones, H. Deng, A.M. Pedley, D. Kim, C.Y. Chan, H. Hu, R.J. Pugh, H. Zhao, Y. Zhang, T.J. Huang, Y. Fang, X. Zhuang, S.J. Benkovic, Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria, *Science* 351 (6274) (2016) 733–737.
- I. Ben-Sahra, J.J. Howell, J.M. Asara, B.D. Manning, Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1, *Science* 339 (6125) (2013) 1323–1328.
- A.M. Robitaille, S. Christen, M. Shimobayashi, M. Cornu, L.L. Fava, S. Moes, C. Prescianotto-Baschong, U. Sauer, P. Jenoe, M.N. Hall, Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis, *Science* 339 (6125) (2013) 1320–1323.
- W.R. Austin, A.L. Armijo, D.O. Campbell, A.S. Singh, T. Hsieh, D. Nathanson, H.R. Herschman, M.E. Phelps, O.N. Witte, J. Czernin, C.G. Radu, Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress, *J. Exp. Med.* 209 (12) (2012) 2215–2228.
- G. Toy, W.R. Austin, H.I. Liao, D. Cheng, A. Singh, D.O. Campbell, T.O. Ishikawa, L.W. Lehmann, N. Satyamarthy, M.E. Phelps, H.R. Herschman, J. Czernin, O.N. Witte, C.G. Radu, Requirement for deoxycytidine kinase in T and B lymphocyte development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (12) (2010) 5551–5556.
- M. Kollaredy, E. Dimitrova, K.C. Vallabhaneni, A. Chan, T. Le, K.M. Chauhan, Z.I. Carrero, G. Ramakrishnan, K. Watabe, Y. Haupt, S. Haupt, R. Pochampally, G.R. Boss, D.G. Romero, C.G. Radu, L.A. Martinez, Regulation of nucleotide

- metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7389.
- [32] P. Cauchy, S.R. James, J. Zacarias-Cabeza, A. Ptasinska, M.R. Imperato, S.A. Assi, J. Piper, M. Canestraro, M. Hoogenkamp, M. Raghavan, J. Loke, S. Akiki, S.J. Clokie, S.J. Richards, D.R. Westhead, M.J. Griffiths, S. Ott, C. Bonifer, P.N. Cockerill, Chronic FLT3-ITD signaling in acute myeloid leukemia is connected to a specific chromatin signature, *Cell Rep.* 12 (5) (2015) 821–836.
- [33] R. Zheng, M. Levis, O. Piloto, P. Brown, B.R. Baldwin, N.C. Gorin, M. Beran, Z. Zhu, D. Ludwig, D. Hicklin, L. Witte, Y. Li, D. Small, FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells, *Blood* 103 (1) (2004) 267–274.
- [34] E. Ballana, J.A. Este, SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction, *Trends Microbiol.* 23 (11) (2015) 680–692.
- [35] A. Cribier, B. Descours, A.L. Valadao, N. Laguette, M. Benkirane, Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1, *Cell Rep.* 3 (4) (2013) 1036–1043.
- [36] T.E. White, A. Brandariz-Nunez, J.C. Valle-Casuso, S. Amie, L.A. Nguyen, B. Kim, M. Tuzova, F. Diaz-Griffero, The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation, *Cell Host Microbe* 13 (4) (2013) 441–451.
- [37] E. Tramentozzi, P. Ferraro, M. Hossain, B. Stillman, V. Bianchi, G. Pontarin, The dNTP triphosphohydrolase activity of SAMHD1 persists during S-phase when the enzyme is phosphorylated at T592, *Cell Cycle* 17 (9) (2018) 1102–1114.
- [38] M. Abe, L.M. Pelus, P. Singh, T. Hirade, C. Onishi, J. Purevsuren, T. Taketani, S. Yamaguchi, S. Fukuda, Internal tandem duplication in FLT3 attenuates proliferation and regulates resistance to the FLT3 inhibitor AC220 by modulating p21Cdkn1a and Pbx1 in hematopoietic cells, *PLoS One* 11 (7) (2016) e0158290.
- [39] E.S. Kim, Midostaurin: first global approval, *Drugs* 77 (11) (2017) 1251–1259.
- [40] N. Daver, R.F. Schlenk, N.H. Russell, M.J. Levis, Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence, *Leukemia* 33 (2) (2019) 299–312.