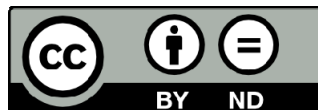




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Farmacologia Molecular
dels Transportadors de Nucleòsids
en Teràpia del Càncer: Nucleòsids Naturals
No Canònics i Ruxolitinib**

Eduard Mas Marin



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència *Reconeixement- SenseObraDerivada 4.0.
Espanya de Creative Commons.*

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia *Reconocimiento - SinObraDerivada 4.0.
España de Creative Commons.*

This doctoral thesis is licensed under the *Creative Commons Attribution-NoDerivatives 4.0.
Spain License.*

Farmacologia Molecular dels
Transportadors de Nucleòsids
en Teràpia del Càncer:
Nucleòsids Naturals No Canònics
i Ruxolitinib

Tesi Doctoral

Eduard Mas Marín

Barcelona, 2021





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de **Doctorat en Biomedicina**

Departament de **Bioquímica i Biomedicina Molecular**

Facultat de **Biologia**

Universitat de Barcelona

**Farmacologia Molecular dels
Transportadors de Nucleòsids en
Teràpia del Càncer:
Nucleòsids Naturals No Canònics
i Ruxolitinib**

Eduard Mas Marín

Barcelona, 2021

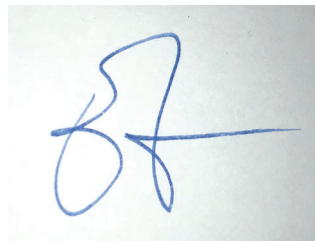
Memòria per optar al títol de **Doctor** per la **Universitat de Barcelona**

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

Tesi Doctoral presentada per

Eduard Mas Marín

El candidat,



Eduard Mas Marín
Barcelona (Barcelonès,
Catalunya)
2021.05.17 12:09:45
+02'00'

Eduard Mas Marín

Barcelona, 2021

Vistiplau del director,



Dr. Francisco Javier Casado Merediz

Professor Titular de Bioquímica i Biologia Molecular
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

La realització de la present Tesi Doctoral
s'ha portat a terme al **Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular** de
la **Facultat de Biologia** de la **Universitat de Barcelona**
gràcies al finançament dels següents contractes predoctorals:

Ajuts Predoctorals per a Investigadors en Formació (APIF)

Universitat de Barcelona

APIF2016/129

Ajuts per a la Formació de Professorat Universitari (FPU)

Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats - Govern d'Espanya

FPU16/517

A sa memòria des meu güelo

An es meu metge

A sa meua família
A ses meues amigues i es meus amics
As meus companys i companyes de vida

A totes i tots es que m'heu ensenyat i de qui he après, aprenc i aprendré

A tots i totes ses que m'heu ajudat

A en Zenón Cubillas González

A en Sergi Ramis Navarro

A en Biel Grau Bonet

A totes aquelles persones que pateixen càncer o
esclerosi lateral amiotròfica i a ses seues famílies

A sa meua mare
i en honor a tots es seus sacrificis

A totes aquelles persones que pateixen mielofibrosi,
policitèmia vera o trombocitèmia essencial

A totes aquelles persones que pateixen neoplàsies mieloproliferatives
cròniques cromosoma Filadèlfia negatives

A totes aquelles persones que pateixen qualsevol tipus de càncer hematològic.

A totes elles, i a totes ses seues famílies i persones que les estimen
i que comparteixen es seu patiment

A totes ses metgesses i tots es metges que els tracten

A tots es infermers i ses infermeres que els cuiden, els acompanyen i els ajuden

A totes aquelles persones que en algun moment
han patit, pateixen o patiran depressió
i/o qualsevol mena d'assetjament

A totes aquelles heroïnes anònimes i tots aquells herois
anònims que són solidaris amb el patiment dels altres

Per un món sense assetjament

«Voler l'impossible ens cal, i no que mori el desig.»

[Marià Villangómez Llobet; poeta eivissenc, 1913–2002]

∞

«Caminante, son tus huellas el camino, y nada más; caminante, no hay camino: se hace camino al andar. Al andar se hace camino, y al volver la vista atrás se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar. Caminante, no hay camino, sino estelas en la mar.»

[Antonio Machado Ruiz; poeta sevillano, 1875–1939]

∞

«It matters not how strait the gate, how charged with punishments the scroll. I am the master of my fate, I am the captain of my soul.»

[William Ernest Henley; english poet, 1849–1903]

∞

«On ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux.»

[Antoine Marie Jean-Baptiste Roger Conde de Saint-Exupéry; aviateur et écrivain français, 1900–1944]

∞

«È troppo facile essere originali facendo semplicemente l'opposto di ciò che fanno gli altri; questo è solo meccanico. L'errore dell'intellettuale consiste nel credere che si possa conoscere senza capire e, soprattutto, senza sentire ed essere appassionati.»

[Antonio Gramsci; filosofo italiano, 1891–1937]

∞

«Wahnsinn macht immer wieder dasselbe in der Hoffnung, unterschiedliche Ergebnisse zu erzielen. Wenn Sie es nicht einfach erklären können, verstehen Sie es nicht gut genug. Wer noch nie einen Fehler gemacht hat, hat noch nie etwas Neues ausprobiert.»

[Albert Einstein; Deutscher Physiker, 1879–1955]

∞

«Voetballen is heel eenvoudig, maar simpel voetballen is het moeilijkste dat er is. Voetbal moet altijd op een aantrekkelijke manier worden gespeeld, je moet aanvallend spelen, het moet spektakel zijn. Om te scoren, moet je schieten.»

[Hendrik Johannes Crujff; Nederlands voetballer en coach, 1947–2016]

Ho sento, però jo no vull ser emperador; aquest no és el meu ofici. No vull governar ni conquerir ningú, sinó ajudar a tots si fos possible. Jueus i gentils, blancs o negres. Hem d'ajudar-nos els uns als altres. Els éssers humans som així. Volem fer feliços als demés, no fer-los desgraciats. No volem odiar ni despreciar ningú. En aquest món hi ha lloc per tothom. La Terra és rica i pot alimentar tots els éssers. El camí de la vida pot ser lliure i preciós, però l'hem perdut. La cobdícia ha enverinat les ànimes. Ha aixecat barreres d'odi. Ens ha empès cap a la misèria i les matances. Hem progressat molt de pressa, però ens hem empresonat a nosaltres mateixos. El maquinisme, que crea abundància, ens deixa en la necessitat. El nostre coneixement ens ha fet cíncics. La nostra intel·ligència, durs i secs. Pensem massa i sentim molt poc. Més que màquines, necessitem humanitat. Més que intel·ligència, tenir bondat i dolçor. Sense aquestes qualitats, la vida serà violenta. Es perdrà tot. Els avions i la ràdio ens fan sentir-nos més propers. La vertadera naturalesa d'aquests invents exigeix bondat humana. Exigeix la germanor universal que ens uneixi a tots nosaltres. Ara mateix la meua veu arriba a milions d'éssers a tot el món, a milions d'homes desesperats, dones i nens. Víctimes d'un sistema que fa torturar els homes i empresonar gent innocent. Als qui poden sentir-me, els dic: no desespereu. La malaurança que patim no és més que la passatgera cobdícia i l'amargura d'homes que temen seguir el camí del progrés humà. L'odi dels homes passarà. I cauran els dictadors. I el poder que li van arrebatat al poble, se li retornarà al poble. I així, mentre l'home existeixi, la llibertat no perirà. Soldats, no us rendiu a aquests homes! que en realitat us desprecien, us esclavitzen, reglamenten les vostres vides i us diuen el que heu de fer, de pensar i de sentir. Us escombren el cervell, us enceben, us tracten com bestiar. I com carn de canyó. No us entregueu a aquests individus inhumans, homes màquines, amb cervells i cors de màquines. Vosaltres no sou màquines; no sou bestiar. Sou homes. Porteu l'amor de la humanitat als vostres cors. No l'odi. Només els que no estimen, odien. Els que no estimen i els inhumans. Soldats, no lluiteu per l'esclavitud, sinó per la llibertat! Al capítol 17è de Sant Lucas es llegeix: el regne de Déu està dins l'home. No d'un home ni d'un grup d'homes, sinó de tots els homes. En vosaltres. Vosaltres, el poble, teniu el poder. El poder de crear màquines, el poder de crear felicitat. Vosaltres, el poble, teniu el poder de fer aquesta vida lliure i preciosa. De convertir-la en una meravellosa aventura. En nom de la democràcia, utilitzem aquest poder actuant tots junts. Llitem per un món nou, digne i noble, que garanteixi feina a tots els homes. I que doni un futur a la joventut. I a la vellesa, seguretat. Amb la promesa d'aquestes coses, les feres van assolir el poder. Però van mentir. No han complert les seves promeses ni mai les compliran. Els dictadors són lliures, només ells. Però esclavitzen el poble. Llitem ara per fer nosaltres realitat allò promès. Tots a lluitar per alliberar el món. Per enderrocar barreres nacionals. Per eliminar l'ambició, l'odi i la intolerància. Llitem pel món de la raó. Un món on la ciència, on el progrés, ens condueixi a tots a la felicitat. Soldats, en nom de la democràcia, unim-nos tots!

Charlie Chaplin com a Charles Chaplin a "El Gran Dictador" (1940)

Abstract

Nucleoside transporters are essential for nucleotide homeostasis as well as for nucleoside-derived drugs bioavailability. Non-canonical natural nucleosides or “epigenetic nucleosides” are endogenously produced and possess pharmacological properties. Their pharmacological action depends on cytidine deaminase activity, which is a typical mechanism of chemoresistance induction for nucleoside-derived drugs. Thus, epigenetic nucleosides show a potential singular status in terms of cancer therapy approach. However, the interplay between these nucleosides and nucleoside transporters which might facilitate their bioavailability remains unknown. In order to unveil that question both interaction and translocation aspects of epigenetic nucleosides towards nucleoside transporters are addressed within this work.

In addition to epigenetic nucleosides, the possible interaction of ruxolitinib with nucleoside transporters is also studied in this work. Ruxolitinib is a Janus kinase inhibitor used for the treatment of negative Philadelphia-chromosome chronic myeloproliferative neoplasms. Since it is well known and perfectly established that several kinase inhibitors are recognized by nucleoside transporters, the same question has been raised for ruxolitinib. Additionally, the molecular structure of ruxolitinib contains a heterocycle which is highly similar to hypoxanthine, a key structural determinant for purine nucleoside recognition by nucleoside transporters. That particularity together with the fact that the main cell target of ruxolitinib are hematopoietic precursors which lack *de novo* nucleotide synthesis and completely depend on nucleoside salvage pathway make ruxolitinib a good candidate in terms of its interaction with nucleoside transporters.

As a result of this work, it is shown that epigenetic nucleosides are recognized by nucleoside transporters being even translocated by them in some cases. To that extent, two associations stand out over the rest: 5hmdC with hCNT1 and 5fdC with hENT1. The critical factor which determines molecular recognition turns out to be the chemical environment provided by the functional group at position 5 of the pyrimidine ring of the nucleoside. Unexpectedly, 5fdC turns out to be recognized and even transported by the purine-preferring transporter hCNT2. As to ruxolitinib, its interaction with hENT1 is elucidated. Due to this interaction, ruxolitinib has the capacity to modulate the pharmacological activity of nucleoside-derived drugs such as gemcitabine by inhibiting hENT1 activity.

Índex de Continguts

Llistat d'Abreviatures, Acrònims i Sigles.....	7
Llistat de Figures.....	17
Llistat de Taules.....	23
Introducció i Estat de la Qüestió.....	27
1. Nucleobases, nucleòsids, nucleòtids i àcids nucleics.....	29
1.1. Estructura de nucleobases, nucleòsids, nucleòtids i àcids nucleics	31
1.2. Síntesi de nucleòtids.....	31
1.2.1. Vies de recuperació.....	33
1.2.2. Síntesi <i>de novo</i>	36
1.2.3. Síntesi de desoxiribonucleòtids.....	38
1.2.4. Síntesi de nucleòtids en cèl·lules tumorals.....	39
1.3. Metabolisme de nucleòtids.....	40
2. Transportadors de nucleòsids.....	41
2.1. Transportadors equilibratius de nucleòsids.....	45
2.1.1. hENT1 (SLC29A1).....	47
2.1.2. hENT2 (SLC29A2).....	48
2.1.3. hENT3 (SLC29A3).....	50
2.1.4. hENT4 (SLC29A4).....	51
2.2. Transportadors concentratius de nucleòsids.....	52
2.2.1. hCNT1 (SLC28A1).....	53
2.2.2. hCNT2 (SLC28A2).....	54
2.2.3. hCNT3 (SLC28A3).....	55
2.3. Transportadors de cations orgànics.....	57
2.4. Estructura dels transportadors de nucleòsids.....	59
2.4.1. Estructura dels transportadors equilibratius de nucleòsids.....	59
2.4.2. Estructura dels transportadors concentratius de nucleòsids.....	61
2.4.3. Estructura dels transportadors de cations orgànics.....	64
2.4.4. Determinants estructurals d'interacció dels transportadors de nucleòsids i dels transportadors de cations orgànics.....	65
2.5. Regulació dels transportadors de nucleòsids.....	69
2.5.1. Regulació transcripcional.....	70
2.5.2. Regulació posttranscripcional.....	72
2.5.3. Regulació posttraduccional.....	72
2.5.4. Regulació proteica.....	73
2.5.5. Regulació purinèrgica.....	74
2.6. Aspectes dels transportadors de nucleòsids aliens a translocació.....	74
2.6.1. Biomarcadors.....	74
2.6.2. Transceptors.....	75

3. Fàrmacs derivats de nucleòsids.....	77
3.1. Mecanismes d'acció farmacològica.....	78
3.1.1. Terminació de l'elongació de la cadena d'àcids nucleics.....	79
3.1.2. Acumulació de variacions a la seqüència.....	79
3.1.3. Inducció de l'apoptosi.....	79
3.2. Antivirals.....	80
3.2.1. Inhibidors de la transcriptasa inversa derivats de nucleòsids.....	80
3.2.2. Inhibidors no nucleòsids utilitzats en teràpia antiretroviral.....	82
3.2.3. Anàlegs de nucleòsids antivirals utilitzats en infeccions diferents a la infecció pel virus de la immunodeficiència humana.....	83
3.3. Antitumorals.....	84
3.3.1. Càncers hematològics.....	84
3.3.2. Tumors sòlids.....	87
3.4. Altres indicacions.....	89
3.4.1. Immunosupressors.....	89
3.4.2. Neuroprotectors i cardioprotectors.....	90
3.4.3. Antihiperuricèmics.....	91
3.4.4. Antiparasitaris.....	91
3.5. Implicacions farmacològiques dels transportadors de nucleòsids.....	91
3.5.1. Mecanismes de resistència al tractament.....	92
4. Nucleòsids naturals no canònics o modificats epigenèticament.....	95
4.1. 5-metildesoxicitosina / 5-metildesoxicitidina (5mdC) i nucleobases no canòniques.....	95
4.2. 5-hidroximetildesoxicitosina / 5-hidroximetildesoxicitidina (5hmdC).....	97
4.3. 5-formildesoxicitosina / 5-formildesoxicitidina (5fdC) i 5-carboxildesoxicitosina / 5-carboxildesoxicitidina (5cadC).....	99
4.4. 5-hidroximetildesoxiuracil / 5-hidroximetildesoxiuridina (5hmdU).....	100
4.5. 6-metildesoxiadenina / 6-metildesoxiadenosina (m ⁶ dA).....	102
4.6. Distribució de les bases no canòniques al DNA genòmic.....	102
4.7. Funció fisiològica i mecanismes d'eliminació de bases no canòniques.....	103
4.7.1. Desmetilació passiva.....	104
4.7.2. Desmetilació activa.....	105
4.7.3. Desformilació i descarboxilació.....	107
4.8. Implicacions biològiques de la bidimensionalitat del codi genètic.....	107
4.9. Potencials aplicacions terapèutiques dels nucleòsids naturals no canònics...	108
5. Ruxolitinib.....	110
Objectius.....	113

Materials i Mètodes	117
1. Cultiu cel·lular.....	119
1.1. Àrea de treball.....	119
1.1.1. Equipament necessari.....	120
1.2. Manteniment de cèl·lules en cultiu.....	120
1.2.1. Passatge i plaqueig.....	121
1.2.1.1. <i>Materials</i>	121
1.2.1.2. <i>Procediment</i>	121
1.2.2. Congelació, criopreservació i descongelació.....	122
1.2.2.1. <i>Congelació</i>	122
1.2.2.2. <i>Criopreservació</i>	122
1.2.2.3. <i>Descongelació</i>	123
1.3. Comptatge de cèl·lules.....	123
1.3.1. Comptatge de cèl·lules en cambra de Neubauer.....	123
1.3.2. Comptatge de cèl·lules en <i>Countess™ Automated Cell Counter</i>	124
1.4. Línies cel·lulars.....	125
1.4.1. Línia cel·lular HEK293 (ATCC® CRL-1573™).....	125
1.4.2. Línia cel·lular MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™).....	125
1.4.3. Línia cel·lular TFK-1 (DSMZ® ACC 344™).....	126
1.5. Test de <i>Mycoplasma</i>	126
2. Transport de substrats.....	127
2.1. Medis de transport, tampons i reactius.....	128
2.1.1. Medis de transport.....	128
2.1.2. Tampons.....	129
2.1.3. Reactius.....	129
2.2. Assaig de transport en cèl·lules en monocapa.....	129
2.3. Determinació de la concentració de proteïna.....	131
2.4. Determinació de l'activitat específica (AE).....	131
2.5. Quantificació del transport de substrat.....	131
3. Assaigs de viabilitat cel·lular i citotoxicitat.....	132
3.1. Procediment.....	132
4. Expressió heteròloga de proteïnes.....	133
4.1. Transfecció transitòria amb <i>Lipofectamine® 2000</i>	134
5. Anàlisi de l'expressió de proteïnes.....	135
5.1. Obtenció de proteïnes a partir de cultius cel·lulars.....	135
5.2. Determinació de la concentració de proteïna.....	136
5.3. Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants.....	137
5.3.1. Gels de poliacrilamida.....	138
5.3.2. Tampons per a l'electroforesi de proteïnes.....	139
5.3.3. Preparació de mostres per a càrrega en el gel d'electroforesi.....	140

5.3.4.	Desenvolupament del gel d'electroforesi i separació electroforètica de proteïnes.....	140
5.4.	<i>Western Blot</i>	140
5.4.1.	Tampons per a <i>Western Blot</i>	141
5.4.2.	Electrotransferència de proteïnes.....	142
5.4.3.	Tinció amb vermell Ponceau.....	142
5.4.4.	Immunodetecció de proteïnes.....	143
5.4.4.1.	<i>Bloqueig d'unions inespecífiques</i>	143
5.4.4.2.	<i>Incubacions amb anticossos</i>	143
5.4.4.3.	<i>Revelat de la membrana i detecció de proteïnes</i>	144
5.5.	Anticossos utilitzats.....	145
5.5.1.	Anticossos primaris.....	145
5.5.2.	Anticossos secundaris.....	145
6.	Tècniques generals de biologia molecular.....	145
6.1.	Obtenció i purificació de fragments de DNA lineal.....	145
6.1.1.	Purificació de DNA lineal per columna.....	145
6.1.2.	Purificació de DNA a partir de banda de gel d'agarosa.....	146
6.1.3.	Determinació de la concentració de DNA.....	148
6.2.	Anàlisi i separació de fragments de DNA en gels d'agarosa.....	148
6.2.1.	Tampons per electroforesi de DNA en gels d'agarosa.....	148
6.2.2.	Elaboració de gels d'agarosa.....	149
6.2.3.	Desenvolupament del gel d'agarosa i separació electroforètica de DNA.....	149
6.3.	Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i tècniques derivades.....	150
6.3.1.	Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	150
6.3.2.	Reacció en cadena de la polimerasa de seqüenciació (PCR de seqüenciació).....	151
6.4.	Clonatge de gens.....	152
6.4.1.	Digestió enzimàtica de DNA amb endonucleases o enzims de restricció.....	152
6.4.2.	Lligació de DNA.....	153
6.5.	Amplificació de plasmidis de DNA.....	154
6.5.1.	Generació i obtenció de bacteris competents.....	154
6.5.2.	Transformació de bacteris competents i amplificació de DNA.....	156
6.5.3.	Extracció, aïllament, purificació i obtenció de DNA plasmídic.....	157
6.5.3.1.	<i>Obtenció de minipreps</i>	158
6.5.3.2.	<i>Obtenció de midipreps</i>	159
6.6.	Generació i obtenció del gen CDA contingut en el vector de treball pcDNA3...159	
7.	Modelatge per acoblament molecular (<i>molecular docking</i>).....	166
7.1.	Obtenció de lligands.....	166
7.2.	Obtenció de proteïnes.....	166
7.3.	Processament de proteïnes.....	167
7.4.	Acoblament molecular entre lligands i proteïnes.....	167
8.	Representació de dades i anàlisi estadística.....	167
8.1.	Representació de dades.....	167
8.2.	Anàlisi estadística.....	168

Resultats.....	169
1. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids.....	171
1.1. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors concentratius de nucleòsids.....	171
1.2. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1.....	172
1.3. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1 en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable de cadascun dels transportadors concentratius de nucleòsids.....	174
1.4. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb el transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2.....	177
1.5. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb el transportador de cations orgànics hOCT1.....	180
1.6. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids segons nucleòsid epigenètic.....	181
1.7. Determinació de constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids.....	184
2. Paper dels transportadors de nucleòsids en la biodisponibilitat i els mecanismes d'acció dels nucleòsids epigenètics.....	189
2.1. Implicació dels transportadors de nucleòsids en l'efecte dels nucleòsids epigenètics 5hmdC i 5fdC en absència de CDA.....	189
2.2. Determinació dels nivells de proteïna citidina desaminasa (CDA) en una bateria de línies cel·lulars de tumors hepàtics i gastrointestinals.....	191
2.3. Determinació dels nivells de proteïna citidina desaminasa (CDA) a les línies cel·lulars HEK293 genèticament modificades per a la sobreexpressió estable de transportadors concentratius de nucleòsids.....	192
2.4. Validació funcional del paper de l'enzim citidina desaminasa (CDA) en la citotoxicitat causada pels nucleòsids epigenètics en els models experimentals utilitzats.....	193
2.5. Estudi del paper dels transportadors de nucleòsids en la biodisponibilitat i el mecanisme d'acció dels nucleòsids epigenètics.....	197
2.6. Anàlisi microscòpica de la confluència i la morfologia cel·lulars en resposta al tractament amb els nucleòsids epigenètics 5hmdC i 5fdC en funció dels transportadors de nucleòsids.....	226
3. Modelatge dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids per acoblament molecular (<i>molecular docking</i>).....	245
3.1. Acoblament molecular dels nucleòsids epigenètics amb el transportador concentratiu de nucleòsids de <i>Vibrio cholerae</i> (vcCNT).....	245
3.2. Acoblament molecular dels nucleòsids epigenètics amb el transportador equilibratiu de nucleòsids 1 humana (hENT1).....	256
3.3. Termodinàmica de la interacció entre els nucleòsids epigenètics i els transportadors de nucleòsids a partir d'acoblament molecular.....	263

4.	Interacció de ruxolitinib amb els transportadors de nucleòsids.....	264
4.1.	Interacció de ruxolitinib amb els transportadors concentratius de nucleòsids.....	264
4.2.	Interacció de ruxolitinib amb el transportador equilibratiu de nucleòsids	
4.3.	hENT1.....	264
4.4.	Interacció de ruxolitinib amb el transportador de cations orgànics hOCT1.....	266
4.5.	Efecte de ruxolitinib i la seva combinació amb dipiridamol sobre el transport mitjançat pels transportadors hCNT1, hCNT3 i hENT.....	267
5.	Efecte de ruxolitinib en combinació amb altres fàrmacs anàlegs de nucleòsids.....	271
6.	Modelatge de ruxolitinib amb els transportadors de nucleòsids per acoblament molecular (<i>molecular docking</i>).....	276
6.1.	Acoblament molecular de ruxolitinib amb el transportador concentratiu de nucleòsids de <i>Vibrio cholerae</i> (vcCNT).....	276
6.2.	Acoblament molecular de ruxolitinib amb el transportador equilibratiu de nucleòsids 1 humà (hENT1).....	277
6.3.	Termodinàmica de la interacció entre ruxolitinib i els transportadors de nucleòsids a partir d'acoblament molecular.....	279
	Discussió.....	281
	Conclusions.....	303
	Referències.....	307

Llistat d'Abreviatures, Acrònims i Sigles

A	absorbància
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
Abc	abacavir
ACV	aciclovir
ADA	adenosina desaminasa
ADE2	fosforibosilaminoimidazol carboxilasa
ADK	adenosina quinasa
Ado	adenosina
ADSL	adenosuccinat liasa
ADSS	adenilsuccinat sintetasa
AE	activitat específica
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid formiltransferasa
AID/APOBEC3A	citosina desaminasa (<i>Activation-Induced Deaminase</i>) / enzim editor de l'mRNA de l'apolipoproteïna B 3A
AK	adenilat quinasa
AKT	proteïna quinasa B
AMPDA	adenosina monofosfat desaminasa
AMPK	adenosina monofosfat quinasa
AMV	amprenavir
ANOVA	anàlisi de variància
APRT	adenilat fosforibosiltransferasa
APS	persulfat d'amoni
APT	adenosina fosfotransferasa
ara-C	citarabina o arabinòsid de citosina
ara-G	nelarabina o arabinòsid de guanosina
ATC	aspartat carbamoïltransferasa
ATIC	enzim bifuncional AICAR + IMPCH
ATP	adenosina trifosfat
ATRA	àcid tot- <i>trans</i> -retinoic, <i>All-Trans-Retinoic Acid</i>
ATV	atazanavir
AZT	zidovudina o azidotimidina
BCA	àcid bicinconínic
BCR-ABL	<i>Breakpoint Cluster Region</i> – ABL tirosina quinasa

BER	reparació per escisió de base, <i>Base Excision Repair</i>
Bis	<i>N,N'</i> -metilenbisacrilamida
BSA	albúmica sèrica bovina
C/EBPα	<i>Ccaat-Enhancer Binding Protein</i> alpha
CAD	carbamoïlfosfat sintetasa II, aspartat transcarbamoïlase i dihidroorotasa
CAIRS	fosforibosilaminoimidazol carboxilasa
CD73	ecto 5'-nucleotidasa
CdA	cladribina
CDA	citidina desaminasa
CDK2	quinasa dependent de ciclina 2
CDS	seqüència codificadora
CK2	caseïna quinasa 2
CMPK	citidina monofosfat quinasa
CMPK1	citidina monofosfat quinasa 1
CMV	citomegalovirus
cN-I	5'-nucleotidasa citosòlica I
cN-II	5'-nucleotidasa citosòlica II
cN-III	5'-nucleotidasa citosòlica III
CNT	transportador concentratiu de nucleòsids
CpG	illa citosina-fosfat-guanina
CPSII	carbamoïlfosfat sintetasa II
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i>
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / Cas9</i>
d4T	estavudina
dA	2'-desoxiadenosina
dATP	2'-desoxiadenosina trifosfat
dC	2'-desoxicitidina
dCK	desoxicitidina quinasa
dCMP	2'-desoxicitidina monofosfat
DCTD	desoxicitidina monofosfat desaminasa
dCTP	2'-desoxicitidina trifosfat
ddA	2',3'-didesoxiadenosina
ddATP	2',3'-didesoxiadenosina trifosfat
ddC	2',3'-didesoxicitidina

ddCTP	2',3'-didesoxicitidina trifosfat
ddGTP	2',3'-didesoxiguanosina trifosfat
ddl	didanosina o 2',3'-didesoxiinosina
ddTTP	2',3'-didesoxitimidina trifosfat
dFdC	gemcitabina o 3',3'-difluor-2'-desoxicitidina
dG	2'-desoxiguanosina
dGK	desoxiguanosina quinasa
dGMP	2'-desoxiguanosina monofosfat
dGTP	2'-desoxiguanosina trifosfat
DHFR	dihidrofolat reductasa
DHOdH	dihidroorotat deshidrogenasa
DHOsa	dihidroorotasa
dIMP	2'-desoxiinosina monofosfat
Dip	dipiridamol
DLV	delavirdina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNAsa	nucleasa d'àcid desoxiribonucleic
DNMT1	DNA metiltransferasa 1
DNMT3A	DNA metiltransferasa 3A
DNMT3B	DNA metiltransferasa 3B
dNTP	2'-desoxinucleòsid trifosfat
dpm	desintegracions per minut
DRV	darunavir
dT	2'-desoxitimidina
dTMP	2'-desoxitimidina monofosfat
dTTP	2'-desoxitimidina trifosfat
DTYMK	desoxitimidina monofosfat quinasa
dUMP	2'-desoxiuridina monofosfat
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
Eco	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EFZ	efavirenz
ENT	transportador equilibratiu de nucleòsids

ENTB1	transportador de nucleobases de purina 1
ErbB2	receptor epidèrmic humà 2
ERK	quinasa regulada per senyals extracel·lulars
ETV	etravirina
FAD	dinucleòtid de flavina i adenina
F-ara-A	fludarabina
FBS	sèrum boví fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLT3	tirosina quinasa tipus- <i>Fms</i> 3
FTC	emtricitabina
GART	fosforibosilglicinamida formiltransferasa
GC	guanina-citosina
Gemc	gemcitabina
GK	guanilat quinasa
GMPS	guanosina monofosfat sintetasa
GPCR	receptor acoblat a proteïna G
GRP58	proteïna regulada per glucosa 58
hCNT	transportador concentratiu de nucleòsids humà
hCNT1	transportador concentratiu de nucleòsids 1 humà
hCNT2	transportador concentratiu de nucleòsids 2 humà
hCNT3	transportador concentratiu de nucleòsids 3 humà
HEK	ronyó embrionari humà
hENT	transportador equilibratiu de nucleòsids humà
hENT1	transportador equilibratiu de nucleòsids 1 humà
hENT2	transportador equilibratiu de nucleòsids 2 humà
hENT3	transportador equilibratiu de nucleòsids 3 humà
hENT4	transportador equilibratiu de nucleòsids 4 humà
HER2/neu	receptor epidèrmic humà 2
HGPRT	hipoxantina guanina fosforibosil transferasa
HIF-1α	factor induïble per hipòxia 1 alpha
<i>Hin</i>	<i>Hæmophilus influenzae</i>
HIV	virus de la immunodeficiència humana
HNF3γ	factor nuclear d'hepatòcit 3 gamma
HNF4α	factor nuclear d'hepatòcit 4 alpha

hOCT	transportador de cations orgànics humà
HRP	peroxidasa de rave
hSPNT	transportador de nucleòsids de purina dependent de sodi humà
IC₅₀	concentració inhibidora 50%
IDH1	isocitrat deshidrogenasa 1
IDH2	isocitrat deshidrogenasa 2
IFN-α	interferó alpha
IFN-γ	interferó gamma
IL-6	interleucina 6
IMP	inosina monofosfat
IMPCH	inosina monofosfat ciclohidrolasa
INV	indinavir
J	base J o β -D-glucopiranosiloximetiluracil
JAK	quinasa de <i>Janus</i>
JAK1	quinasa de <i>Janus</i> 1
JAK2	quinasa de <i>Janus</i> 2
JBP1	<i>J Binding Protein</i> 1
JBP2	<i>J Binding Protein</i> 2
JNK	quinasa N-terminal de c-Jun
K_i	constant d'inhibició
K_M	constant d'afinitat o constant de Michaelis-Menten
LB	<i>Lysogeny Broth</i> , brou de lisogènia
LPS	lipopolisacàrid
LPV	lopinavir
m/V	massa/volum
m/z	massa/càrrega
m⁴dC	4-metil-2'-desoxicitidina
m⁶A	6-metiladenosina o 6-metiladenina
m⁶dA	6-metil-2'-desoxiadenosina o 6-metil-2'-desoxiadenina
MAPK	proteïna quinasa activada per mitògens
MAZ	proteïna de zinc associada a <i>myc</i>
mCNT	transportador concentratiu de nucleòsids de ratolí
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDR	transportador de resistència a múltiples fàrmacs, <i>MultiDrug Resistance</i>
MDS	síndromes de deleció de DNA mitocondrial

MeCP2	<i>Methyl-CpG binding Protein 2</i>
mENT	transportador equilibratiu de nucleòsids de ratolí
mESC	cèl·lula mare embrionària mesenquimàtica
miRNA	micro àcid ribonucleic
MOPS	àcid 3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfònic
MPP⁺	1-metil-4-fenilpiridini
mtDNA	àcid desoxiribonucleic mitocondrial
mTORC1	complex 1 de la diana de rapamicina de mamífers
MTT	bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
NAD	dinucleòtid d'adenina i nicotinamida
NADP	dinucleòtid d'adenina i nicotinamida fosfat
NBTI	nitrobenziltioinosina
NDP	nucleòsid difosfat
NFV	nelfinavir
NH₄⁺	amoni
NK	nucleòsid quinasa
NMDG	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -glucamina
NMP	nucleòsid monofosfat
NMPK	nucleòsid monofosfat quinasa
NNRTI	inhibidor de la transcriptasa inversa no derivat de nucleòsids
NR2A1	factor nuclear d'hepatòcit 4 alpha
NVP	nevirapina
nwCNT	transportador concentratiu de nucleòsids de <i>Neisseria wadsworthii</i>
OAT	transportador d'anions orgànics
P/V	pes/volum
P2Y	receptor purinèrgic acoblat a proteïna G
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
PAICS	complex enzimàtic bifuncional CAIRS + SAICARS
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDIA3	proteïna disulfat-isomerasa A3
PGC-1α	coactivador 1 alpha de PPAR γ
Ph	<i>Philadelphia</i> , Filadèlfia
PHID	síndrome d'hipertricosi pigmentària amb diabetes insulino-dependent

PI₃K	fosfoinositol 3-quinasa
PKA	proteïna quinasa A
PKB	proteïna quinasa B
PKC	proteïna quinasa C
PMAT	transportador de monoamines de membrana plasmàtica
PNP	nucleòsid de purina fosforilasa
POLG1	subunitat gamma de la DNA polimerasa 1
PP	pirofosfat
PPARα	receptor activat per proliferadors peroxisomals alpha
PPARγ	receptor activat per proliferadors peroxisomals gamma
PPAT	fosforibosil pirofosfat amidotransferasa
PPP_i	trifosfat inorgànic
pRb	proteïna del retinoblastoma
prot	proteïna
PRPP	fosforibosil pirofosfat
PRPP-AT	fosforibosil pirofosfat aminotransferasa
PVDF	fluorur de polivinilidè
q.s.p.	quantitat suficient per
RAL	raltegavir
rCNT	transportador concentratiu de nucleòsids de rata
rENT	transportador equilibratiu de nucleòsids de rata
RNA	àcid ribonucleic
RNA_s	nucleasa d'àcid ribonucleic
RNR	ribonucleòtid reductasa
rOCT	transportador de cations orgànics de rata
ROS	espècie reactiva d'oxigen
rpm	revolucions per minut
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RS1	retinosquisina 1
RTV	ritonavir
Ruxo	ruxolitinib
S	substrat
S6K1	proteïna S6 quinasa 1
SAICARS	fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintasa
SALL4	proteïna 4 de tipus Sal

SAM	S-adenosilmetionina
SAMHD1	<i>Sterile alpha-Motif and Histidine-aspartate Domain-containing 1</i>
SDS	dodecilsulfat sòdic
SGLT1	cotransportador de sodi i glucosa 1
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SHP	<i>Small Heterodimer Partner</i>
SLC	<i>Solute Carrier</i>
SLC22	<i>Solute Carrier 22</i>
SLC28	<i>Solute Carrier 28</i>
SLC29	<i>Solute Carrier 29</i>
SLS	laurilsulfat sòdic
SMCT1	transportador de monocarboxilats acoblat a sodi 1
SMUG1	<i>Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosilase 1</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOCS	supressor de senyalització per citoquines
SPNT	transportador de nucleòsids de purina dependent de sodi
SQV	saquinavir
ssDNA	àcid desoxiribonucleic de cadena senzilla
STAT	transductor de senyal i activador de la transcripció
t_{1/2}	semivida
T₃	triiodetironina
TAE	tampó Tris, acetat i EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	tampó Tris, borat i EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TDF	tenofovir
TDG	timina DNA glicosilasa
TdGTP	tiodesoxiguanosina trifosfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
TET	<i>Ten-to-Eleven Translocation</i>
TGF-β	factor de creixement tumoral beta
TGDP	tioguanosina difosfat
TGMP	tioguanosina monofosfat
TGTP	tioguanosina trifosfat

TIMP	tiinosina monofosfat
TK	tirosina quinasa
TK1	tirosina quinasa 1
TK2	tirosina quinasa 2
T_m	temperatura d'hibridació
TNF-α	factor de necrosi tumoral alpha
TP	timidina fosforilasa
TPV	tipranavir
TS	timidilat sintasa
TSS	lloc d'inici de la transcripció
U	unitats
UCK	uridina citidina quinasa
UDG	uracil DNA glicosilasa
UHRF1	<i>Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains 1</i>
UMPS	uridina monofosfat sintetasa
UMP/CMPK	uridina monofosfat / citidina monofosfat quinasa
UP	uridina fosforilasa
Urd	uridina
V₀	volum inicial
v₀	velocitat inicial
vcCNT	transportador concentratiu de nucleòsids de <i>Vibrio cholerae</i>
V_{max}	velocitat màxima
ZEB1	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>
Δ	deleció
ΔG°	energia lliure de Gibbs
ΔG°_{\min}	energia lliure de Gibbs mínima
λ	longitud d'ona
3D-QSAR	relacions estructura-activitat quantitatives tridimensionals
3TC	lamivudina
5'-dFU	5'-desoxi-5-fluorouridina
5'-N	5'-nucleotidasa
5-FU	5-fluorouracil
5caC	5-carboxilcitidina
5cadC	5-carboxil-2'-desoxicitidina
5cadCTP	5-carboxil-2'-desoxicitidina trifosfat

5cadU	5-carboxil-2'-desoxiuridina
5cadUTP	5-carboxil-2'-desoxiuridina trifosfat
5fC	5-formilcitidina
5fdC	5-formil-2'-desoxicitidina
5fdCTP	5-formil-2'-desoxicitidina trifosfat
5fdU	5-formil-2'-desoxiuridina
5fdUTP	5-formil-2'-desoxiuridina trifosfat
5hmC	5-hidroximetilcitidina
5hmCpG	illa 5-hidroximetilcitosina–fosfat–guanina
5hmdC	5-hidroximetil-2'-desoxicitidina
5hmdCTP	5-hidroximetil-2'-desoxicitidina trifosfat
5hmdU	5-hidroximetil-2'-desoxiuridina
5hmdUTP	5-hidroximetil-2'-desoxiuridina trifosfat
5mdC	5-metil-2'-desoxicitidina
8-oxo-dG	8-oxo-2'-desoxiguanosina

Llistat de Figures

- Figura 1.** Nucleòsids naturals ⇒ 29
- Figura 2.** Síntesi de nucleòtids de purines per la via de recuperació i per síntesi *de novo* ⇒ 33
- Figura 3.** Síntesi de nucleòtids per les vies de recuperació ⇒ 36
- Figura 4.** Síntesi *de novo* de nucleòtids de pirimidines ⇒ 37
- Figura 5.** Síntesi *de novo* de nucleòtids de purines ⇒ 38
- Figura 6.** Efecte Warburg ⇒ 40
- Figura 7.** Superfamília de transportadors *Solute Carrier* o SLC ⇒ 42
- Figura 8.** Transportadors de nucleòsids ⇒ 43
- Figura 9.** Distribució asimètrica dels transportadors de nucleòsids ⇒ 45
- Figura 10.** Inhibidors dels transportadors equilibratius de nucleòsids ⇒ 46
- Figura 11.** Especificitat de substrat dels transportadors equilibratius de nucleòsids ⇒ 51
- Figura 12.** Especificitat de substrat dels transportadors concentratius de nucleòsids ⇒ 53
- Figura 13.** Substrats dels transportadors de cations orgànics ⇒ 59
- Figura 14.** Estructura dels transportadors equilibratius de nucleòsids ⇒ 60
- Figura 15.** Estructura dels transportadors concentratius de nucleòsids ⇒ 63
- Figura 16.** Estructura dels transportadors de cations orgànics ⇒ 64
- Figura 17.** Determinants estructurals i farmacòfors dels substrats envers el seu reconeixement molecular per part dels transportadors de nucleòsids ⇒ 67
- Figura 18.** Possibles estructures conformacionals dels nucleòsids ⇒ 69
- Figura 19.** Transceptors ⇒ 76–77
- Figura 20.** Fàrmacs anàlegs de nucleòsids ⇒ 78
- Figura 21.** Fàrmacs antivirals anàlegs de nucleòsids ⇒ 84
- Figura 22.** Fàrmacs antitumorals anàlegs de nucleòsids ⇒ 89
- Figura 23.** Alopurinol ⇒ 91
- Figura 24.** Activació i mecanismes d'acció dels fàrmacs derivats de nucleòsids ⇒ 92
- Figura 25.** Inactivació d'anàlegs de nucleòsids per desaminació ⇒ 95

Figura 26. Nucleòsids naturals no canònics ⇒ [96–97](#)

Figura 27. Nucleòsids naturals de citosina no canònics ⇒ [100](#)

Figura 28. Oxidació de timina a 5-hidroximetiluracil i síntesi de la base J ⇒ [101](#)

Figura 29. Cicle de metilació i desmetilació de desoxicitosina i d'oxidacions de 5mdC ⇒ [103](#)

Figura 30. Distribució cel·lular i tissular dels desoxinucleòsids naturals de citosina ⇒ [104](#)

Figura 31. Mecanismes d'eliminació del grup metil de la posició 5 ⇒ [106](#)

Figura 32. Estructura bidimensional del codi genètic ⇒ [107](#)

Figura 33. Utilització de la via de recuperació de nucleòsids per part dels nucleòsids epigenètics ⇒ [109](#)

Figura 34. Ruxolitinib ⇒ [110](#)

Figura 35. Via de senyalització JAK–STAT ⇒ [112](#)

Figura 36. Cambra de Neubauer per a recompte cel·lular ⇒ [126](#)

Figura 37. Amplificació i aïllament del fragment de DNA corresponent al gen *CDA* ⇒ [163](#)

Figura 38. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors concentratius de nucleòsids ⇒ [173–174](#)

Figura 39. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1 ⇒ [175–176](#)

Figura 40. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1 i els transportadors concentratius de nucleòsids ⇒ [177–178](#)

Figura 41. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hCNT2 ⇒ [179–180](#)

Figura 42. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1 i hCNT2 ⇒ [181](#)

Figura 43. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hOCT1 ⇒ [182](#)

Figura 44. Perfils d'interacció dels transportadors de nucleòsids amb els nucleòsids epigenètics ⇒ [183](#)

Figura 45. Perfils d'interacció d'hENT1 amb els nucleòsids epigenètics ⇒ [185](#)

Figura 46. Constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb hCNT1 ⇒ [187](#)

Figura 47. Constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb hCNT3 ⇒ [188–189](#)

Figura 48. Constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1 ⇒ [189–190](#)

Figura 49. Efecte de 5hmdC sobre la viabilitat cel·lular segons transportador de nucleòsids i en absència de CDA ⇒ [191–192](#)

Figura 50. Efecte de 5fdC sobre la viabilitat cel·lular segons transportador de nucleòsids i en absència de CDA ⇒ [192](#)

Figura 51. Expressió de CDA a nivell de proteïna en una bateria de línies cel·lulars ⇒ [193–194](#)

Figura 52. Expressió de CDA a nivell de proteïna en cèl·lules TFK-1 i HEK293 ⇒ [194](#)

Figura 53. Efecte de 5mdC sobre la viabilitat cel·lular ⇒ [196](#)

Figura 54. Efecte de 5hmdC sobre la viabilitat cel·lular ⇒ [197](#)

Figura 55. Efecte de 5fdC sobre la viabilitat cel·lular ⇒ [198](#)

Figura 56. Efecte de 5hmdU sobre la viabilitat cel·lular ⇒ [199](#)

Figura 57. Transport de 5mdC per hCNT1 ⇒ [201](#)

Figura 58. Transport de 5hmdC per hCNT1 ⇒ [202](#)

Figura 59. Transport de 5fdC per hCNT1 ⇒ [203–204](#)

Figura 60. Transport de 5hmdU per hCNT1 ⇒ [204–205](#)

Figura 61. Transport de 5mdC per hCNT2 ⇒ [205–206](#)

Figura 62. Transport de 5hmdC per hCNT2 ⇒ [206–207](#)

Figura 63. Transport de 5fdC per hCNT2 ⇒ [208](#)

Figura 64. Transport de 5hmdU per hCNT2 ⇒ [209](#)

Figura 65. Transport de 5mdC per hCNT3 ⇒ [210–211](#)

Figura 66. Transport de 5hmdC per hCNT3 ⇒ [211](#)

Figura 67. Transport de 5fdC per hCNT3 ⇒ [212–213](#)

Figura 68. Transport de 5hmdU per hCNT3 ⇒ [213–214](#)

Figura 69. Transport de 5mdC per hENT1 ⇒ [214–215](#)

Figura 70. Transport de 5hmdC per hENT1 ⇒ [215–216](#)

Figura 71. Transport de 5fdC per hENT1 ⇒ [216–217](#)

Figura 72. Transport de 5hmdU per hENT1 ⇒ [217–218](#)

Figura 73. Expressió de CDA i hOCT1 a nivell de proteïna en cèl·lules TFK-1 i HEK293 ⇒ [219](#)

Figura 74. Efecte de CDA i/o hOCT1 sobre la viabilitat cel·lular en resposta a 5hmdC en presència de hCNT1 ⇒ [219](#)

Figura 75. Captació de 5fdC per hENT1 amb i sense inhibidor ⇒ [221](#)

Figura 76. Captació de 5fdC amb blocatge d'hENT1 ⇒ [222](#)

Figura 77. Captació de 5fdC a través d'hCNT1 ⇒ [223](#)

Figura 78. Captació de 5fdC a través d'hCNT2 ⇒ [224–225](#)

Figura 79. Captació de 5fdC (0,5 – 10 µM) a través d'hCNT3 ⇒ [225–226](#)

Figura 80. Captació de 5fdC (10 – 500 µM) a través d'hCNT3 ⇒ [226](#)

Figura 81. Captació de 5fdC a través d'hOCT1 ⇒ [227](#)

Figura 82. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 (I) ⇒ [228–229](#)

Figura 83. Efecte de la captació de 5hmdC per hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [229](#)

Figura 84. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hCNT1 (I) ⇒ [230](#)

Figura 85. Efecte de la captació de 5hmdC per hCNT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [231](#)

Figura 86. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 (II) ⇒ [232](#)

Figura 87. Efecte de la captació de 5fdC per hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [233](#)

Figura 88. Efecte de 5fdC amb blocatge d'hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [234](#)

Figura 89. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i la morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hCNT1 (II) ⇒ [235](#)

Figura 90. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT1 i hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [236](#)

Figura 91. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [237](#)

Figura 92. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i la morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hCNT2 ⇒ [238](#)

Figura 93. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT2 i hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [239](#)

Figura 94. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT2 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [240](#)

Figura 95. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i la morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hCNT3 ⇒ [241](#)

Figura 96. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT3 i hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [242](#)

Figura 97. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT3 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [243](#)

Figura 98. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i la morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hOCT1 ⇒ [244](#)

Figura 99. Efecte de la captació de 5fdC per hOCT1 i hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [245](#)

Figura 100. Efecte de la captació de 5fdC per hOCT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars ⇒ [246](#)

Figura 101. Estructura de vcCNT ⇒ [247](#)

Figura 102. Acoblament molecular entre 5mdC i vcCNT ⇒ [248–249](#)

Figura 103. Acoblament molecular entre 5hmdC i vcCNT ⇒ [250–251](#)

Figura 104. Acoblament molecular entre 5fdC i vcCNT ⇒ [252–253](#)

Figura 105. Acoblament molecular entre 5cadC i vcCNT ⇒ [254–255](#)

Figura 106. Acoblament molecular entre 5hmdU i vcCNT ⇒ [256–257](#)

Figura 107. Estructura d'hENT1 ⇒ [258](#)

Figura 108. Acoblament molecular entre 5mdC i hENT1 ⇒ [259](#)

Figura 109. Acoblament molecular entre 5hmdC i hENT1 ⇒ [260](#)

Figura 110. Acoblament molecular entre 5fdC i hENT1 ⇒ [261–262](#)

Figura 111. Acoblament molecular entre 5cadC i hENT1 ⇒ [263](#)

Figura 112. Acoblament molecular entre 5hmdU i hENT1 ⇒ [264–265](#)

Figura 113. Interacció de ruxolitinib amb els transportadors de nucleòsids ⇒ [266](#)

Figura 114. Interacció de ruxolitinib amb hENT1 (I) ⇒ [267](#)

Figura 115. Interacció de ruxolitinib amb hCNT1, hCNT2, o hCNT3; i hENT1 ⇒ [268](#)

Figura 116. Interacció de ruxolitinib amb hOCT1 ⇒ [269](#)

Figura 117. Interacció de ruxolitinib amb hCNT1 ⇒ [271](#)

Figura 118. Interacció de ruxolitinib amb hCNT3 ⇒ [271–272](#)

Figura 119. Interacció de ruxolitinib amb hENT1 (II) ⇒ [272](#)

Figura 120. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hENT1 ⇒ [273–274](#)

Figura 121. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hCNT1 ⇒ [274](#)

Figura 122. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hCNT3 ⇒ [275](#)

Figura 123. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hENT1, hCNT1 i hCNT3 ⇒ [276](#)

Figura 124. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hENT1 i/o hCNT3 ⇒ [277](#)

Figura 125. Molècula de ruxolitinib ⇒ [278](#)

Figura 126. Acoblament molecular entre ruxolitinib i vcCNT ⇒ [279](#)

Figura 127. Acoblament molecular entre ruxolitinib i hENT1 ⇒ [280](#)

Figura 128. Parentesc estructural de les cetones d'uridina i 5fdC en el reconeixement molecular per hCNT2 ⇒ [300](#)

Llistat de Taules

- Taula 1.** Transportadors equilibratius de nucleòsids hENT1 i hENT2 ⇒ 49–50
- Taula 2.** Transportadors concentratius de nucleòsids ⇒ 57
- Taula 3.** Preparació de tampó TBS 1× per a cultiu cel·lular ⇒ 123
- Taula 4.** Suports per a cultiu cel·lular ⇒ 124
- Taula 5.** Preparació de medi sodi ⇒ 130
- Taula 6.** Preparació de medi colina ⇒ 130
- Taula 7.** Preparació de medi *N*-metil-*D*-glucamina ⇒ 130
- Taula 8.** Preparació de medi *STOP* ⇒ 131
- Taula 9.** Preparació de tampó de lisi cel·lular per a assaigs de transport ⇒ 131
- Taula 10.** Substrats utilitzats en assaigs de transport ⇒ 131
- Taula 11.** Substrats marcats radioisotòpicament utilitzats en assaigs de transport ⇒ 131
- Taula 12.** Líquid d'escintil·lació utilitzat en assaigs de transport ⇒ 131
- Taula 13.** Transfecció transitòria de DNA amb *Lipofectamine*® 2000 ⇒ 137
- Taula 14.** Preparació de tampó TBS 1× per a extracció de proteïnes ⇒ 137
- Taula 15.** Preparació de tampó de lisi cel·lular per a extracció de proteïnes ⇒ 138
- Taula 16.** Percentatges d'acrilamida en *Western Blot* i massa molecular de les proteïnes ⇒ 140
- Taula 17.** Preparació de gel separador per a *Western Blot* ⇒ 140
- Taula 18.** Preparació de gel apilador per a *Western Blot* ⇒ 141
- Taula 19.** Preparació de tampó d'electroforesi 10× per a *Western Blot* ⇒ 141
- Taula 20.** Preparació de tampó de càrrega 5× per a *Western Blot* ⇒ 141
- Taula 21.** Preparació de tampó de transferència 10× per a *Western Blot* ⇒ 143
- Taula 22.** Preparació de tampó de transferència 1× per a *Western Blot* ⇒ 143
- Taula 23.** Preparació de Tris salí tamponat o TBS 10× per a *Western Blot* ⇒ 143
- Taula 24.** Preparació de tampó TBS-*Tween* 1× per a *Western Blot* ⇒ 144
- Taula 25.** Anticossos primaris ⇒ 147

Taula 26. Anticossos secundaris ⇒ 147

Taula 27. Purificació de DNA per columna ⇒ 148

Taula 28. Preparació de tampó TBE 5× per a electroforesi de DNA en gels d'agarosa ⇒ 150

Taula 29. Preparació de tampó TAE 10× per a electroforesi de DNA en gels d'agarosa ⇒ 150

Taula 30. Preparació de tampó de càrrega per a electroforesi de DNA en gels d'agarosa ⇒ 150

Taula 31. Reacció en cadena de la polimerasa o PCR ⇒ 152

Taula 32. Reacció en cadena de la polimerasa o PCR de seqüenciació ⇒ 154

Taula 33. Reacció de digestió de fragments de DNA amb enzims de restricció ⇒ 155

Taula 34. Reacció de desfosforilació de fragments de DNA a l'extrem 3' ⇒ 155

Taula 35. Reacció de ligació de fragments de DNA ⇒ 156

Taula 36. Preparació de brou de lisogènia (medi LB) ⇒ 157

Taula 37. Preparació de brou superòptim (medi SOB) ⇒ 157

Taula 38. Preparació de medi RF1 ⇒ 157

Taula 39. Preparació de medi RF2 ⇒ 158

Taula 40. Preparació d'agar per a plaques de cultiu bacterià ⇒ 159

Taula 41. Encebadors o *primers* per a l'amplificació de *CDA* ⇒ 162

Taula 42. Preparació de la PCR per al gen *CDA* ⇒ 162

Taula 43. Etapes de la PCR per a l'amplificació de *CDA* ⇒ 163

Taula 44. Reacció de digestió del fragment de DNA corresponent a *CDA* mitjançant enzims de restricció ⇒ 163

Taula 45. Reacció de 3'-desfosforilació de fragments de DNA ⇒ 164

Taula 46. Reacció de ligació de DNA de *CDA* ⇒ 165

Taula 47. Reacció de PCR de seqüenciació de *CDA* ⇒ 165

Taula 48. Constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb hCNT1, hCNT3 i hENT1 ⇒ 190

Taula 49. Termodinàmica de la interacció entre els nucleòsids epigenètics i els transportadors de nucleòsids ⇒ 265

Taula 50. Termodinàmica de la interacció entre ruxolitinib i els transportadors de nucleòsids

⇒ [281](#)



Introducció i Estat de la Qüestió

1. Nucleobases, nucleòsids, nucleòtids i àcids nucleics

Els nucleòsids naturals estan formats per una nucleobase, que pot ser de purina (adenosina, guanosina i inosina) o de pirimidina (citidina, timidina i uridina); i per una pentosa, que pot ser una ribosa o una desoxiribosa; ambdós units per un enllaç β -glicosídic. Els nucleòtids són nucleòsids amb un (α), dos (α i β) o tres (α , β , i γ) units a l'àtom d'oxigen del grup hidroxil de la posició 5' del nucleòsid (King *et al.*, 2006a).

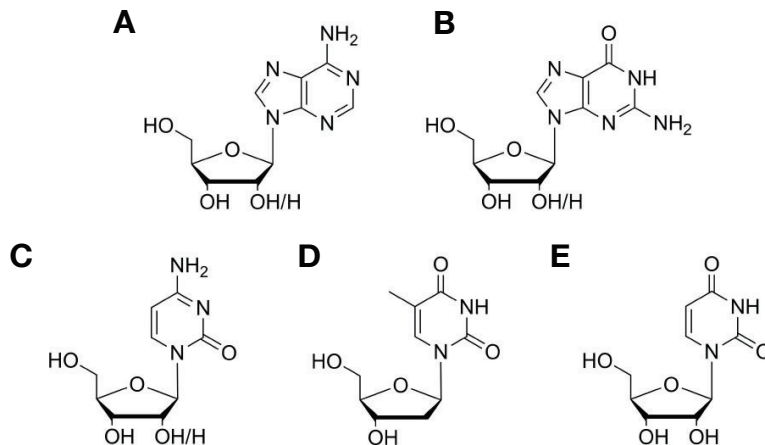


Figura 1. Nucleòsids naturals. Estructura dels diversos nucleòsids naturals de purines (**A** i **B**) i de pirimidines (**C**, **D** i **E**). (**A**) Adenosina ($R^{2'}=OH$) i desoxiadenosina ($R^{2'}=H$), (**B**) guanosina ($R^{2'}=OH$) i desoxiguanosina ($R^{2'}=H$), (**C**) citidina ($R^{2'}=OH$) i desoxicitidina ($R^{2'}=H$), (**D**) desoxitimidina i (**E**) uridina.

Els nucleòsids participen en multitud de processos cel·lulars, entre els que s'hi troben la síntesi d'àcid desoxiribonucleic (DNA) i d'àcids ribonucleics (RNA), la senyalització cel·lular mitjançant segons missatgers – tant intracel·lular (cAMP i cGMP) com extracel·lular –, la regulació enzimàtica, la regulació del metabolisme, la utilització d'adenosina trifosfat (ATP) i guanosina trifosfat (GTP) com a mediadors de subministrament d'energia i la formació d'ATP i coenzims (coenzim A o CoA, S-adenosilmetionina o SAM, dinucleòtid de nicotina i adenina o NAD, nicotinadenindinucleòtid fosfat o NADP, i dinucleòtid de flavina i adenina o FAD) en tant que precursors. A més, algun nucleòsid en particular, com és el cas d'adenosina, té les seves pròpies funcions a través de la seva interacció amb receptors d'adenosina A1, A2A, A2B i A3 (Geiger *et al.*, 1985; Leung i Tse, 2007), alliberament de potassi (Szkotak *et al.*, 2001), acetilcolina (Pinto-Duarte *et al.*, 2005) i glutamat (Ackley *et al.*, 2003). L'adenosina té funcions en vasodilatació i manteniment del to vascular (Shryock i Belardinelli, 1997; O'Regan, 2005; Burnstock, 2009), manteniment del to muscular (Huber-Ruano *et al.*, 2010), neuromodulació (Takahashi *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 1993; Burnstock, 1997; Ribeiro, 2005), cardioprotecció

(**Angelakos** i **Glassman**, 1961; **O'Regan**, 2005; **Willems** *et al.*, 2005; **Naydenova** *et al.*, 2008), resposta immunitària (**Hasko** *et al.*, 2008), processos inflamatoris (**Ye** i **Rajendran**, 2009), agregació plaquetària (**Lang** *et al.*, 2004) i funció renal (**Elwi** *et al.*, 2006; **Vallon** *et al.*, 2006; **Praetorius** i **Leipzig**, 2010).

Els nucleòsids actuen com activadors metabòlics en processos anabòlics, com ara UDP-glucosa en la síntesi de glicogen (**Bulter** i **Elling**, 1999) i CDP-diacilglicerol en la síntesi de lípids, i també com a font energètica en diverses reaccions enzimàtiques (**Lane** i **Fan**, 2015; **Aymerich**, 2005). Els nucleòsids també actuen com antioxidants en tant que tenen capacitat de disminuir els nivells de radicals lliures o espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *Reactive Oxygen Species*) (**Rose** i **Coe**, 2008). L'homeòstasi de nucleòsids és essencial i, en conseqüència, és altament regulada, donat que és quelcom fonamental per al manteniment de la integritat genòmica (**Pai** i **Kearsey**, 2017). L'existència d'alteracions en els nucleòsids i/o nucleòtids és causant del desenvolupament de patologies renals, càncer, immunodeficiències i patologies mitocondrials (**Aird** i **Zhang**, 2015). A més d'alteracions en els nucleòsids pròpiament dits, les alteracions en els seus nivells també són responsables d'un increment en el nombre de mutacions en el DNA i de promoure processos de tumorigènesi. Mentre que un augment dels nivells de nucleòsids correlaciona amb una disminució de la fidelitat de la replicació del DNA, una reducció dels nivells de nucleòsids cursa amb un augment de mutagènesi i de genotoxicitat. Per tant, en conseqüència, un canvi significatiu en la concentració intracel·lular de nucleòsids resulta en una desregulació del cicle cel·lular que al seu torn resulta en un augment descontrolat de la proliferació cel·lular (**Kohnken** *et al.*, 2015). Més enllà d'això, variacions rellevants en la concentració intracel·lular d'adenosina trifosfat o ATP és determinant per a l'estatus energètic dels tumors. Per aquesta raó, els transportadors de nucleòsids tenen un rol absolutament essencial en el manteniment de l'homeòstasi de nucleòsids, tant pel que fa a la seva entrada a les cèl·lules com a la seva sortida, tant a nivell fisiològic com en patologia (**Young** *et al.*, 2013). Existeixen patologies severes que estan causades per alteracions del metabolisme de nucleòtids i/o mutacions en algun dels seus enzims. Un dèficit en l'activitat enzimàtica hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) ocasiona la malaltia de Lesch-Nyan, que cursa amb disfunció renal, hiperuricèmia i retard mental (**Jurecka**, 2009). La deficiència en l'enzim adenilsuccinat liasa (ADSL) cursa amb retard mental i deficiències en el creixement (**Zhao** *et al.*, 2013).

Existeixen dos *pools* intracel·lulars de nucleòtids, el *pool* citoplasmàtic i el *pool* mitocondrial. Ambdós *pools* de nucleòtids estan interconnectats entre si. Mentre que els nucleòtids del *pool* citoplasmàtic s'utilitzen per a la síntesi del DNA nuclear, els nucleòtids del *pool* mitocondrial són emprats per a la síntesi del DNA mitocondrial (Mathews, 2006). L'aparició de mutacions en gens responsables de la replicació del DNA mitocondrial (mtDNA) i del manteniment de la seva integritat; per exemple, timidina quinasa 2 (TK2), desoxiguanosina quinasa (dGK) i DNA polimerasa γ (POLG1) originen síndromes de deleció de DNA mitocondrial (MDS) (Suomalainen i Isohanni, 1997). Curiosament, els nivells de nucleòtids de pirimidina i de purina no es corresponen recíprocament amb les proporcions de l'abundància relativa d'ambdós tant en el DNA com en l'RNA (Reichard, 1988). Això suposa que cada nucleòtid té la seva pròpia compartimentació subcel·lular, en tant que a efectes de síntesi d'àcids nucleics disposar de nivells equilibrats dels diversos nucleòtids és essencial (Mathews, 2015).

1.1. Estructura de nucleobases, nucleòsids, nucleòtids i àcids nucleics

Els nucleòsids estan formats per una nucleobase i una ribosa o desoxiribosa, units per un enllaç β -glicosídic (Kalckar, 1950). La nucleobase és una base nitrogenada que pot ser o bé una purina (adenina, guanina o hipoxantina) o bé una pirimidina (uracil, timina o citosina). El nucleòsid està format per una nucleobase i una pentosa, que pot ser una ribosa (ribonucleòsids – adenosina, guanosina, inosina, uridina, timidina, citidina) o una desoxiribosa (desoxiribonucleòsids – desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiinosina, desoxiuridina, desoxitimidina, desoxicitidina). El nucleòtid està format per un nucleòsid i d'un a tres grups fosfat units al nucleòsid per enllaç fosfodièster al grup 3'-hidroxil de la pentosa del nucleòsid i al fosfat- α per part del grup fosfat (Kalckar, 1950). En últim terme, l'àcid nucleic està format per un polímer de nucleòtids, de manera que és àcid ribonucleic o RNA si el polímer està format per ribonucleòtid i és àcid desoxiribonucleic o DNA si el polímer està format per desoxiribonucleòtids.

1.2. Síntesi de nucleòtids

Els nucleòsids poden obtenir-se de dues formes; per síntesi *de novo*, que consisteix en un conjunt de reaccions anabòliques amb una elevada despesa energètica, o bé per vies de recuperació, un procés molt més favorable energèticament que la síntesi *de novo*, en què s'aprofiten els nucleòsids i les nucleobases ja sintetitzats i presents a l'organisme i els que

s'obtenen a partir de la ingesta (**Kolassa et al.**, 1977; **Salati et al.**, 1984; **Quan i Barness**, 1990; **Ortega et al.**, 1995; **Schlimme et al.**, 2000). Les vies de recuperació, donat que la despesa energètica que comporten és molt menor, són el procediment utilitzat preferentment per les cèl·lules per obtenir els requeriments de nucleòsids per al manteniment de l'homeòstasi (**Yamaoka et al.**, 1997 i 2001) i, eventualment, com a substrat energètic en situacions excepcionals com ara estrès metabòlic o dejuni (**Hellsten-Westing et al.**, 1994; **Giannecchini et al.**, 2005). Aproximadament un 90% de les nucleobases i dels nucleòsids lliures que utilitza la cèl·lula són captats per transportadors i reciclats per les vies de recuperació (**Sanderson i He**, 1994). L'aportació i la satisfacció dels requeriments de nucleòsids és fonamental en el correcte manteniment tissular d'òrgans importants com el fetge (**Gasser et al.**, 1981; **Holstege et al.**, 1991) i l'intestí (**He et al.**, 1993). En resposta al dany tissular, per tal de satisfer els requeriments de nucleòtids necessaris per als processos de regeneració i reparació tissulars, esdevé un augment en la síntesi de nucleòtids, ja sigui *de novo* o per la via de recuperació, i la captació de nucleòsids per part de les cèl·lules es veu considerablement incrementada (**Yamaguchi et al.**, 1985; **Ohyanagi et al.**, 1989). Les restriccions en l'aportació de nucleòtids en la ingesta es veuen reflectides en l'augment del colesterol hepàtic i de la bilirrubina sèrica i la disminució de la mida del fetge (**Novak et al.**, 1994). La síntesi *de novo* utilitza aminoàcids, ribosa-5-fosfat, diòxid de carboni (CO₂) i amoni (NH₄⁺) com a precursors i requereix despesa d'energia en forma d'adenosina trifosfat (ATP) i/o guanosina trifosfat (GTP). En canvi, la síntesi *de novo* és estimulada respecte les vies de recuperació en situacions de creixement i/o proliferació cel·lular (**Yamaoka et al.**, 1997 i 2001) i en processos de transformació tumoral maligna (**Jain et al.**, 2012). En quant a la seva distribució tissular, la síntesi *de novo* té lloc bàsicament al fetge i a múscul esquelètic, i les vies de recuperació són especialment importants a medul·la òssia, en precursors hematopoiètics, en eritròcits (**Fontenelle i Henderson**, 1969) i en paràsits unicel·lulars (**King et al.**, 2006a; **Zhao et al.**, 2013). Les vies de recuperació són essencials en els tipus cel·lulars en què la síntesi *de novo* és completament absent (**Lajtha i Vane**, 1958; **Rudolph et al.**, 1984). La síntesi *de novo* consta de vies metabòliques diferents per a la síntesi de purines i de pirimidines. La síntesi *de novo* de purines es caracteritza per la formació del purinosoma (**An et al.**, 2008), que consisteix en un complex multienzimàtic o metaboló format per diversos enzims, d'ensamblatge reversible en funció del cicle cel·lular i del balanç entre purines i precursors i,

recentment, concebut com una nova possible diana terapèutica en teràpia del càncer (Pedley i Benkovic, 2017). En contraposició al purinosoma, la síntesi *de novo* de pirimidines utilitza el complex multienzimàtic trifuncional CAD (carbamoilfosfat sintetasa II, aspartat transcarbamoilasa i dihidroorotasa) (Collins i Stark, 1971; Grem *et al.*, 1988) l'ensamblatge del qual és regulat pel complex 1 de la diana de rapamicina de mamífers (mTORC1, de l'anglès *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*) (Robitaille *et al.*, 2013) i per la proteïna S6 quinasa 1 (S6K1, S6 Kinase 1) (Ben-Sahra *et al.*, 2013) mitjançant fosforilació i oligomerització (Buel *et al.*, 2016).

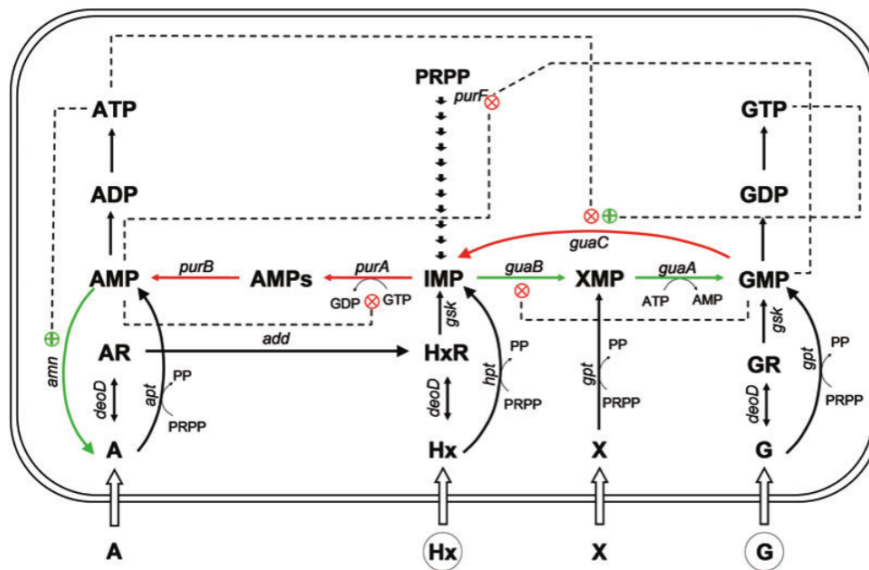


Figura 2. Síntesi de nucleòtids de purines per la via de recuperació i per síntesi de novo (Pimkin i Markham, 2008). A = adenina, Hx = hipoxantina, X = xantina, G = guanina, AR = adenosina, HxR = inosina, GR = guanosina, AMPs = adenilsuccinat, purA = adenilsuccinat sintetasa, purB = adenilsuccinat liasa, guaB = inosina monofosfat deshidrogenasa, guaA = guanosina monofosfat sintetasa, deoD = nucleòsid de purina fosforilasa, hpt = hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa, gpt = guanina fosforibosil transferasa, gsk = guanosina-inosina quinasa, apt = adenina fosforibosil transferasa, add = adenosina desaminasa, guaC = guanosina monofosfat reductasa, purF = amidofosforibosil transferasa, amn = adenosa monofosfat nucleosidasa. Les línies de color vermell representen fluxos baixos i les de color verd fluxos alts. Les línies discontinües representen mecanismes de regulació de retroalimentació negativa.

1.2.1. Vies de recuperació

Les vies de recuperació aprofiten les nucleobases i els nucleòtids procedents de la degradació de DNA i RNA del detritus cel·lular (Reichard, 1988), del metabolisme hepàtic i de la dieta i la ingesta d'aliments (Pimkin i Markham, 2008; Austin *et al.*, 2012); i a nivell compartimental es dona tant al citoplasma com al nucli cel·lular (Somasekaram *et al.*, 1999). La recuperació de nucleobases parteix de la degradació dels

nucleòtids trifosforilats, els nucleòsids trifosfat, mitjançant els enzims hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) o adenilat fosforibosiltransferasa (APRT), per obtenir els nucleòsids monofosfat corresponents – GMP i IMP en el cas d'HGPRT, i AMP en el cas d'APRT – i fosforibosil pirofosfat (PRPP). L'aparició de mutacions en HGPRT ocasiona la síndrome de Lesch-Nyhan, que cursa amb retard mental i descoordinació motora en infants (**Jurecka**, 2009). Un dels punts importants en les vies de recuperació de nucleòsids és la interconversió entre els nucleòsids i els corresponents nucleòsids monofosfat. La fosforilació dels nucleòsids a nucleòsids monofosfat és catalitzada per nucleòsid quinases (NKs) i el procés invers de desfosforilació de nucleòsids monofosfat a nucleòsids és realitzat per 5'-nucleotidases (5'-Ns) (**Rampazzo et al.**, 2010). De nucleòsid quinases n' existeixen tant de citoplasmàtiques (timidina quinasa 1 o TK1, desoxicidina quinasa o dCK (**Sabini et al.**, 2008) com de mitocondrials (timidina quinasa 2 o TK2, desoxiguanosina quinasa o dGK) (**Arner i Eriksson**, 1995). Les nucleòsid quinases catalitzen reaccions de fosforilació tant en ribonucleòsids com desoxiribonucleòsids (**Eriksson et al.**, 2002). L'adenosina quinasa (ADK) catalitza la fosforilació d'adenosina a adenosina monofosfat (AMP, adenilat monofosforilat) (**Kroll et al.**, 1993; **Kowaluck et al.**, 1998). Aquesta reacció no només és molt important a nivell de la regulació dels nivells intracel·lulars i extracel·lulars d'adenosina, sinó que també té implicacions rellevants a altres nivells com la regulació de la quinasa dependent d'AMP (AMPK) (**Zhou et al.**, 2001) i la regulació del transport equilibratiu de la mateixa adenosina pel desplaçament de l'equilibri de la reacció de translocació en retirar-ne el producte per fosforilació (**Stiles**, 1992). Aquest rol de l'ADK en relació als nivells d'adenosina i d'AMP té implicacions en analgèsia i l'activació de mecanismes antiinflamatoris (**Boyle et al.**, 2001; **Jarvis et al.**, 2002). La desoxicidina quinasa (dCK) no només és capaç de fosforilar desoxicidina, ja que també fosforila desoxiadenosina i desoxiguanosina, tot i que amb menor afinitat per aquests últims (**Eriksson et al.**, 1991; **Arner i Eriksson**, 1995). A més, la dCK també s'encarrega de la fosforilació d'alguns fàrmacs derivats de nucleòsids, com cladribina (**Sasvari-Szekely et al.**, 1998), citarabina (ara-C) (**Parker et al.**, 1999), fludarabina (**Tseng et al.**, 1982) i gemcitabina (**Spasokoukotskaja et al.**, 1998; **Sabini et al.**, 2003). L'enzim dCK es troba sobreexpressat en diversos limfomes (**Arner et al.**, 1988). Tant la desoxicidina com la citidina poden ser fosforilades per un altre enzim, la uridina-citidina quinasa (UCK) (**Greenberg et al.**, 1977; **Van Rompay et al.**, 2001; **Suzuki et al.**, 2004). La desoxiguanosina quinasa fosforila

desoxiguanosina, desoxiadenosina i desoxiinosina (Wang *et al.*, 1993), i els anàlegs de nucleòsids nelarabina (ara-G), cladribina, gemcitabina i fludarabina (Sjoberg *et al.*, 1998). En quant a timidina quinases, la timidina quinasa 1 (TK1) citosòlica té com a substrats timidina i uridina (Sherley i Kelly, 1988), i la timidina quinasa 2 (TK2) mitocondrial té una àmplia especificitat de substrat i és capaç de fosforilar anàlegs com gemcitabina (Wang *et al.*, 1999). La 5'-nucleotidasa que s'encarrega de la desfosforilació dels nucleòtids extracel·lulars a nucleòsids per possibilitar-ne la seva recaptació a través dels transportadors de nucleòsids és l'ecto-5'-nucleotidasa o CD73 i es localitza a la membrana plasmàtica (Resta *et al.*, 1998). Pel que fa a 5'-nucleotidases citosòliques (Spychala *et al.*, 1989), existeixen les següents: cN-I, que catalitza la desfosforilació de desoxitimidina monofosfat (dTMP) i desoxicitidina monofosfat (dCMP); cN-II, que s'encarrega de la desfosforilació de desoxiinosina monofosfat (dIMP) i de la regulació dels nivells d'ATP i GTP; i cN-III, que participa en la degradació de l'RNA mitjançant la conversió d'uridina monofosfat (UMP) i citidina monofosfat (CMP) a desoxitimidina monofosfat (dTMP) i desoxicitidina monofosfat (dCMP), respectivament (Bianchi i Sychala, 2003). Per tant, les nucleotidases poden trobar-se tant al medi extracel·lular com a la cara extracel·lular de la membrana plasmàtica i cadascuna d'elles té una especificitat de substrat pròpia (Hunsucker *et al.*, 2001; Yegutkin *et al.*, 2008). La nucleòsid monofosfat quinasa (NMPK) catalitza la formació de nucleòsids difosfat (NDPs) a partir dels respectius nucleòsids monofosfat (NMPs) per fosforilació a nivell del fosfat α del nucleòtid monofosforilat. Les nucleòsid monofosfat quinases són la UMP/CMP quinasa 1 (UMP/CMPK1), la guanilat quinasa (GK) i l'adenilat quinasa (AK) (Van Rompay *et al.*, 1999). La nucleòsid monofosfat quinasa mitocondrial és la UMP/CMP quinasa 2 (UMP/CMPK2) (Xu *et al.*, 2008). L'activitat enzimàtica que realitza el darrer pas de fosforilació del fosfat β del nucleòsid difosfat per obtenir el nucleòtid trifosforilat (α , β i γ) final és la nucleòsid difosfat quinasa 1 (NDPK1) (Agarwal *et al.*, 1978; Van Rompay *et al.*, 2000). D'altra banda, existeix una desoxinucleòsid trifosfat trifosfohidrolasa anomenada SAMHD1 (*Sterile α -Motif and Histidine-aspartate Domain-containing 1*) que és capaç d'hidrolitzar els nucleòsids trifosfat per proporcionar nucleòsids per una banda, i trifosfat inorgànic (PPP_i , $\text{P}_3\text{O}_{10}^{4-}$) per l'altra (Goldstone *et al.*, 2011). Existeixen altres enzims del metabolisme de nucleòtids que són importants en les vies de recuperació; com ara la citidina desaminasa (CDA) que catalitza la desaminació de citidina i desoxicitidina a uridina i desoxiuridina respectivament (Navaratnam i Sarwar, 2006; Serdjebi *et al.*, 2015), l'adenosina desaminasa (ADA) que desamina adenosina i desoxiadenosina a inosina i desoxiinosina (Cristalli *et al.*, 2001), i la

desoxicitidina monofosfat desaminasa (DCTD) que porta a terme la desaminació de desoxicitidina monofosfat a desoxiuridina monofosfat. Pel que fa a enzims de desfosforilació, destaquen la fosforilació de nucleòtids purínics (PNP), la timidina fosforilasa (TP) i la uridina fosforilasa (UP) (Pugmire i Ealick, 2002).

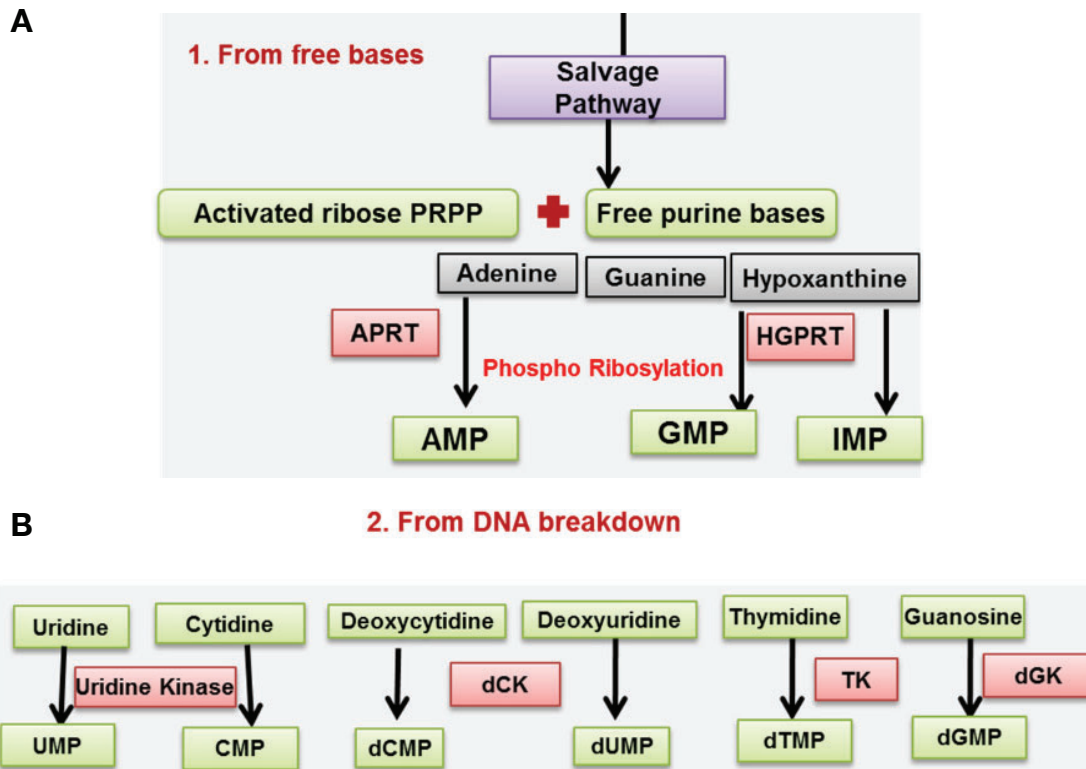


Figura 3. Síntesi de nucleòtids per les vies de recuperació (Schmidt et al., 2017). Vies de recuperació de nucleòtids monofosforilats, o el que és el mateix nucleòtids monofosfat, a partir de (A) nucleobases lliures i de (B) degradació del DNA.

1.2.2. Síntesi *de novo*

La síntesi *de novo* de nucleòtids és diferent en funció de la naturalesa estructural de la nucleobase, és a dir, en funció de si es tracta d'una pirimidina o d'una purina. En el cas dels nucleòtids de purina, la síntesi de la nucleobase i la síntesi de la ribosa estan integrades, proporcionant inosina monofosfat (IMP) a partir de fosforibosil pirofosfat (PRPP) com a substrat de partida (Villa et al., 2019). En canvi, la síntesi *de novo* de nucleòtids de pirimidina es caracteritza per tenir lloc en dues etapes, la primera, la síntesi de la nucleobase pirimidínica, i la segona, la incorporació de la ribosa a la nucleobase, donant com a producte uridina monofosfat (UMP) (Villa et al., 2019). La síntesi *de novo* de nucleòtids es veu molt augmentada en cèl·lules en fase de divisió cel·lular (Yamaoka et al., 1997 i 2001).

La síntesi de nucleòtids de pirimidina segueix la seqüència d'activitats enzimàtiques formada, en aquest ordre, per carbamoïlfosfat sintetasa II (CPSII) (Simmer *et al.*, 1990), aspartat carbamoïltransferasa (ATC) (Grayson i Evans, 1983), dihidroorotasa (DHOsa) (Chen *et al.*, 1989), dihidroorotat deshidrogenasa (DHOdH) (Hines *et al.*, 1986), uridina monofosfat sintetasa (UMPS) que consta de les activitats orotat fosforibosil transferasa (Suttle *et al.*, 1988) i ornitina monofosfat descarboxilasa (Floyd i Jones, 1985), per proporcionar UMP com a producte final (Buj i Aird, 2018). Les tres primeres activitats enzimàtiques esmentades s'organitzen en un complex multienzimàtic anomenat CAD que proporciona àcid dihidrooròtic a partir de glutamina (Evans i Guy, 2004). L'àcid dihidrooròtic és oxidat a àcid oròtic per la dihidroorotat deshidrogenasa, i aquest és convertit a UMP per les dues darreres activitats llistades (Evans i Guy, 2004). A partir d'UMP s'obtenen els altres nucleòtids pirimidínics; citidina trifosfat (CTP) mitjançant l'enzim citidina trifosfat sintasa (CTP sintasa), i desoxuridina monofosfat (dUMP) a través de la ribonucleòtid reductasa (RNR), que al seu torn dona lloc a desoxitimidina monofosfat (dTMP) per l'enzim timidilat sintasa (TS) (Nyiri *et al.*, 2018).

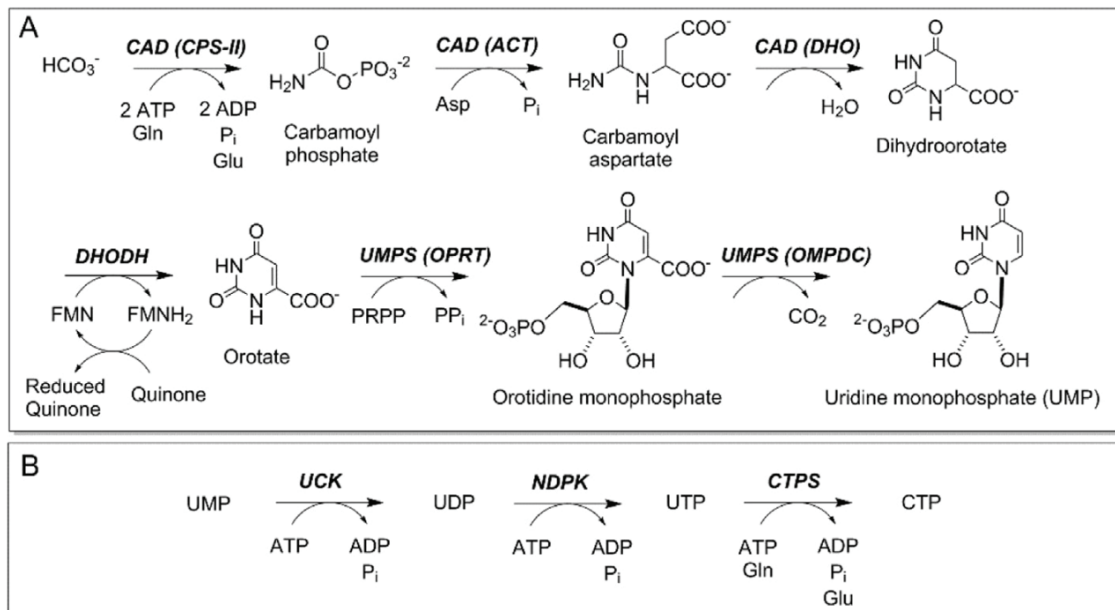


Figura 4. Síntesi de novo de nucleòtids de pirimidines (Chitrakar *et al.*, 2017). Síntesi de novo de nucleòtids de pirimidines; uridina mono-, di- i trifosfat i citidina trifosfat. **(A)** Síntesi d'uridina monofosfat a partir d'anió hidrogenocarbonat, glutamina i adenosina trifosfat. **(B)** Síntesi d'uridina di- i trifosfat i de citidina trifosfat a partir d'uridina monofosfat.

La síntesi de purines esdevé al citoplasma cel·lular en la seva totalitat i pot fraccionar-se conceptualment en dues grans etapes: una en què s'obté inosina monofosfat (IMP) a partir de fosforibosil pirofosfat (PRPP), i la segona en què a partir d'aquest primer nucleòsid purínic monofosfat se n'obtenen els

altres dos restants, guanosina monofosfat (GMP) i adenosina monofosfat (AMP) (**Jain et al., 2012; French et al., 2013; Pedley i Benkovic, 2017**). L'obtenció d'IMP a partir de fosforibosil pirofosfat es porta a terme mitjançant les següents activitats enzimàtiques, en aquest ordre de seqüència: fosforibosil pirofosfat amidotransferasa (PPAT), fosforibosilglicinamida formiltransferases 1 i 2 (GART1 i GART2), fosforibosilformilglicinamida sintetasa (PFAS), fosforibosilglicinamida formiltransferasa 3 (GART3), fosforibosilaminoimidazol carboxilasa (CAIRS) i fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintasa (SAICARS) – aquests dos organitzats en forma de complex enzimàtic bifuncional anomenat PAICS –, adenilsuccinat liasa (ADSL), i un altre complex enzimàtic bifuncional (ATIC) format pels enzims 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid formiltransferasa (AICAR) i inosina monofosfat ciclohidrolasa (IMPCH) (**Pedley i Benkovic, 2017**). Un cop es disposa d'IMP, s'obtenen els altres dos nucleòsids monofosfat de purina: guanosina monofosfat (GMP) mitjançant dues reaccions catalitzades per inosina monofosfat deshidrogenasa (IMPdH) i guanosina monofosfat sintetasa (GMPS), i adenosina monofosfat (AMP) a través de les reaccions enzimàtiques realitzades per adenilsuccinat sintetasa (ADSS) i adenilsuccinat liasa (ADSL) (**French et al., 2013; Pedley i Benkovic, 2017**).

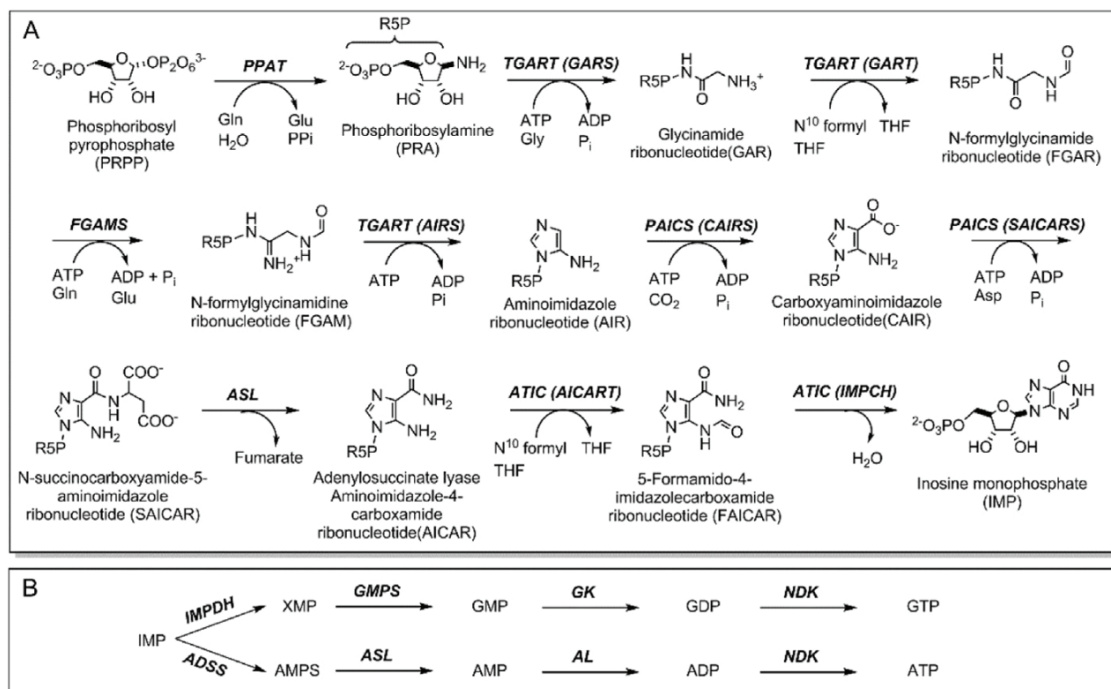


Figura 5. Síntesi de novo de nucleòsids de purines (Chitrakar et al., 2017). Síntesi de novo de nucleòsids de purines; guanosina mono-, di- i trifosfat i adenosina mono-, di- i trifosfat. **(A)** Síntesi d'inosina monofosfat a partir de fosforibosil pirofosfat i glutamina **(B)** Síntesi de guanosina mono-, di- i trifosfat i d'adenosina mono-, di- i trifosfat a partir d'inosina monofosfat.

1.2.3. Síntesi de desoxiribonucleòtids

Els desoxiribonucleòtids es poden obtenir a partir dels ribonucleòtids corresponents mitjançant l'acció de l'enzim ribonucleòtid reductasa (RNR), el substrat de la qual són els ribonucleòsids difosfat. La ribonucleòtid reductasa no discrimina entre nucleòtids de pirimidines i de purines (**Nordlund i Reichard, 2006**). La ribonucleòtid reductasa s'estructura mitjançant l'ensamblatge d'un tetràmer format per dues subunitats catalítiques R1 (85 kDa) i dues subunitats reguladores R2 (45 kDa) (**Brown i Reichard, 1969a i 1969b**) que són substituïbles per subunitats p53R2, aquestes darreres regulades per la proteïna p53 (**Tanaka et al., 2000; Xue et al., 2003**) i que la fa susceptible de regulació al·lostèrica (**Chimploy i Mathews, 2001; Kashlan i Cooperman, 2003; Fairman et al., 2011**). La subunitat p53R2, a diferència de la subunitat R2, és induïble per dany a DNA i és responsable d'activar la síntesi de desoxiribonucleòtids a nivell de RNR per satisfer els requeriments dels mecanismes de reparació de DNA (**Guittet et al., 2001**). La regulació negativa o l'aparició de mutacions en p53R2 implica una disminució dels mecanismes de reparació de DNA i un increment en la taxa de mutacions en el DNA (**Kimura et al., 2003**). La ribonucleòtid reductasa és inhibida pels anàlegs de nucleòsids cladribina (**Parker et al., 1991**), gemcitabina (**Lawrence et al., 1997**) i fludarabina (**Gandhi et al., 1995**). Els nucleòsids naturals que són substrat de la ribonucleòtid reductasa són ADP, GDP, CDP i UDP; no essent-ho TDP – l'únic ribonucleòsid difosfat natural que no és reconegut per RNR – que s'obté a partir del desoxiribonucleòtid respectiu d'uridina a partir de l'activitat enzimàtica timidilat sintasa (**Reichard, 1988**).

1.2.4. Síntesi de nucleòtids en cèl·lules tumorals

Les cèl·lules tumorals es caracteritzen per una elevada taxa de replicació que comporta un increment en els requeriments de nucleòsids i nucleòtids (**Hanahan i Weinberg, 2011**), a més d'una desregulació del metabolisme energètic que es veu reflectit en un augment sobtat de la glicòlisi aeròbica (**Cantor i Sabatini, 2012**), un fenomen de reprogramació metabòlica denominat "efecte Warburg" (**Vander Heiden et al., 2009**). La reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals cursa amb un augment de la fosforilació oxidativa i la conseqüent desregulació del DNA mitocondrial (mtDNA) i un increment en l'activitat de l'enzim dihidroorotat deshidrogenasa (DHODH) (**Loffler et al., 2015**). L'elevada taxa de proliferació cel·lular de les cèl·lules tumorals implica un augment en la utilització de fosforibosil pirofosfat i l'activació de la via de les pentoses fosfat (**Sgarella et al.,**

1997; Lane i Fan, 2015). Quan els nivells de nucleòtids disponibles no són suficients i no satisfan els elevats requeriments de les cèl·lules tumorals, la inestabilitat genòmica esdevé encara major, essent aquest un efecte d'especial rellevància a les primeres etapes de tumorigènesi (Bester *et al.*, 2011). Alguns enzims de la via de recuperació es troben sobreexpressats en cèl·lules tumors, com la uridina-citidina quinasa (UCK) (Herzfeld i Raper, 1979; Shen *et al.*, 1998). L'enzim fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa (ADE2 o PAICS) presenta un increment d'activitat en cèl·lules tumorals de pulmó i de pròstata (Chakravarthi *et al.*, 2017). Per això, els enzims de la síntesi *de novo* de nucleòtids, subjectes a un elevat grau de regulació transcripcional, representen bons biomarcadors de progressió del càncer (Barfeld *et al.*, 2015), així com bones dianes terapèutiques potencials (Lin *et al.*, 2015). Els efectes diferencials de la síntesi de nucleòtids en càncer estan mitjançats per reguladors mestres com *myc* (Eberhardy i Farnham, 2001; Mannava *et al.*, 2008; Cunningham *et al.*, 2014; Pavlova i Thompson, 2016), p53 (Kollareddy *et al.*, 2015), MAPK (Graves *et al.*, 2000) i mTORC1 (Duran *et al.*, 2012; Jewell *et al.*, 2015).

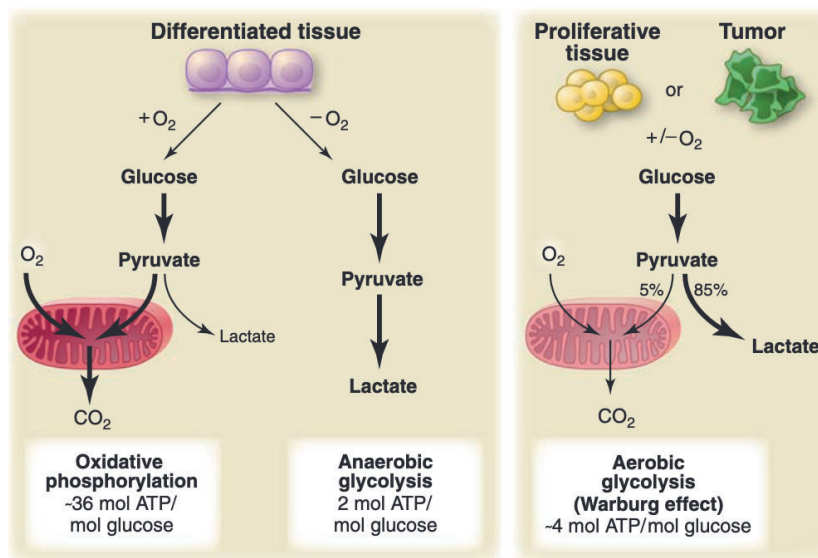


Figura 6. Efecte Warburg (Vander Heiden *et al.*, 2009). Representació esquemàtica de les diferències principals entre la fosforilació oxidativa, la glicòlisi anaeròbica i la glicòlisi aeròbica (efecte Warburg). Les cèl·lules tumorals, amb independència de la concentració d'oxigen, tendeixen a cremar la glucosa a lactat, portant a terme una glicòlisi aeròbica, igual que les cèl·lules normals proliferatives, però no anaeròbica o cremant la glucosa a piruvat acoblat a fosforilació oxidativa com succeeix en cèl·lules normals no proliferatives.

1.3. *Metabolisme de nucleòtids*

L'avançament i les diverses fases del cicle cel·lular regulen directament els nivells cel·lulars de nucleòtids disponibles en funció de les necessitats de la cèl·lula a cada moment, de forma que en situacions en què els requeriments de nucleòtids són elevats processos com la captació de nucleòsids procedents del medi extracel·lular són promoguts mitjançant l'activació de mecanismes de transport com hCNT1 (**Valdes et al.**, 2002) i hENT1 (**Baldwin et al.**, 2004); i en canvi, en situacions en què no hi ha alts requeriments de nucleòtids, per exemple després de la fase S del cicle cel·lular, l'excedent de nucleòtids és metabolitzat i degradat per enzims com la SAMHD1 (**Franzolin et al.**, 2013). Els enzims que regulen el metabolisme de nucleòtids es caracteritzen per ser susceptibles de mecanismes de regulació al·lostèrica, com és el cas de la ribonucleòtid reductasa (**Hofer et al.**, 2012) i de la SAMHD1 (**Ji et al.**, 2014). Resulta curiós com un regulador mestre tan important i que ocupa un rol tan central en la regulació del metabolisme en general com és mTORC1 exerceix una regulació fina sobre els nivells de nucleòsids de purines disponibles (**Emmanuel et al.**, 2017; **Hoxhaj et al.**, 2017), però no així sobre els nivells dels nucleòsids de pirimidines (**Emmanuel et al.**, 2017; **Valvezan et al.**, 2017). La proteïna del retinoblastoma (pRb) regula els nivells de desoxinucleòsids trifosfat (dNTPs) a través de la quinasa dependent de ciclines 2 (CDK2) i, a més, regula negativament els enzims timidilat sintasa (TS), ribonucleòtid reductasa (RNR) i dihidrofolat reductasa (DHFR) (**Angus et al.**, 2002). Per això, és rellevant el fet que la regulació del metabolisme de nucleòtids no només esdevé a nivell dels nucleòtids en si mateixos (**Ben-Sahra et al.**, 2016), sinó que també té lloc a nivell dels seus precursors (**Zhu i Thompson**, 2019). En quant a la degradació, igual que la síntesi *de novo*, és específica segons la naturalesa química de la nucleobase, essent diferent per als nucleòsids de purina i per als de pirimidina (**Bzowska et al.**, 2000). Els nucleòsids de purina són degradats a àcid úric mitjançant reaccions d'oxidació (**Maiuolo et al.**, 2016). En el cas dels nucleòsids de pirimidina, el producte final depèn de la nucleobase, donant β -alanina en el cas d'uracil i β -aminoisobutirat en el cas de timina (**Wasternack**, 1980).

2. Transportadors de nucleòsids

Els nucleòsids són molècules hidròfiles, de manera que la seva difusió a través de la membrana plasmàtica esdevé dificultada i, per tant, depèn de transportadors de membrana específics (Damaraju *et al.*, 2003; Baldwin *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2004b; Lang *et al.*, 2004; Molina-Arcas *et al.*; 2009).

Existeixen dues grans superfamílies de transportadors de membrana, els *Solute Carriers* (SLC) (He *et al.*, 2009) i els *ATP Binding Cassettes* (ABC) (Schlessinger *et al.*, 2010). Els transportadors de nucleòsids pertanyen a la superfamília SLC, que comprèn un total de 52 famílies amb més de 400 transportadors (Nyquist *et al.*, 2017).

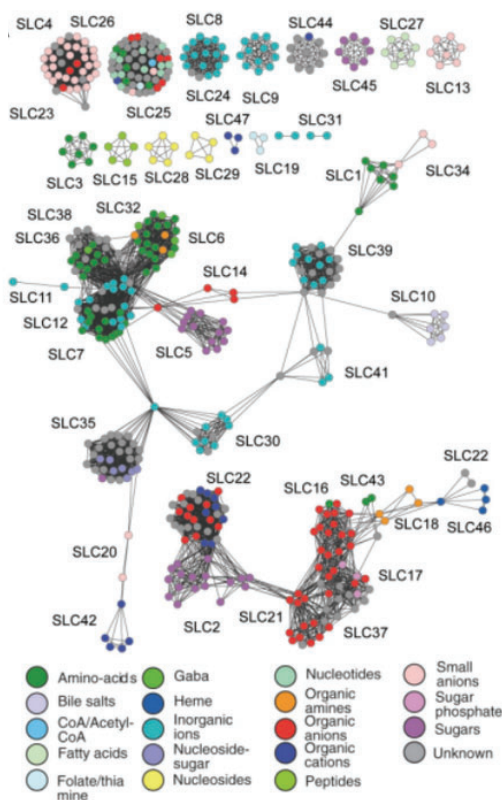


Figura 7. Superfamília de transportadors SoLute Carrier o SLC (Schlessinger *et al.*, 2010). Representació esquemàtica dels transportadors pertanyents a la superfamília *SoLute Carriers* (SLC) agrupats en base a la naturalesa estructural i química dels seus substrats i a la qual hi pertanyen els transportadors objectes d'aquest treball; els transportadors concentratius de nucleòsids (hCNTs) codificats per la família gènica *SLC28*, els transportadors equilibratius de nucleòsids (hENTs) codificats per la família gènica *SLC29* i els transportadors de cations orgànics (hOCTs) codificats per la família gènica *SLC22*.

Els transportadors de nucleòsids són essencials per als tipus cel·lulars als què els manca biosíntesi o síntesi *de novo* de nucleòsids, com és el cas dels eritròcits, leucòcits, precursors hematopoètics i alguns tipus cel·lulars del sistema nerviós central. D'aquesta forma, aquestes cèl·lules poden obtenir nucleòsids a partir de la dieta o de vies de recuperació mitjançant la seva captació a nivell del flux sanguini gràcies als transportadors de nucleòsids (Kwong *et al.*, 1987). A més, a la resta de tipus cel·lulars que tenen capacitat de biosíntesi de nucleòsids, l'elevada despesa energètica que suposa la síntesi *de novo* afavoreix les vies de recuperació a nivell de transportadors de nucleòsids. Per tant, les vies de recuperació de nucleòsids són rellevants per a la satisfacció dels requeriments fisiològics, sobretot en situacions de dejú o d'estrès metabòlic, en què els nucleòsids poden arribar a ser emprats fins i tot com a substrat energètic (Hellsten-Westing *et al.*, 1994; Giannichinni *et al.*, 2005).

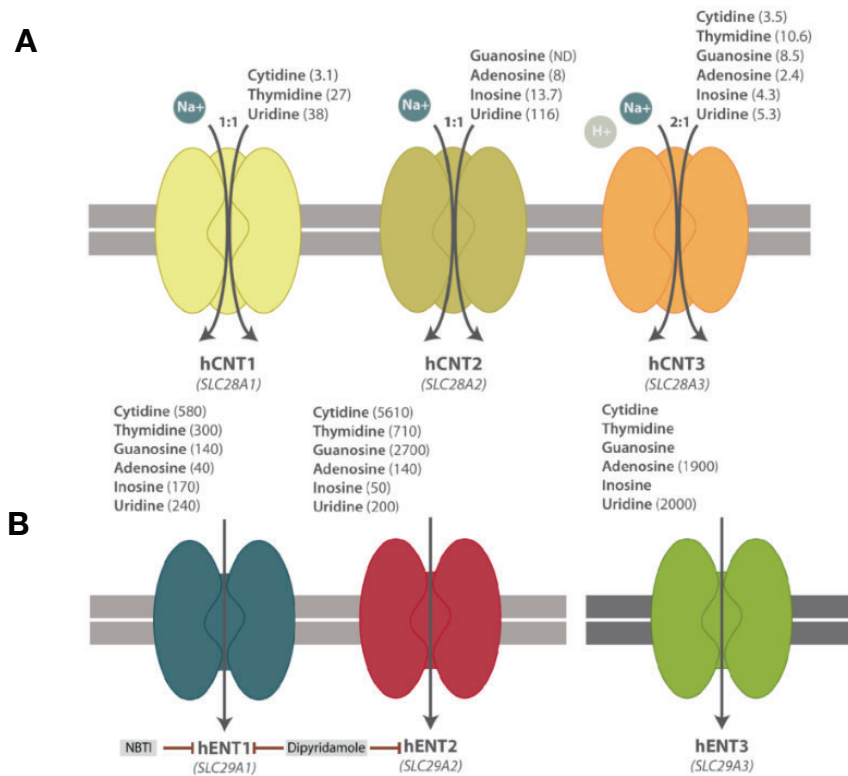


Figura 8. Transportadors de nucleòsids (Pastor-Anglada i Perez-Torras, 2018b).

Representació esquemàtica dels transportadors de nucleòsids, tant els (A) concentratius (hCNTs) codificats per la família gènica *SLC28* com els (B) equilibratius (hENTs) codificats per la família gènica *SLC29*. S'hi mostren els cosubstrats (catió sodi en els casos d'hCNT1, hCNT2 i hCNT3 i, eventualment, protons per a hCNT3), les estequiometries respectives de les reaccions de translocació, els substrats respectius amb les corresponents constants cinètiques d'interacció per a cada transportador, el gen corresponent i els inhibidors coneguts per cada cas concret.

Existeixen dues famílies gèniques de transportadors de nucleòsids; la família gènica *SLC28* que codifica per a transportadors concentratius de nucleòsids o CNT (de l'anglès, *Concentrative Nucleoside Transporters*), que són transportadors que es caracteritzen per una elevada afinitat i una alta selectivitat de substrat, i la família gènica *SLC29* que codifica per a transportadors equilibratius de nucleòsids o ENT (de l'anglès, *Equilibrative Nucleoside Transporters*), que a diferència dels anteriors posseeixen afinitat i selectivitat de substrat baixes (**Griffith i Jarvis, 1996a; Baldwin et al., 1999; Cass et al., 1999; Molina-Arcas et al., 2009**). Els transportadors de nucleòsids es troben principalment en epitelis absortius i es caracteritzen per tenir una determinada especificitat de substrat (**Molina-Arcas et al., 2009**). És habitual trobar expressió de transportadors de nucleòsids, tant equilibratius com concentratius, en cèl·lules polaritzades (**Hamilton et al., 2001; Baldwin et al., 2004**). Mentre que per una banda els transportadors concentratius de nucleòsids solen trobar-se preferentment a les membranes apicals (**Mangravite et al., 2001 i 2003a**), per l'altra els transportadors equilibratius es troben més aviat en membranes basolaterals (**Mangravite et al., 2003a i 2003b**); de manera que aquesta distribució asimètrica afavoreix el flux vectorial transepitelial de nucleòsids (**Patil i Unadkat, 1997; Scharrer i Grenacher, 2001; Errasti-Murugarren et al., 2007; Rius et al., 2010**). De fet, hCNT1 es troba exclusivament a la membrana apical de cèl·lules epitelials absortives; essent, per tant, completament absent a la membrana basolateral (**Hamilton et al., 2001**), excepte en cèl·lules de sincitiotrofoblast de placenta on, en tant que hCNT1 és l'únic transportador de nucleòsids present, aquest es troba tant a la membrana basal com a la membrana basolateral d'aquestes cèl·lules (**Errasti-Murugarren et al., 2011**). El fet que no existeixi síntesi *de novo* de nucleòsids pirimidínics però sí de nucleòsids purínics a la placenta podria explicar aquesta anormalitat. Mentre que els transportadors hCNT1 i hCNT3 són més presents al ronyó participant en la reabsorció de nucleòsids a partir del filtrat glomerular (**Errasti-Murugarren et al., 2007**), hCNT2 ho és a l'intestí per permetre l'absorció de nucleòsids procedents de la ingesta (**Shin et al., 2003**). Al ronyó, per una banda, la combinació de hCNT1, hCNT2 i hCNT3 proporcionen una elevada capacitat de reabsorció de nucleòsids al glomèrul, i per l'altra, hCNT2 i hCNT3 regulen la funció renal mitjançant la modulació dels nivells d'adenosina al túbul col·lector (**Rodriguez-Mulero et al., 2005; Govindarajan et al., 2007**). De forma singular, en el cas de les cèl·lules epitelials del túbul contornejat proximal, hENT1 es localitza a la membrana apical (**Damaraju et al.,**

2007). Al fetge, la distribució de transportadors és diferent, de manera que hCNT1 es troba al domini apical on a l'alçada del canalicle biliar capta els nucleòsids procedents de la degradació per l'acció d'ectonucleotidases, i hCNT2 es troba a la membrana basolateral on capta els nucleòsids procedents de la sang hepàtica i portal a través del sinusoides hepàtic (Duflo *et al.*, 2002; Govindarajan *et al.*, 2008). Tot això confereix al sistema d'absorció i reabsorció de nucleòsids una gran eficiència (Van Aube1 *et al.*, 2000; Pastor-Anglada *et al.*, 2007). Aquesta gran diversitat en quant a selectivitat de substrat, cinètica de translocació, regulació i localització subcel·lular podria ser una explicació plausible de l'ampli espectre existent de transportadors de nucleòsids (Zhang *et al.*, 2007; Pastor-Anglada *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008). A escala tissular, la distribució dels transportadors equilibratius de nucleòsids és força més estesa que la dels transportadors concentratius (Pastor-Anglada i Perez-Torras, 2015). Els transportadors de nucleòsids ocupen un rol central en l'homeòstasi de nucleòsids naturals i són essencials en la farmacocinètica i la farmacodinàmia dels fàrmacs derivats i anàlegs de nucleòsids (Pastor-Anglada *et al.*, 2005; King *et al.*, 2006a i 2006b). A més, els transportadors de nucleòsids no només poden ser considerats i utilitzats com a dianes farmacològiques, sinó que també ho poden ser des d'una aproximació farmacogenòmica (Yan, 2005; Grañe-Boladeras *et al.*, 2016a).

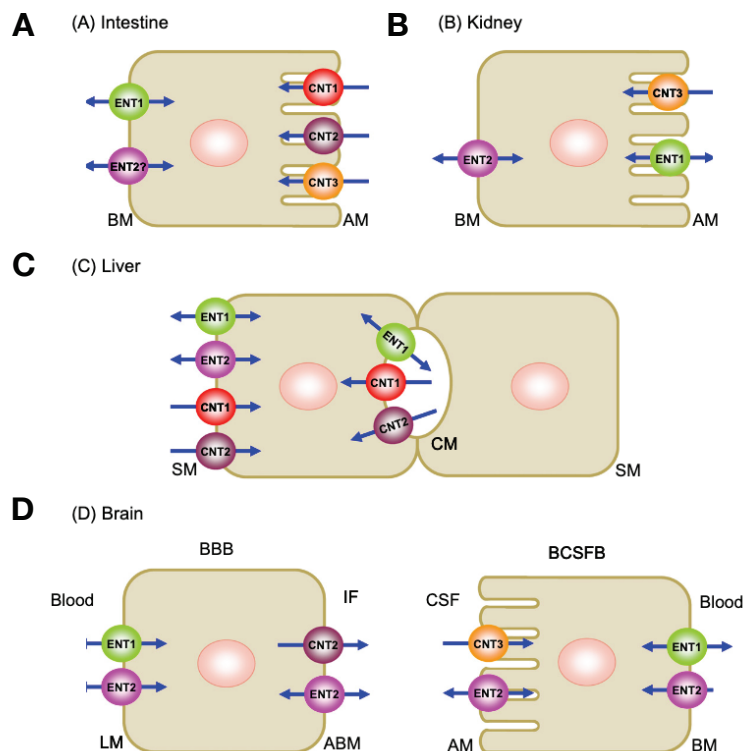


Figura 9. Distribució asimètrica dels transportadors de nucleòsids (Young *et al.*, 2013). Representació esquemàtica de la distribució selectiva i asimètrica dels diversos transportadors de nucleòsids a la membrana plasmàtica (A) d'enteròcits, (B) de cèl·lules renals, (C) d'hepatòcits i (D) de cèl·lules de sistema nerviós central. **AM** = membrana apical, **BM** = membrana basolateral, **CM** = membrana canalicular, **SM** = membrana sinusoidal, **BBB** = barrera hematoencefàlica, **BCSFB** = fluïd hematocerebroespinal del plexe coroideu, **ABM** = membrana abluminal de la barrera hematoencefàlica, **IF** = fluïd intersticial, **CSF** = fluïd cerebroespinal, **LM** = membrana luminal de la barrera hematoencefàlica.

2.1. Transportadors equilibratius de nucleòsids

Els transportadors equilibratius de nucleòsids o hENTs codificats per la família gènica *SLC29* són transportadors passius i independents de sodi que catalitzen el pas bidireccional de substrat a través de la membrana plasmàtica a favor de gradient de concentració (Cabrita *et al.*, 2002; Baldwin *et al.*, 2004). S'encarreguen tant del transport de nucleòsids de purines com de pirimidines (Baldwin *et al.*, 2004; Pastor-Anglada i Perez-Torras, 2015). Aquest grup de transportadors està compost de quatre membres: hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4, codificats respectivament pels gens *SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* i *SLC29A4*, (Kong *et al.*, 2004). Els transportadors equilibratius ocupen un rol central en la captació de nucleòsids procedents de la ingesta i de la síntesi *de novo* hepàtica. Aquest paper és especialment rellevant als eritròcits, en què els nucleòsids captats del medi extracel·lular representen tots els nucleòsids de què poden disposar (Bartlett i Bucolo, 1968). A diferència dels transportadors concentratius de nucleòsids, no s'han trobat ortòlegs bacterians dels transportadors equilibratius (Dos Santos-Rodrigues *et al.*, 2014). Tot i això, són presents en pràcticament la totalitat de les espècies eucariotes (Acimovic i Coe, 2002). Es troben en un gran nombre de tipus cel·lulars, tant de fenotip normal fisiològic com fisiopatològic o tumoral (Belt *et al.*, 1993). La seva distribució tissular és ubiqua i els nivells en què s'expressen presenten una alta variabilitat en funció del teixit (Griffith i Jarvis, 1996a). Els transportadors equilibratius presenten constants d'afinitat (K_M) pel substrat elevades en el rang micromolar alt, entre 100 i 800 μM , de forma que es caracteritzen per afinitats baixes pels seus substrats (Yao *et al.*, 2011). Tots els transportadors equilibratius de nucleòsids són sensibles a nitrobenziltioinosina o NBTI, un anàleg estructural d'adenosina (Griffiths *et al.*, 1997; Crawford *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2004). A més, hENT1 també presenta sensibilitat a la inhibició per alguns vasodilatadors coronaris, com ara dilazep, dipiridamol i draflazina (Hyde *et al.*, 2001; Musa *et al.*, 2002; Visser *et al.*, 2002), que d'altra banda no inhibeixen hENT2 (Aguayo *et al.*,

2005). Existeix un transportador específic per a la recaptació de nucleobases puríniques codificat pel gen *SLC43A3* anomenat ENTB1 (Furukawa *et al.*, 2015).

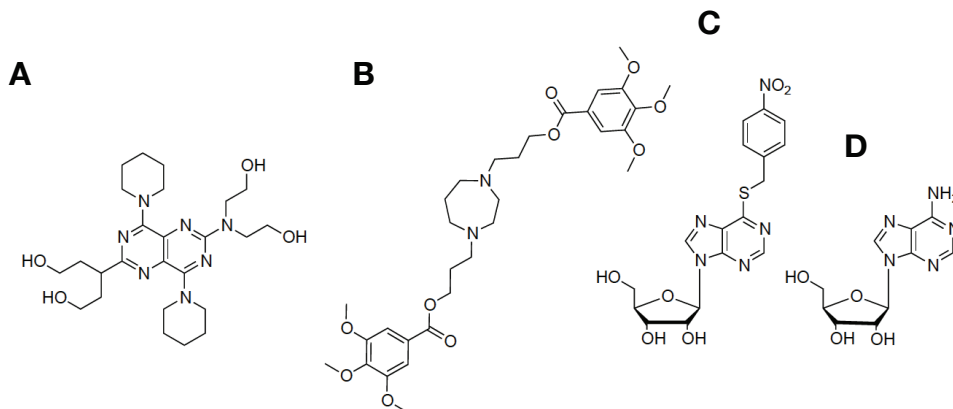


Figura 10. Inhibidors dels transportadors equilibratius de nucleòsids. Estructura dels inhibidors dels transportadors equilibratius de nucleòsids; (A) dipiridamol, (B) dilazep, (C) nitrobenziltioinosina (NBTI); en comparació al substrat (D) inosina.

2.1.1. hENT1 (*SLC29A1*)

L'estudi de les característiques moleculars dels sistemes equilibratius de transport es va iniciar abans de la seva clonació. A l'inici, es va identificar un únic sistema de transport de nucleòsids en eritròcits humans, el sistema es (equilibratiu sensible a NBTI) (Jarvis *et al.*, 1980; Shi *et al.*, 1984; Wu i Young, 1984; Tse *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1994). Es va aïllar i es va dur a terme l'extracció parcial d'aquesta proteïna transportadors utilitzant NBTI com a lligand específic (Jarvis i Young, 1981), a partir de la qual se'n va obtenir la seqüència d'aminoàcids. Posteriorment, es va aïllar un cDNA de placenta codificant per una proteïna glicosilada de 456 aminoàcids i d'aproximadament 50 kDa de massa molecular que es va denominar hENT1 (de l'anglès, *human Equilibrative Nucleoside Transporter 1*) (Yao *et al.*, 1997). Es va identificar l'ortòleg de rata mitjançant homologia de seqüència i expressió funcional de cDNA en oòcits de *Xenopus laevis*, una proteïna de 457 aminoàcids i amb un grau d'homologia del 78% respecte hENT1 (Yao *et al.*, 1997). La localització genòmica del gen corresponent a la proteïna hENT1, *SLC29A1*, es localitza al cromosoma 6, particularment a la posició 6p21.1 (Coe *et al.*, 1997). Existeixen tres variants polimòrfiques per a hENT1, cap d'elles amb implicacions rellevants a nivell funcional: hENT1^{Ile216Thr}, hENT1^{Glu391Lys} i una tercera variant obtinguda a partir de *splicing* alternatiu mancada dels tres darrers dominis transmembrana (Osato *et al.*, 2003; Robillard *et al.*, 2008). A més, existeixen dos polimorfismes al promotor del gen,

SLC29A1^{1050G>A} i *SLC29A1*^{1345C>G}, més actius transcripcionalment (**Myers et al.**, 2006) i que, tot i no tenir incidència en la translocació de substrat (**Osato et al.**, 2003; **Kim et al.**, 2006), poden afectar la resposta a gemcitabina (**Kim et al.**, 2016). Hi ha variants polimòrfiques en *SLC29A1*. Un gran nombre de tipus cel·lulars neoplàsics humans expressen fonamentalment hENT1 (**Belt et al.**, 1993; **Mackey et al.**, 1998; **Hammond et al.**, 1999; **Baldwin et al.**, 2004; **Lane et al.**, 2010). Tot i que en un inici es va descriure que hENT1 presentava capacitat de translocació de nucleòsids però no de nucleobases (**Ward et al.**, 2000), posteriorment es va trobar que hENT1 també és capaç de transportar algunes nucleobases (**Yao et al.**, 2011). L'expressió i la distribució tissulars d'hENT1 són ubiques en mamífers, tot i que els seus nivells són especialment elevats a placenta, cervell, cor, fetge (**Duflot et al.**, 2002), pulmó, còlon i en eritròcits (**Jennings et al.**, 2001; **Pennycooke et al.**, 2001; **Abdulla i Coe**, 2007). El transportador hENT1 té molta rellevància en base a l'efecte cardioprotector que té la seva inhibició a nivell de l'augment de la concentració extracel·lular d'adenosina (**Dunwiddie i Diao**, 2000; **Rose et al.**, 2010; **Ramadan et al.**, 2014). A cordó umbilical, nivells baixos d'expressió d'hENT1 incideixen en l'intercanvi de nucleòsids de forma que esdevé un increment en la concentració extracel·lular d'adenosina que pot guardar relació amb el fenotip de diabetis gestacional (**Vasquez et al.**, 2004). hENT1 està relacionat amb increments en la proliferació de macròfags (**Soler et al.**, 2001a i 2001b). En cèl·lules tumorals existeixen nivells elevats d'hENT1 en càncer d'estómac i càncer de pulmó (**Pennycooke et al.**, 2001) i baixa expressió d'hENT1 en càncer de mama (**Lane et al.**, 2010) i de pàncrees (**Mohelnikova-Duchonova et al.**, 2013). Pel que fa a la seva localització subcel·lular, hENT1 es troba a la membrana plasmàtica, però també pot trobar-se a la membrana mitocondrial (**Lai et al.**, 2004; **Lee et al.**, 2006) i al reticle endoplasmàtic (**Mani et al.**, 1998).

2.1.2. hENT2 (SLC29A2)

Mentre que el transportador hENT1 es va descriure inicialment com el sistema de transport **es**, el transportador hENT2, fins a la seva clonació (**Griffiths et al.**, 1997; **Crawford et al.**, 1998) es va conèixer amb el nom de sistema de transport **ei** (**equilibratiu insensible a NBTI**). El transportador equilibratiu hENT2 no només transloca nucleòsids tant de purines com de pirimidines, sinó que també té capacitat de translocació de nucleobases com, per exemple, hipoxantina (**Osses et al.**, 1996; **Yao et al.**, 2002). Aquest transportador presenta alta afinitat per inosina i participa en la captació i l'eflux de metabòlits d'adenosina a múscul esquelètic (**Crawford et al.**, 1998). hENT2 s'expressa a placenta, sistema nerviós central – a cervell, concretament –, a teixit muscular cardíac, a l'ovari (**Yao et al.**, 1997), i a testicle (**Lu et al.**, 2004). L'expressió d'hENT2 a cervell és molt rellevant en quant a transport d'adenosina i regulació dels seus nivells extracel·lulars es refereix, en tant que tant hENT1 com hENT2 ocupen un rol important en l'activació de receptors d'adenosina a hipocamp, escorça cerebral, cerebel i cos estriat (**Anderson et al.**, 1999a i 1999b). També al sistema nerviós central, hENT1 i hENT2 tenen un paper important en la síntesi i el subministrament d'AMP, ADP, ATP i GTP als astròcits (**Peng et al.**, 2005). hENT2 es troba sobre-expressat en càncers de ronyó, de mama, de pròstata, de còlon i d'estómac (**Pennycooke et al.**, 2001). hENT2 presenta un 50% d'homologia amb hENT1 i un 88% d'homologia amb els seus ortòlegs de ratolí (mENT2) i de rata (rENT2) (**Kiss et al.**, 2000). Existeixen quatre variants polimòrfiques conegudes per hENT2 que, a diferència dels polimorfismes coneguts per hENT1, sí suposen alteracions funcionals importants: les delecions hENT2 $\Delta^{845-846}$ i hENT2 $\Delta^{551-556}$, i les substitucions aminoacídiques hENT2^{Asp5Tyr} i hENT2^{Asn68Lys}, que donen lloc a una pèrdua completa de funció en el primer cas i una pèrdua del 50% en el segon (**Owen et al.**, 2005 i 2006a). A part, existeixen variants polimòrfiques de *SLC29A2* que resulten en isoformes nuclears d'hENT2, hENT2^{HNP32} i hENT2^{HNP36}, que estan implicades en la regulació del cycle cel·lular (**Grañe-Boladeras et al.**, 2016b).

Proteïna (aminoàcids)	Gen (localització genòmica)	Substrats (K_M , μM)	Inhibidors (K_M , nM)
hENT1 (456)	SLC29A1 (6p21.1–p21.2)	adenosina (40)	NBTI (0,4) dipiridamol (5)
		guanosina (140)	
		inosina (170)	
		uridina (240)	
		timidina (300)	
		citidina (580)	
		adenina (3200)	
		hipoxantina (6000)	
		timina (6300)	
		guanina (indet.)	
uracil (indet.)			
hENT2 (456)	SLC29A2 (11q13)	inosina (50)	NBTI (2,8) dipiridamol (356)
		adenosina (140)	
		uridina (200)	
		hipoxantina (700)	
		timidina (710)	
		adenina (1100)	
		timina (1700)	
		uracil (2600)	
		guanosina (2700)	
		citidina (5610)	
citiosina (indet.)			
guanina (indet.)			

Taula 1. Transportadors equilibratius de nucleòsids hENT1 i hENT2 (Pastor-Anglada *et al.*, 2018). Classificació dels transportadors equilibratius de nucleòsids hENT1 i hENT2, nombre d'aminoàcids de les proteïnes, gens que els codifiquen i la seva localització genòmica corresponent, i substrats i inhibidors de cada transportador amb les respectives constants d'afinitat.

2.1.3. hENT3 (SLC29A3)

Més enllà de la identificació i la caracterització dels transportadors equilibratius de nucleòsids hENT1 i hENT2, es van identificar isoformes dels transportadors hENT3 i hENT4, codificats pels gens *SLC29A3* i *SLC29A4*, respectivament (Engel *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2007). La proteïna transportadora hENT3 consta de 475 aminoàcids i, a diferència d'hENT1 i hENT2, posseeix un extrem *N*-terminal hidròfil molt llarg, 51 aminoàcids, que conté dos motius dileucina (2 × 2×L) que són característics de proteïnes endosòmiques i lisosòmiques, en tant que aquests motius dileucina es troben en compartiments intracel·lulars i no a la membrana plasmàtica, a nivell subcel·lular. hENT3 presenta un grau d'homologia del 73% amb el seu ortòleg de ratolí (mENT3) i només d'un 23% amb hENT1. El transportador hENT3 és un transportador d'adenosina i d'urina de baixa afinitat, i, a més, a diferència dels transportadors hENT1 i hENT2, presenta activitat òptima a pH 5,5; tot i que no presenta capacitat de translocació de protons, i una sensibilitat notablement menor a ser inhibit tant per NBTI com per dipiridamol (Baldwin *et al.*, 2005). Tot i que la seva expressió és ubíqua, hENT3 s'expressa de forma abundant especialment a la placenta (Hyde *et al.*, 2001; Baldwin *et al.*, 2005). A escala subcel·lular, hENT3 s'expressa a mitocondri (Kang *et al.*, 2010), concretament a la membrana mitocondrial on pot ser responsable de cert grau de toxicitat pel tractament amb alguns fàrmacs derivats de nucleòsids (Govindarajan *et al.*, 2009); i també a lisosomes (Baldwin *et al.*, 2004 i 2005), en què hENT3 regula la recaptació de nucleòsids provinents de la degradació lisosòmica de molècules de RNA (Heydrick *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 2018). La presència de mutacions en el gen *SLC29A3* dóna lloc a formes deletèries del transportador que són les causants de la síndrome H (Spiegel *et al.*, 2010; Huber-Ruano *et al.*, 2012) i la síndrome d'hipertricosi pigmentària amb diabetis insulino-dependent (PHID; de l'anglès, *Pigmentary Hypertrichosis and non-autoimmune Insulin-dependent Diabetes mellitus*) (Molho-Pessach *et al.*, 2008), desordres autosòmics recessius que poden cursar amb hiperpigmentació, histiocitosi, hipertricosi i/o baixa estatura (El-Khateeb, 2010; Molho-Pessach *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2010; Huber-Ruano *et al.*, 2012).

2.1.4. hENT4 (SLC29A4)

hENT4 és una proteïna de 530 aminoàcids que, més que un transportador de nucleòsids pròpiament dit, és més aviat un transportador de baixa afinitat de monoamines (Engel *et al.*, 2004) i de cations orgànics (Engel i Wang, 2005). hENT4 presenta tan sols un 18% d'identitat de seqüència amb hENT1 (Baldwin *et al.*, 2004). Per aquesta raó, hENT4 també és conegut amb la denominació PMAT (de l'anglès, *Plasma Membrane monoAmine Transporter*) (Zhou *et al.*, 2010). La translocació de substrat per hENT4 requereix pH àcid per poder tenir lloc (Barnes *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2007). hENT4 també pot transportar adenosina (Li *et al.*, 2008). hENT4 es troba a la membrana ventricular dels miòcits i en cèl·lules endotelials vasculars, on exerceix un paper en el transport de serotonina i en la regulació dels nivells extracel·lulars d'adenosina (Barnes *et al.*, 2006).

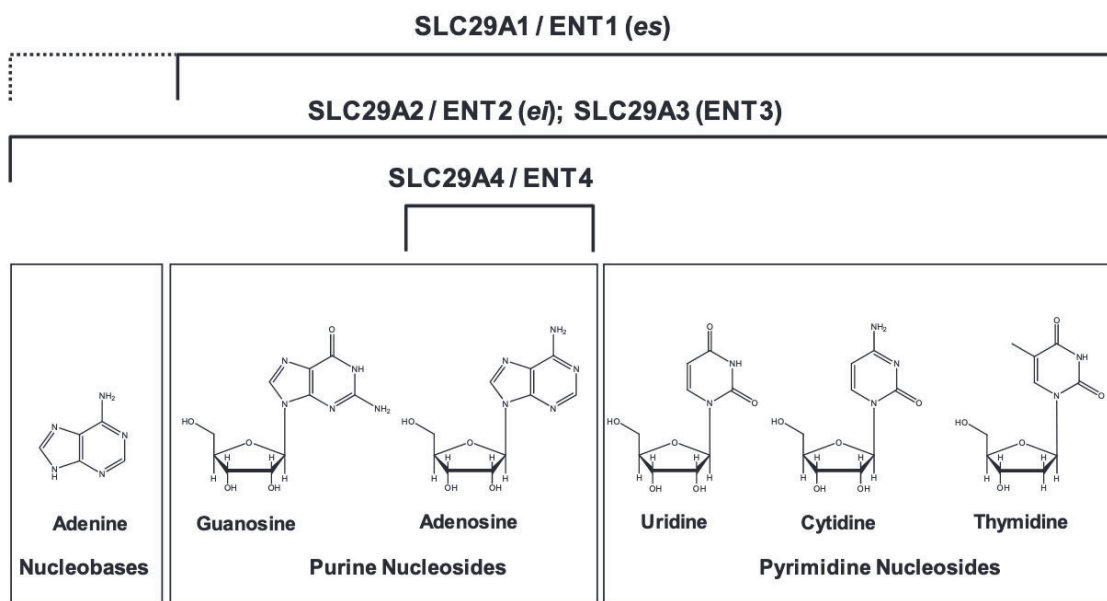


Figura 11. Especificitat de substrat dels transportadors equilibratius de nucleòsids (Young *et al.*, 2013). Selectivitat estructural i especificitat dels transportadors equilibratius de nucleòsids hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4 envers els nucleòsids naturals purínics (guanosina i adenosina), pirimidínics (uridina, citidina i timidina) i una nucleobase púrica (adenina).

2.2. Transportadors concentratius de nucleòsids

Els transportadors concentratius de nucleòsids o hCNTs codificats per la família gènica *SLC28* són sistemes de transport secundaris que requereixen energia procedent d'un gradient electroquímic de cations de sodi (Na^+) (Smith *et al.*, 2007). És precisament el cotransport de sodi i del substrat cap a l'interior de la cèl·lula el que propicia l'acumulació intracel·lular de substrat translocat. Per tant, el transport mitjançat pels transportadors concentratius es tracta d'un transport actiu, en contra de gradient de concentració i unidireccional (King *et al.*, 2006a). Inicialment, es van identificar cinc sistemes de transport concentratiu d'alta afinitat: N1 (actual hCNT2), N2 (actual hCNT1), N3 (actual hCNT3), N4 i N5. Els sistemes N4, amb afinitat per guanosina (Gutierrez *et al.*, 1992; Gutierrez i Giacomini, 1993), i N5 (també denominat **csg**, de **con**centratiu **sen**sible a **NBTI** translocador de **g**uanosina), amb afinitat per guanosina i inhibible per **NBTI** (Flanagan i Meckling-Gill, 1997; Soler *et al.*, 1998), no foren incorporats a la classificació posterior de transportadors concentratius. La classificació actual de transportadors concentratius de nucleòsids està formada per tres membres: hCNT1 (codificat pel gen *SLC28A1*), hCNT2 (codificat pel gen *SLC28A2*) i hCNT3 (codificat pel gen *SLC28A3*) (Kong *et al.*, 2004). Els tres membres d'aquest grup de transportadors de nucleòsids presenten diferent especificitat de substrat: hCNT1 transloca nucleòsids de pirimidines, hCNT2 transloca nucleòsids de purines i uridina, i hCNT3 és més promiscu en termes d'especificitat de substrat i transloca nucleòsids tant de pirimidines com de purines (Pastor-Anglada *et al.*, 2008; Parkinson *et al.*, 2011). Els transportadors concentratius es caracteritzen per una elevada afinitat envers el substrat que es reflecteix en constants d'interacció (K_M) compreses en el rang micromolar baix (Pastor-Anglada *et al.*, 2008). L'estequiometria del cotransport de sodi i substrat, Na^+ :nucleòsid, és 1:1 en el cas dels transportadors hCNT1 i hCNT2 (Smith *et al.*, 2004; Che *et al.*, 1995; Larrayoz *et al.*, 2004), i 2:1 en el cas de hCNT3 que, a més, és l'únic dels tres transportadors concentratius en què el catió sodi (Na^+) és intercanviable per un protó (H^+) (Ritzel *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005b; Hu *et al.*, 2006). A més, alternativament, hCNT3 té capacitat de translocació de substrat en medi àcid amb una estequiometria sodi:protó:nucleòsid ($\text{Na}^+:\text{H}^+:\text{Nu}^{(-)}$) equimolar (1:1:1) (Mulinta *et al.*, 2017), de manera que la substitució de dos cations sodi per dos protons té lloc únicament en absència total de sodi (Smith *et al.*, 2007). Cap dels tres transportadors concentratius de nucleòsids presenta capacitat de translocació de nucleobases (Chang *et al.*, 2004).

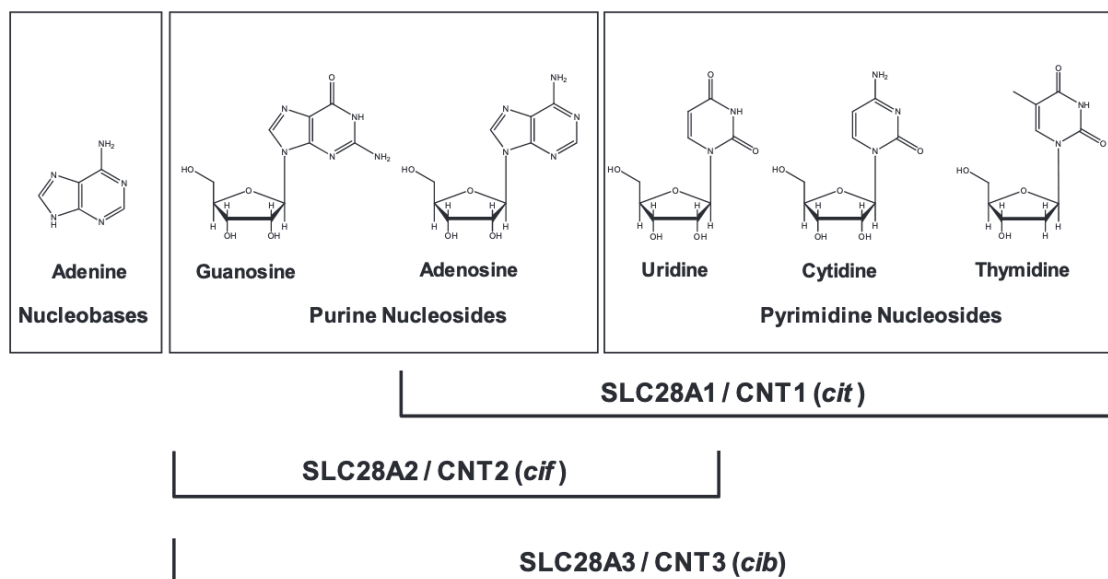


Figura 12. Especificitat de substrat dels transportadors concentratius de nucleòsids (Young *et al.*, 2013). Selectivitat estructural i especificitat dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1 (antic sistema *cit*), hCNT2 (antic sistema *cif*) i hCNT3 (antic sistema *cib*) envers els nucleòsids naturals purínics (guanosina i adenosina), pirimidínics (uridina, citidina i timidina) i una nucleobase púrica (adenina).

2.2.1. hCNT1 (gen *SLC28A1*)

Es va aïllar un cDNA de 2,4 kb a partir d'epiteli de jejú de rata corresponent al sistema N2 o **cit** (concentratiu insensible a NBTI translocador de timidina) amb capacitat de translocació preferent de pirimidines (Huang *et al.*, 1994). Aquest cDNA codifica per una proteïna de 648 aminoàcids i 71 kDa de massa molecular amb activitat transportadora de nucleòsids i que es va anomenar CNT1 (*Concentrative Nucleoside Transporter 1*). Al principi, es va suggerir que a més de nucleòsids de pirimidina, podria transportar també adenosina, tot i que sense arribar a completar el cicle de translocació sencer (Larrayoz *et al.*, 2004), de forma que adenosina actua com un inhibidor envers hCNT1 (Lai *et al.*, 2002) o bé com un substrat transportat a molt baixa capacitat (Smith *et al.*, 2004). El sistema de transport CNT1 fou clonat i caracteritzat funcionalment a partir de cervell de rata i de parènquima hepàtic (Anderson *et al.*, 1996; Felipe *et al.*, 1998). Un cop clonat l'ortòleg humà respectiu, ambdós ortòlegs van passar a denominar-se hCNT1 (humà) i rCNT1 (rata), respectivament. El procediment de clonació es va realitzar per homologia i mitjançant l'aïllament a partir de ronyó humà del cDNA codificant per a les dues isoformes humanes de CNT1 diferents, hCNT1a i hCNT1b (Ritzel *et al.*, 1997). Mentre que la isoforma hCNT1a, una proteïna de 650 aminoàcids i un 83%

d'homologia amb rCNT1, va passar a ser considerada la forma canònica de hCNT1; l'altra isoforma, hCNT1b, presenta més d'un 99% d'homologia de seqüència amb hCNT1a, de manera que va passar a considerar-se una variant polimòrfica de hCNT1a. La proteïna transportadora hCNT1 és codificada pel gen *SLC28A1* localitzat al cromosoma 15 del genoma humà a la posició 15q25 a l'exó 11. La principal variant polimòrfica de hCNT1 és la variant hCNT1^{Phe216His} (**Lai et al.**, 2005), tot i que existeixen al voltant d'uns 60 polimorfismes més entre els quals 15 comporten un canvi en la seqüència aminoacídica de la proteïna, i d'aquestes, en destaquen dues, hCNT1^{Ser546Pro} i hCNT1 Δ ¹¹⁵³, en tant que són les dues variants que cursen amb una pèrdua total de funció i que, en conseqüència, incideixen de forma determinant en la biodisponibilitat de fàrmacs derivats de nucleòsids (**Gray et al.**, 2004a). En quant a la resta de variants polimòrfiques, n'hi ha tres que afecten significativament la translocació de timidina: hCNT1^{Leu635Val}, hCNT1^{Val189Ile} i hCNT1^{Asp521Asn}, cursant la primera amb un augment de transport i les altres dues amb una disminució (**Naito et al.**, 2010), i la darrera d'elles amb un increment de toxicitat hematològica en tractament amb gemcitabina (**Soo et al.**, 2009). hCNT1 s'expressa principalment a fetge (**Felipe et al.**, 1998; **Duflot et al.**, 2002), ronyó (**Le Hir**, 1990; **Hamilton et al.**, 2001), intestí prim (**Patil et al.**, 2000; **Ngo et al.**, 2001), cervell, cor, pulmó, teixit adipós marró i pàncrees (**Ritzel et al.**, 1997; **Pennycooke et al.**, 2001). En la majoria de tumors i càncers, l'expressió d'hCNT1 es troba disminuïda de forma molt significativa; com per exemple en càncers de mama (**Lane et al.**, 2010), de pàncrees (**Mohelnikova-Duchonova**, 2013), de bufeta (**Mey et al.**, 2006) i hepatocarcinoma (**Zollner et al.**, 2005); excepte en càncer d'ovari en què, excepcionalment tractant-se d'un fenotip tumoral, l'expressió d'hCNT1 es veu augmentada (**Farre et al.**, 2004).

2.2.2. hCNT2 (gen *SLC28A2*)

El sistema de transport CNT2 va ser clonat a partir de fetge de rata com a sistema de transport de purines dependent de sodi que es va denominar sistema N1 o **cif** (**concentratiu insensible a NBTI translocador de formicina B**) (**Che et al.**, 1995). Es va obtenir el cDNA de 2,9 kb en oòcits de *Xenopus laevis* per al transportador SPNT (de l'anglès, *Sodium-dependent Purine Nucleoside Transporter*) que codifica per l'ortòleg de rata de CNT2 (rCNT2), una proteïna de 659 aminoàcids i amb una massa molecular de 72 kDa (**Che et al.**, 1995). Pel que fa a l'ortòleg humà, es va identificar a partir de ronyó humà mitjançant clonació per homologia i es va obtenir la

proteïna hSPNT1, que no es correspon exactament amb hCNT2 (Wang *et al.*, 1997). hSPNT1 consta d'una seqüència de 658 aminoàcids i un 81% d'homologia de seqüència amb rCNT2. En quant a la proteïna hCNT2, es va clonar i va ser caracteritzada funcionalment a partir d'intestí prim humà (Chandrasena *et al.*, 1997; Ritzel *et al.*, 1998). Les proteïnes hSPNT1 i hCNT2 són idèntiques excepte en un residu aminoacídic a la posició 75 de la seva seqüència, mentre que hSPNT1 hi té un residu d'arginina, hCNT2 hi té un residu de serina. La proteïna hCNT2 presenta un 72% d'homologia amb hCNT1 i un 83% d'homologia amb rCNT2, i és codificada pel gen *SLC28A2* situat al cromosoma 15 (Wang *et al.*, 1997). Existeix un gran nombre de variants polimòrfiques per hCNT2, totes elles sense incidència significativa en la seva funció, excepte tres: hCNT2^{Phe355Ser}, que presenta diferent afinitat per uridina i per inosina, hCNT2^{Glu385Lys}, que té una capacitat de transport d'uridina, inosina i ribavirina molt reduïda, i hCNT2^{Met612Thr}, amb menor afinitat per uridina (Loewen *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). Igual que succeeix amb hCNT1, també existeix un polimorfisme en hCNT2, hCNT2^{Phe22Leu}, que incideix en la resposta terapèutica a gemcitabina (Soo *et al.*, 2009). A part, existeixen variants polimòrfiques a la regió del promotor de *SLC28A2* que poden comportar variacions en l'expressió gènica de hCNT2 (Li *et al.*, 2009; Yee *et al.*, 2009). Pel que fa a la distribució tissular de hCNT2, es tracta d'un transportador que es troba àmpliament distribuït i que s'expressa en nivells importants a múscul cardíac, múscul esquelètic (Che *et al.*, 1995), pàncrees, placenta, cèrvix, pròstata, fetge (del Santo *et al.*, 2001; Pastor-Anglada *et al.*, 2001), ronyó, intestí prim (Patil *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2003), teixit adipós marró, cervell (Ritzel *et al.*, 1998; Guillen-Gomez *et al.*, 2004), en especial a barrera hematoencefàlica (Li *et al.*, 2001b; Cansev, 2006), i pulmó (Ritzel *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2004b). hCNT2 també s'expressa en cèl·lules del sistema immunitari, concretament als limfòcits B (Soler *et al.*, 2000) i, conjuntament amb hCNT1, en macròfags de medul·la òssia (Soler *et al.*, 2001b). En tumors, hCNT2 presenta nivells elevats d'expressió en càncers de mama, pròstata, úter, ovari i pulmó (Pennycooke *et al.*, 2001). En relació a anàlegs de nucleòsids, hCNT2 transloca aciclovir, didesoxiinosina, didesoxiadenosina i cladribina; però no té capacitat de transportar zidovudina o AZT i didesoxicitidina (Schaner *et al.*, 1997 i 1999).

2.2.3. hCNT3 (gen *SLC28A3*)

El sistema de transport CNT3 va ser conegut al començament com sistema de transport N3 o **cib** (concentratiu insensible a NBTI **bitranslocador** de purines i pirimidines) (Wu *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1993; Vijayalakshmi *et al.*, 1992; Hong *et al.*, 2001). El cDNA obtingut atribuït a hCNT3 codifica per una proteïna de 691 aminoàcids amb una massa molecular de 77 kDa. L'obtenció de la seqüència d'aminoàcids completa de CNT3 es va realitzar en l'ortòleg de ratolí, mCNT3, que consta de 703 aminoàcids (Ritzel *et al.*, 2001). Pel que fa a l'ortòleg humà, hCNT3, aquest presenta un nivell d'homologia del 79% amb l'ortòleg de ratolí mCNT3, i un grau d'homologia notablement menor amb els altres dos transportadors concentratius de nucleòsids, hCNT1 i hCNT2, amb els quals presenta un 48% i un 47% d'homologia, respectivament (Hu *et al.*, 2006). El patró d'expressió tissular d'hCNT3 és encara més ampli que el d'hCNT1 i hCNT2, incloent-hi l'intestí prim, la medul·la òssia, el pàncrees, la glàndula mamària, la tràquea, la pròstata, el fetge, el pulmó, la placenta, els testicles, el ronyó, el cor i el cervell (Che *et al.*, 1995; Ritzel *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2004b; Lu *et al.*, 2004). La proteïna hCNT3 es troba infra-expressada en adenocarcinoma ductal pancreàtic (Mohelnikova-Duchonova *et al.*, 2013). El gen que codifica per la proteïna transportadora hCNT3, *SLC28A3*, té una mida de 91,7 kb, conté un total de 19 exons i està localitzat al cromosoma 9, concretament al *locus* 9q22.2 (Toan *et al.*, 2003). hCNT3 presenta diverses variants polimòrfiques sense variacions en la seva funcionalitat translocadora, excepte dues. Una és la variant hCNT3^{Gly367Arg}, amb una freqüència al·lèlica inferior a l'1% de manera que no és ni tan sols considerada un polimorfisme, que es caracteritza per una disminució notable en la capacitat de captació de substrat (Badagnani *et al.*, 2005). L'altra variant és la hCNT3^{Cys602Arg} que, tot i conservar el mateix perfil d'afinitats pels substrats, té una capacitat de concentració de substrat molt reduïda per la pèrdua d'un dels dos llocs d'unió a catió sodi, fet que resulta en un canvi en l'estequiometria sodi:nucleòsid de la reacció de translocació que esdevé 1:1 en lloc de 2:1 (Errasti-Murugarren *et al.*, 2008; Errasti-Murugarren *et al.*, 2010). A més, també existeix una variant generada per un procés de *splicing* alternatiu que resulta en una proteïna, hCNT3^{ins}, amb idèntica funció però que a nivell subcel·lular es localitza al reticle endoplasmàtic en lloc de la membrana plasmàtica i acobla el transport de substrat a protons (H⁺) (Errasti-Murugarren *et al.*, 2009). Es va descriure una altra variant, hCNT3^{rs10868138G/rs56350726T}, relacionada amb una diferent resposta terapèutica a la ribavirina (Doehring *et al.*, 2011). En cèl·lules tumorals de leucèmia limfocítica crònica, hCNT3 no arriba a completar el trànsit a membrana

plasmàtica i queda retinguda al citoplasma (**Mackey et al.**, 2005; **Tsang et al.**, 2008). No obstant, aquest fenomen pot revertir-se mitjançant estimulació amb àcid *all-trans*-retinoic (ATRA) i redirigir hCNT3 de forma que completi el seu trànsit a la membrana plasmàtica (**Fernandez-Calotti i Pastor-Anglada**, 2010). A nivell d'estructura quaternària de la proteïna, hCNT3 oligomeritza donant lloc a la formació de trímers del transportador (**Stecula et al.**, 2017).

Proteïna (aminoàcids)	Gen (localització genòmica)	Substrats (K_M , μM)	Estequiometria (Na^+ :nucleòsid)
hCNT1 (650)	SLC28A1 (15q25.3)	citidina (3,1) timidina (27) uridina (38)	1:1
hCNT2 (659)	SLC28A2 (15q15)	adenosina (8) guanosina (8,5) inosina (13,7) uridina (116)	1:1
hCNT3 (691)	SLC28A3 (9q22.2)	adenosina (2,4) citidina (3,5) inosina (4,3) uridina (5,3) guanosina (8,5) timidina (10,6)	2:1 1:1:1 * 1:1 **

Taula 2. Transportadors concentratius de nucleòsids (**Pastor-Anglada et al.**, 2018). Classificació dels transportadors concentratius de nucleòsids, nombre d'aminoàcids de les proteïnes, gens que els codifiquen i la seva localització genòmica corresponent, substrats de cada transportador amb les respectives constants d'afinitat, i les respectives estequiometries de translocació. (*) estequiometria Na^+ : H^+ :nucleòsid; (**) estequiometria H^+ :nucleòsid.

2.3. Transportadors de cations orgànics

Els transportadors de cations orgànics o hOCTs codificats per la família gènica *SLC22* són sistemes de transport que catalitzen la translocació electrogènica i independent de catió sodi (Na^+) i de protons (H^+) (**Ciarimboli**, 2008). Es tracta d'un transport regit segons gradient electroquímic, en tant que la translocació es realitza a favor de gradient de concentració del substrat i la càrrega del mateix substrat actua com a força motriu del procés de transport (**Koepsell i Endou**, 2004; **Koepsell**, 2007). Els substrats preferents dels hOCTs són cations orgànics, però donada la seva baixa especificitat de substrat també poden translocar bases febles i molècules neutres sense càrrega, com ara prostaglandines (**Kimura et al.**, 2002), 1-metil-4-fenilpiridini (MPP^+), serotonina, noradrenalina i histamina (**Busch et al.**, 1998). Els transportadors d'anions orgànics (OATs) transloquen anions orgànics, en lloc de cations (**Srimaroeng et al.**, 2008). En principi, aquests transportadors no tenen capacitat de transportar nucleòsids naturals, tot i que sí que transloquen alguns anàlegs de nucleòsids com lamivudina o 3TC (**Minuesa et al.**, 2009; **Arimany-Nardi et al.**, 2016), zidovudina o AZT, emtricitabina o FTC, aciclovir o ACV (**Takeda et al.**, 2002; **Jung et al.**, 2008), tenofovir (**Minuesa et al.**, 2017) i també anàlegs de nucleobases com 5-fluorouracil o 5-FU i tiopurines. Aquests transportadors són importants en la biodisponibilitat d'altres fàrmacs; com metformina (**Shu et al.**, 2007 i 2008; **Ahlin et al.**, 2011; **Tzvetkov et al.**, 2009), verapamil (**Minematsu i Giacomini**, 2011), topisetró (**Tzvetkov et al.**, 2012), imatinib (**Crossman et al.**, 2005; **White et al.**, 2006; **Wang et al.**, 2008; **Giannoudis et al.**, 2013) i sorafenib (**Herraez et al.**, 2013).

A nivell subcel·lular, el transportador hOCT1 es troba a la membrana basolateral de cèl·lules epitelials tant en cèl·lules renals (**Tzvetkov et al.**, 2009) com hepàtiques. És per això que aquest transportador és rellevant en la farmacocinètica de molts fàrmacs (**Song et al.**, 2008). Pel que fa a la seva distribució tissular, hOCT1 presenta una distribució àmplia i, tot i que s'expressa majoritàriament a fetge (**Gorboulev et al.**, 1997), també s'expressa en altres teixits com múscul cardíac, múscul esquelètic, pulmó (**Lips et al.**, 2005), ronyó, placenta (**Sata et al.**, 2005), intestí prim (**Muller et al.**, 2005) i neurones (**Schmitt et al.**, 2003). Precisament com a conseqüència de la seva localització predominantment hepàtica (**Gorboulev et al.**, 1997; **Nies et al.**, 2009), hOCT1 és un dels grans responsables de l'efecte de primer pas hepàtic que

experimenten molts fàrmacs dins l'organisme (Nies *et al.*, 2008). Pel que fa a localització subcel·lular, els transportadors de cations orgànics es troben en cèl·lules polaritzades. Al fetge, hOCT1 localitza a la membrana sinusoidal dels hepatòcits (Meyer-Wentrup *et al.*, 1998). Al ronyó, mentre que hOCT1 es troba a la membrana apical de l'epiteli renal (Tzvetkov *et al.*, 2009), hOCT2 es troba a la membrana basolateral (Motohashi *et al.*, 2002). Al tracte respiratori, tant hOCT1 com hOCT2 localitzen a la membrana luminal de les cèl·lules epitelials (Lips *et al.*, 2005).

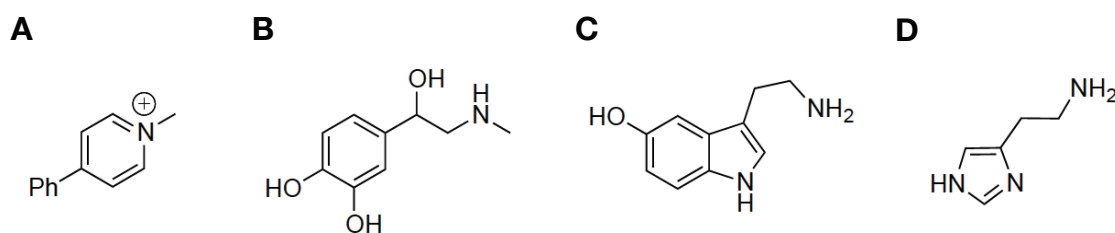


Figura 13. Substrats dels transportadors de cations orgànics. Estructura d'alguns substrats dels transportadors de cations orgànics (hOCTs); (A) 1-metil-4-fenilpiridini (MPP⁺), (B) noradrenalina, (C) serotonina i (D) histamina.

2.4. Estructura dels transportadors de nucleòsids

2.4.1. Estructura dels transportadors equilibratius de nucleòsids

En primer terme, es va obtenir un model topològic a partir d'anàlisi de predicció de seqüència i confirmat mitjançant estudis de mutagènesi (Sundaram *et al.*, 2001) que constava de 11 dominis transmembrana connectats per curtes regions hidròfiles, dos grans llaços entre els dominis transmembrana 1 i 2 (Bicket i Coe, 2016), i 6 i 7 (Dos Santos-Rodrigues *et al.*, 2014); un extrem *N*-terminal citoplasmàtic i un extrem *C*-terminal extracel·lular (Griffith i Jarvis, 1996; Vickers *et al.*, 1999). El llaç intertransmembrana 1-2 conté un lloc de *N*-glicosilació en el cas d'hENT1 i en té dos en el cas d'hENT2 que semblen no ser essencials per a la funcionalitat translocadora (Ward *et al.*, 2003). La regió continguda entre els dominis transmembrana 3 i 6 és la responsable de la interacció amb diversos inhibidors com nitrobenziltioinosina (NBTI), dipiridamol i dilazep (Sundaram *et al.*, 1998; Sundaram *et al.*, 2001). Els residus aminoacídics millor caracteritzats en la inhibició dels transportadors equilibratius són Trp²⁹ (Paproski *et al.*, 2008), Met³³ (Visser *et al.*, 2002), Leu⁹² (Endres *et al.*, 2004), Gly¹⁵⁴ (SenGupta i Unadkat, 2004), Ser¹⁶⁰ (Endres i Unadkat, 2005),

Gly¹⁷⁹ (SenGupta *et al.*, 2002), Asn³³⁸ (Vickers *et al.*, 1999) i Leu⁴⁴² (Hammond, 2000). En el cas d'hENT1; el residu Gly¹⁵⁴ és imprescindible per a la sensibilitat a la inhibició amb NBTI (Hyde *et al.*, 2001), el residu Ser¹⁶⁰ és el responsable de la sensibilitat a la inhibició amb dipiridamol i el residu Met⁸⁹ determina l'afinitat del transportador per nucleòsids purínics, bàsicament adenosina i guanosina (Sundaram *et al.*, 1998; Sundaram *et al.*, 2001; Endres i Unadkat, 2005). Pel que fa a hENT2, la regió entre els dominis transmembrana 1 i 6 és determinant per al transport de desoxiribonucleòsids (Yao *et al.*, 2001b) i la regió entre els dominis transmembrana 5 i 6 és essencial per al reconeixement de nucleobases (Yao *et al.*, 2002). En la formació del porus a través del qual esdevé la translocació del nucleòsid o la nucleobase a través dels transportadors equilibratius hi intervenen els dominis transmembrana 1, 2, 4, 5, 8, 10 i 11 (Arastu-Kapur *et al.*, 2005; Valdes *et al.*, 2009, 2012 i 2014); el darrer dels quals adopta estructura d'hèlix- α (Riegelhaupt *et al.*, 2010). El residu Gly¹⁸⁴ és important per al correcte trànsit de la proteïna a membrana plasmàtica (SenGupta *et al.*, 2002). Pel que fa al trànsit a mitocondri, la seqüència PEXN formada pels residus 71–74 n'és la responsable (Lee *et al.*, 2006). Recentment, es va obtenir l'estructura cristal·litzada mitjançant difracció de raigs X del transportador hENT1 (Wright i Lee, 2019).

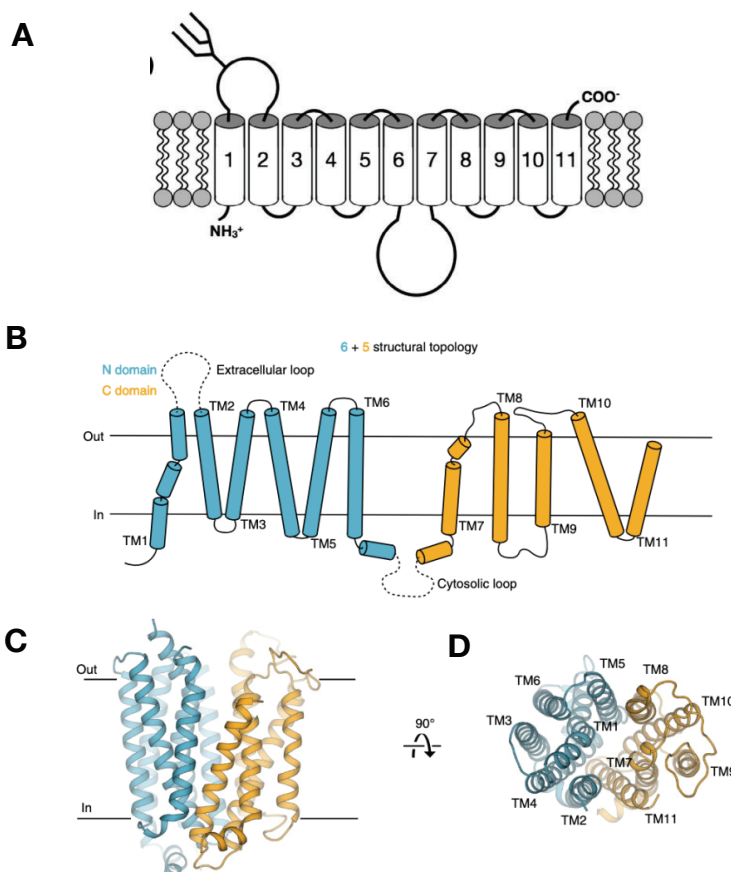


Figura 14. Estructura dels transportadors equilibratius de nucleòsids. (A) Diagrama de la topologia bidimensional predita per als transportadors equilibratius de nucleòsids, amb 11 dominis transmembrana, un extrem *N*-terminal intracel·lular i un extrem *C*-terminal extracel·lular (Dos Santos-Rodrigues *et al.*, 2014). (B) Diagrama de la topologia de l'estructura cristal·litzada d'hENT1 (Wright i Lee, 2019); i (C i D) estructura secundària i terciària d'hENT1 des de la perspectiva (C) del pla de la membrana plasmàtica i (D) del medi extracel·lular (Wright i Lee, 2019).

2.4.2. Estructura dels transportadors concentratius de nucleòsids

En un principi, es va predir una topologia de 14 dominis transmembrana (Huang *et al.*, 1994) amb ambdós extrems *N*-terminal i *C*-terminal intracel·lulars (Wang *et al.*, 1997), i després una altra de 13 (Felipe *et al.*, 1998). *A posteriori*, a partir de diversos models topològics i mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida i construcció de proteïnes quimèriques es va adoptar un model topològic per als transportadors concentratius de nucleòsids de 13 dominis transmembrana amb estructura hèlix- α units per seqüències hidrofíliques curtes, de menys de 22 aminoàcids, i un llarg extrem *N*-terminal intracel·lular i un extrem *C*-terminal, també llarg, extracel·lular i susceptible de glicosilació (Hamilton *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2004b). Ambdós extrems contenen seqüències consens de fosforilació per les proteïnes quinasa A (PKA) i C (PKC) i per la caseïna quinasa 2 (CK2). L'extrem *N*-terminal està implicat en unió a proteïnes, senyalització cel·lular i trànsit a membrana (Errasti-Murugarren *et al.*, 2010a; Huber-Ruano *et al.*, 2010; Pinilla-Macua *et al.*, 2012). Els tres transportadors concentratius de nucleòsids; hCNT1, hCNT2 i hCNT3, presenten una homologia de seqüència d'aproximadament un 50% entre ells i una estructura secundària semblant (Pastor-Anglada *et al.*, 2008). Les proteïnes hCNT1, hCNT2 i hCNT3 estan formades per 650, 659 i 691 aminoàcids, respectivament; i les seves corresponents cues *N*-terminals per 83, 80 i 103 aminoàcids, també respectivament (Pastor-Anglada *et al.*, 2008). També es va proposar un altre model alternatiu consistent en una topologia de 15 dominis transmembrana, obtinguda mitjançant experiments de mutagènesi dirigida sobre residus de cisteïna de hCNT3, en què una part dels llaços extracel·lulars de les regions entre dominis transmembrana 5–6 i 11–12 serien també dominis transmembrana (Slugoski *et al.*, 2009). En el cas concret de CNT1, específicament rCNT1, es va detectar que la topologia de la proteïna té un paper rellevant pel que fa a la seva localització subcel·lular i funcionalitat. En aquest sentit, es van identificar els residus aminoacídics d'asparagina Asn⁶⁰⁵ i Asn⁶⁴⁸ de l'extrem *C*-terminal extracel·lular com rellevants a nivell de la seva glicosilació (Hamilton *et al.*, 2001). D'altra banda, en quant a la cua intracel·lular *N*-terminal és susceptible de ser un lloc de

regulació de la proteïna mitjançant eventuais interaccions proteïna-proteïna (**Huber-Ruano et al.**, 2010; **Pinilla-Macua et al.**, 2012). L'estructura cristal·litzada de la proteïna del transportador concentratiu de nucleòsids es va obtenir a partir de l'ortòleg bacterià de *Vibrio cholerae*, vcCNT, que presenta un 39% d'homologia de seqüència amb hCNT3 (**Johnson et al.**, 2012). El cristall obtingut de vcCNT procariota consta de 8 hèlixs- α i suggereix la possibilitat de la formació d'homotrímers de transportadors de nucleòsids (**Johnson et al.**, 2012). El lloc d'unió al substrat es troba entre els dominis HP1 i HP2, i el lloc d'unió a catió sodi (el primer lloc d'unió a sodi en el cas de hCNT3) es troba situat entre el domini HP1 i el domini transmembrana 4 (**Young et al.**, 2013). El segon lloc d'unió a sodi de hCNT3 fou identificat posteriorment entre els residus aminoacídics Cys⁶⁰² i Thr⁶⁰⁵ (**Arimany-Nardi et al.**, 2017), fet que resulta totalment coherent amb les evidències prèvies en què la variant polimòrfica hCNT3^{Cys602Arg} perd un dels dos llocs d'unió a sodi passant d'una estequiometria de translocació sodi:nucleòsid de 2:1 a 1:1 (**Errasti-Murugarren et al.**, 2008) i localitzada subcel·lularment a basses lípidiques (en anglès, *lipid rafts*) (**Errasti-Murugarren et al.**, 2010b). Pel que fa a les diverses etapes del mecanisme de translocació en els transportadors concentratius, es van descriure les transicions de tipus ascensor (**Reyes et al.**, 2009; **Kim et al.**, 2017) una estructura corresponent a l'ortòleg de *Neisseria wadsworthii* (nwCNT) (**Hirschi et al.**, 2017). El model de translocació en ascensor (**Zhou et al.**, 2014; **Drew i Boudker**, 2016) fou confirmat en hCNT3 (**Yao i Young**, 2018).

Els tres primers dominis transmembrana dels transportadors concentratius eucariotes no són essencials per la funció transportadora. Els dominis transmembrana 8 i 9 són els dominis estructurals determinants de l'especificitat per pirimidines i per purines en hCNT1 i en hCNT2, respectivament. Més concretament, és el domini transmembrana 8 el que és crític pel que fa a l'especificitat excoent de reconeixement molecular envers d'uns nucleòsids o altres en relació a la naturalesa estructural purínica o pirimidínica de la seva nucleobase (**Wang i Giacomini**, 1999a). Aquesta diferència tan marcada pel que fa a la selectivitat estructural de substrat entre hCNT1 i hCNT2 rau tan sols en uns pocs aminoàcids del domini transmembrana 8 que resulten ser determinants, en tant que ambdues proteïnes es diferencien tan sols en cinc aminoàcids en aquesta regió. La substitució de Ser³¹⁹ en hCNT1 per una glicina que estructuralment equivaldria a Gly³¹³ de hCNT2 confereix a hCNT1 la capacitat de reconeixement i translocació de nucleòsids purínics, eixamplant l'especificitat estructural de substrat de hCNT1 a la de hCNT3 (**Wang i Giacomini**, 1999b).

Adicionalment a la modificació prèvia, la substitució de Ser³⁵³ per una treonina que es correspon estructuralment amb Thr³⁴⁷ de hCNT2, restringeix la selectivitat estructural de substrat de nucleòsids tant purínics com pirimidínics a únicament nucleòsids purínics; és a dir, l'espectre de reconeixement tipus hCNT3 esdevé tipus hCNT2, tot i tractar-se de la proteïna hCNT1 en primera instància (Loewen *et al.*, 1999). Els residus adjacents en hCNT1, Gln³²⁰ i Leu³⁵⁴, participen en el plegament estructural dels dominis hèlix- α (Loewen *et al.*, 1999). Els residus aminoacídics determinants en quant a selectivitat de substrat es refereix són Ser³¹⁹, Ser³⁵³, Leu³⁵⁴ i Gln³²⁰ per a hCNT1 (Hamilton *et al.*, 2001; Wang i Giacomini, 1997); i Gly³¹³, Met³¹⁴, Thr³⁴⁷ i Val³⁴⁸ per a hCNT2 (Wang i Giacomini, 1997). Els determinants estructurals que determinen la selectivitat de substrat com l'estequiometria de translocació es troben a la regió compresa entre els dominis transmembrana 7 i 13 (Smith *et al.*, 2005b). Existeixen altres residus i/o determinants estructurals a la seqüència aminoacídica dels transportadors concentratius de nucleòsids que són importants per l'estabilitat i el trànsit a membrana plasmàtica, com ara Gly⁴⁷⁶ a l'onzè domini transmembrana (Lai *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006), les regions enriquides en glutamat entre els residus 21 i 28 i el domini d'interacció amb caseïna quinasa 2 (CK2) (Pinilla-Macua *et al.*, 2012).

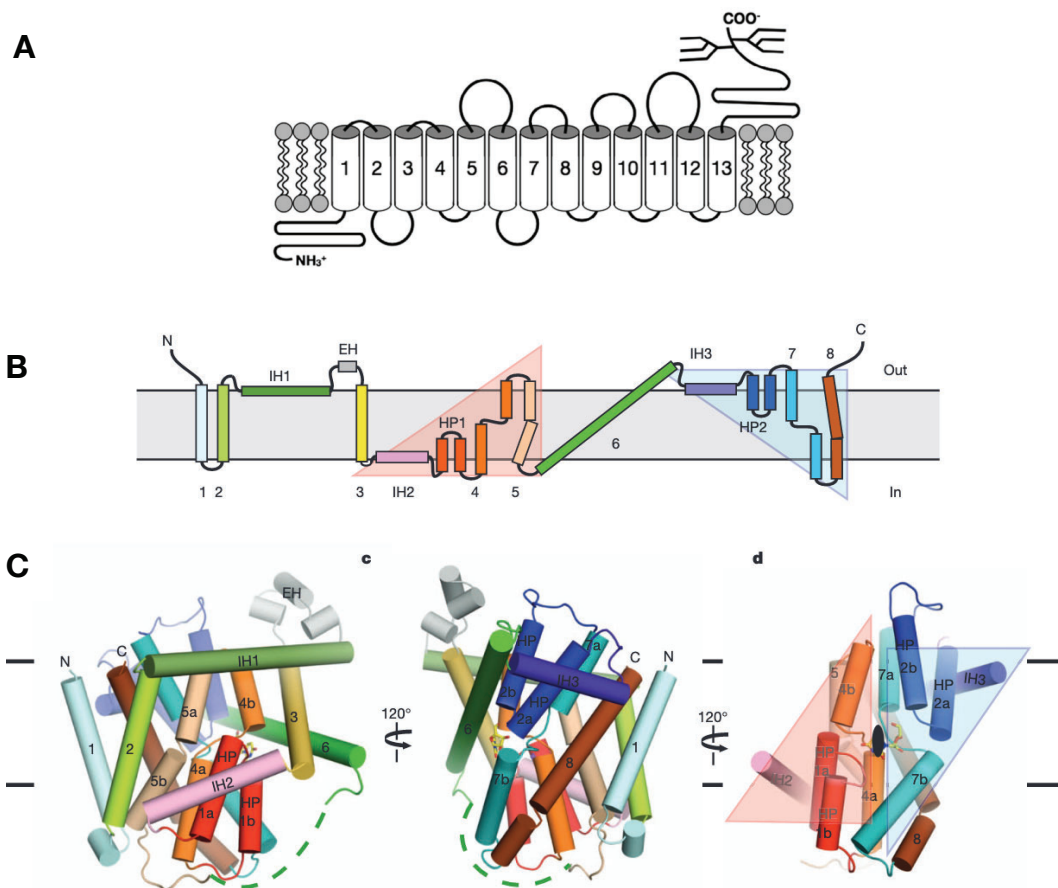


Figura 15. Estructura dels transportadors concentratius de nucleòsids. (A) Diagrama de la topologia bidimensional predita per als transportadors concentratius de nucleòsids, amb 13 dominis transmembrana, un extrem *N*-terminal intracel·lular i un extrem *C*-terminal extracel·lular (Dos Santos-Rodrigues *et al.*, 2014). (B) Diagrama de la topologia de l'estructura cristal·litzada del transportador concentratius de nucleòsids de *Vibrio cholerae* (vcCNT) (Johnson *et al.*, 2012); i (C) representació tridimensional de les estructures secundària i terciària de vcCNT (Johnson *et al.*, 2012).

2.4.3. Estructura dels transportadors de cations orgànics

Els transportadors de cations orgànics millor caracteritzats són hOCT1, hOCT2 i hOCT3 i tenen entre 550 i 560 aminoàcids a la seva seqüència (Ciarimboli, 2008). El seu model topològic consta de 12 dominis transmembrana amb ambdós extrems *N*-terminal i *C*-terminal intracel·lulars (Koepsell *et al.*, 2007), un llaç intracel·lular entre els dominis transmembrana 6 i 7 amb llocs fosforilables i un altre llaç entre els dominis transmembrana 1 i 2 amb llocs glicosilables (Koepsell i Endou, 2004), responsable de l'homodimerització d'hOCT1 (Keller *et al.*, 2011) i hOCT2 (Brast *et al.*, 2012). Els dominis transmembrana que participen en el reconeixement molecular i la interacció amb els substrats són el segon, el quart, el desè i l'onzè (Gorboulev *et al.*, 2005; Popp *et al.*, 2005; Gorbunov *et al.*, 2008). El mecanisme de translocació del substrat només té lloc quan la interacció del substrat amb el lloc d'unió és de baixa afinitat (Gorbunov *et al.*, 2008; Minuesa *et al.*, 2009). El llaç extracel·lular entre els dominis transmembrana 1 i 2 conté residus de cisteïna que són crítics per a l'oligomerització (Keller *et al.*, 2011) i el correcte direccionament del transportador a la membrana plasmàtica (Brast *et al.*, 2012).

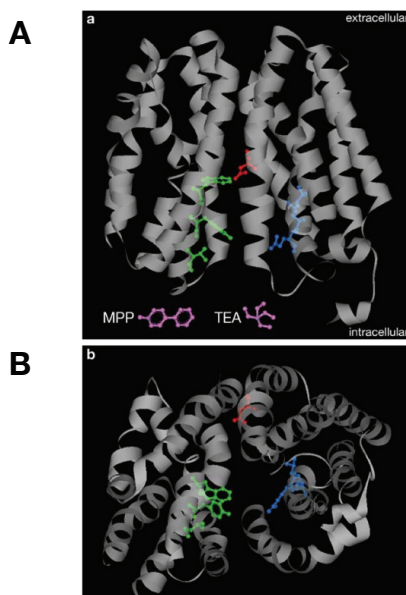


Figura 16. Estructura dels transportadors de cations orgànics (Koepsell *et al.*, 2007). Estructura tridimensional del transportador de cations orgànic 1 de rata (rOCT1) des de les perspectives (A) del pla de la membrana plasmàtica i (B) de la cara intracel·lular.

2.4.4. Determinants estructurals d'interacció dels transportadors de nucleòsids i dels transportadors de cations orgànics

Tots els transportadors concentratius de nucleòsids; hCNT1, hCNT2 i hCNT3, no tenen capacitat de translocació de nucleobases (Ritzel *et al.*, 1997; 1998 i 2001), encara que existeixi un únic cas aïllat en què hCNT3 és capaç de translocar nucleobases, concretament tiopurines (Fotoohi *et al.*, 2006). Això posa de manifest que el sucre o pentosa, ja sigui ribosa o desoxiribosa, és un determinant estructural essencial per part del substrat per al reconeixement i la interacció amb el transportador. És exactament el grup hidroxil de la posició 3' del nucleòsid (la posició 3 de la ribosa o la desoxiribosa) el primer lloc d'interacció i ancoratge del nucleòsid al transportador concentratiu (Patil *et al.*, 2000). A més, no només és essencial el grup 3'-OH per al reconeixement molecular del substrat per part dels transportadors concentratius, sinó que també és fonamental per a la interacció amb els transportadors equilibratius hENT1 i hENT2 (Vickers *et al.*, 2002). En el cas d'hENT1, a més de la interacció amb el grup 3'-OH, també existeix reconeixement de menor intensitat amb els grups hidroxil de les posicions 2' (2'-OH) i 5' (5'-OH) de la ribosa o la desoxiribosa del nucleòsid (Vickers *et al.*, 2004). Els dos transportadors concentratius que transloquen nucleòsids de pirimidines, hCNT1 i hCNT3, presenten un cert grau de tolerància pel que fa a l'addició d'halògens o grups funcionals electronegatius a la posició 5 de la pirimidina, és a dir a nivell de la nucleobase, dels nucleòsids corresponents, en termes d'interacció entre substrat i transportador (Zhang *et al.*, 2003). En el cas d'hCNT2, aquest també té tolerància respecte l'halogenació o addició de grups electronegatius a la posició 5, en aquest cas, del nucleòsid d'uridina; arribant a ser la translocació de 5-halouridines, fins i tot, més eficient que la d'anàlegs d'adenosina (Lang *et al.*, 2004). Tot i que el grup hidroxil a la posició 2' del nucleòsid, a la pentosa, no és necessari per a la interacció; és cert que la substitució de l'àtom d'hidrogen (-H) – si es tracta d'un desoxiribonucleòsid – o de l'hidroxil (-OH) – si és un ribonucleòsid – per un grup funcional voluminos, com ara un grup metoxil (-OCH₃) o un grup azida (-N₃; -N=N⁺=N⁻), afecta de forma determinant al reconeixement molecular del grup 3'-OH per part del transportador per un factor d'impediment estèric (Zhang *et al.*, 2003). En el cas de la interacció amb hCNT1, són tres els determinants estructurals

del substrat que són essencials: l'hidroxil de la posició 3' del nucleòsid (3'-OH), l'hidroxil de la posició 5' del nucleòsid (5'-OH) i el parell d'electrons no enllaçant en un orbital sp^2 pertanyent a l'àtom de nitrogen pirimidínic (és precisament el fet que aquest àtom de nitrogen que pren part de l'heterocicle aromàtic sigui de naturalesa pirimidínica i no pas purínica el que determina que el parell d'electrons no enllaçant de l'àtom de nitrogen sigui aliè i no participi del sistema π de deslocalització de la densitat electrònica de l'heterocicle aromàtic i, per tant, estigui disponible per a establir ponts d'hidrogen amb altres molècules en tant que acceptor – per contra, si el nitrogen fos de naturalesa purínica, com és el cas del nitrogen de la posició 1 de la pirimidina que enllaça amb la pentosa, el parell d'electrons no enllaçant sí que participaria activament i contribuiria en el sistema π de l'heterocicle aromàtic i, per tant, no estaria en absolut disponible per a qualsevol altre tipus d'interacció inter- o intramolecular amb altres determinants en cap cas, donat que aquest parell d'electrons no enllaçant queda deslocalitzat en tot el sistema π i no correspondria a cap orbital tipus sp^3 o sp^2) amb hibridació sp^2 de la posició 3 de la nucleobase pirimidínica. Tots aquests tres determinants estructurals possibiliten l'establiment de ponts d'hidrogen entre el substrat i el centre actiu del transportador (Zhang *et al.*, 2003). A nivell de la nucleobase, un augment en l'electropositivitat de les posicions 3 i 6 de la pirimidina, afavoreixen la interacció amb hCNT1. En canvi, a diferència del que succeeix amb hCNT1, en el cas de la interacció amb hCNT3, el determinant estructural 3'-OH és igualment essencial per al reconeixement molecular, però per contra ni l'hidroxil a la posició 5' (5'-OH) ni l'àtom d'hidrogen enllaçat al nitrogen de la posició 3 de la nucleobase participen en la interacció (Zhang *et al.*, 2003). En canvi, els dos parells d'electrons no enllaçants en orbitals moleculars d'hibridació sp^2 dels àtoms d'oxigen dels grups carbonil de les posicions 2 i 4 de la nucleobase, estan disponibles per actuar com acceptors de ponts d'hidrogen i estableixen sengles ponts d'hidrogen amb el centre actiu del transportador hCNT3 (Zhang *et al.*, 2003). La interacció amb hCNT3 es veu afavorida per l'addició de càrrega positiva a la posició 5 de la nucleobase de pirimidina i/o per l'absència d'impediment estèric, i per tant de substituents voluminosos, a la posició 3 de la pirimidina (Hu *et al.*, 2006). Estudis tridimensionals de relacions quantitatives estructura-activitat (3D-QSAR; de l'anglès, *3D – Quantitative Structure-Activity Relationships*) van demostrar que, efectivament, el grup funcional 3'-OH estableix ponts d'hidrogen amb el centre actiu de tots els tres transportadors concentratius de nucleòsids, hCNT1, hCNT2 i hCNT3; tot i que també és cert que el centre actiu de hCNT2 presenta més requeriments pel que fa a grups funcionals donadors de ponts d'hidrogen per part del substrat que els altres transportadors, hCNT1 i hCNT3 (Zhang *et al.*, 2003). Aquest fet dona a entendre que, precisament, el lloc d'unió a hCNT2 es caracteritza per una major abundància

de residus aminoacídics amb cadenes laterals acceptores de ponts d'hidrogen, com ara residus de treonina, serina, glutamina o asparagina.

En la interacció dels substrats amb hENT1, la distribució de la densitat electrònica en l'anell heterocíclic aromàtic de la nucleobase, tant si es tracta d'una purina com d'una pirimidina, resulta clau en la interacció entre substrat i transportador. Les següents modificacions en quant a modulació de la distribució de la densitat electrònica de l'heterocicle aromàtic de la nucleobase afavoreixen la interacció i el reconeixement del substrat per part d'hENT1: addició de grups electropositius a les posicions 2 i 7 i/o addició de grups electronegatius a les posicions 1, 2, 6 i 7 si es tracta d'una purina; o bé, addició de grups electropositius a les posicions 3 i 5 i/o addició de grups electronegatius a les posicions 3, 4 i 5 si es tracta d'una pirimidina (Vickers *et al.*, 2004).

Els requeriments estructurals per al reconeixement molecular de substrats per part dels transportadors són més restrictius per hCNT1 i hCNT2 que no pas per hCNT3 i hENT1. És destacable el fet que això és del tot coherent amb l'espectre de selectivitat i especificitat de substrat dels diversos transportadors.

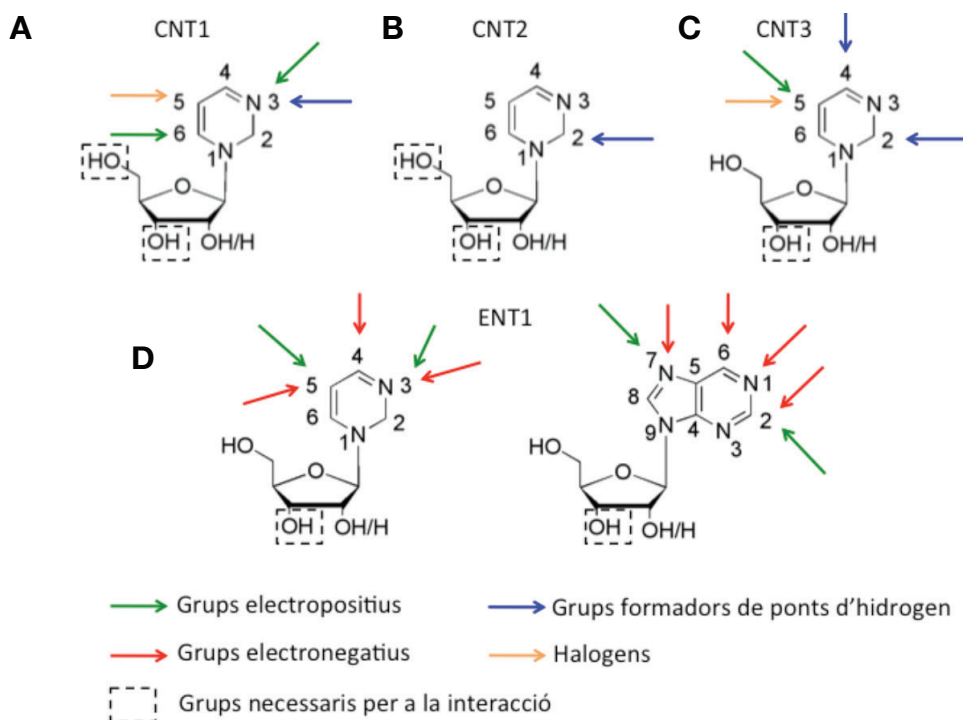


Figura 17. Determinants estructurals i farmacòfors dels substrats envers el seu reconeixement molecular per part dels transportadors de nucleòsids (Claudio Montero, Ana Maria (2012). *Estudis in vivo d'internalització cel·lular de nucleòsids fluorescents*. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona). Síntesi esquemàtica dels diversos determinants estructurals i dels farmacòfors dels substrats dels transportadors de nucleòsids **(A)** hCNT1, **(B)** hCNT2, **(C)** hCNT3 i **(D)** hENT1.

Les interaccions moleculars entre els transportadors i els seus substrats i/o inhibidors no depenen únicament de la constitució – la forma en què els diversos àtoms que componen la molècula estan entrelaçats i interconnectats entre si –, sinó que també depenen en gran mesura de la seva disposició espacial, és a dir, de la seva conformació (**Damaraju et al.**, 2011). Existeixen dos grans aspectes a nivell conformacional en termes d'interacció substrat-transportador de nucleòsids: la conformació de la pentosa (**Damaraju et al.**, 2011) i la rotació de l'enllaç N-C₁-glicosídic (**Zhu i Buolamwini**, 2008). Els sucres presenten una d'aquestes dues conformacions majoritàries: C2'-endo o Sud (S) i C3'-endo o Nord (N). Mentre que la conformació preferent per a la interacció dels substrats amb els transportadors equilibratius és la conformació C2'-endo o Sud, la conformació de la ribosa que més afavoreix la interacció del nucleòsid amb els transportadors concentratius és la conformació C3'-endo o Nord (**Damaraju et al.**, 2011). En quant a la rotació de l'enllaç N-C-glicosídic, existeixen dues conformacions possibles: la conformació *sin* i la conformació *anti*. A la conformació *sin*, la ribosa i la nucleobase tenen la mateixa orientació; per contra, a la conformació *anti*, la ribosa i la nucleobase tenen orientacions oposades (**Zhu i Buolamwini**, 2008). Si la nucleobase és pirimidínica, en la conformació *sin* l'àtom d'oxigen carbonílic de la posició 2 queda situat espacialment molt pròxim a la ribosa; per aquesta raó, la conformació *anti* afavoreix més la interacció del substrat amb hENT1 que no pas la conformació *sin* (**Zhu i Buolamwini**, 2008). Els nucleòsids naturals – especialment uridina, citidina i guanosina – interaccionen amb els transportadors amb una conformació *anti* (**Stolarski et al.**, 1980). Els transportadors de cations orgànics tenen diferents requeriments de determinants estructurals de substrat segons el transportador. El transportador hOCT1 interacciona preferentment amb substrats grans i hidrofòbics (**Zhang et al.**, 1999), i hOCT2 reconeix substrats petits i hidròfils més fàcilment (**Dresser et al.**, 2002). Això conjuntament amb el fet que hOCT1 es troba majoritàriament a fetge (**Zhang et al.**, 1999) i hOCT2 a ronyó (**Dresser et al.**, 2002), afavoreix una eliminació desigual i selectiva de fàrmacs. Existeixen dos possibilitats de farmacòfors per a la interacció amb hOCT1: un, amb tres zones hidrofòbiques i un lloc ionitzable amb càrrega positiva (**Bednarczyk et al.**, 2003); i l'altre, format per un lloc hidrofòbic, un lloc ionitzable amb càrrega positiva i un o dos llocs d'establiment de possibles ponts d'hidrogen (**Moaddel et al.**, 2005 i 2007). Pel que fa a hOCT2, el lloc d'unió a substrat està format per una regió hidrofòbica i un lloc ionitzable carregat positivament (**Zolk et al.**, 2009).

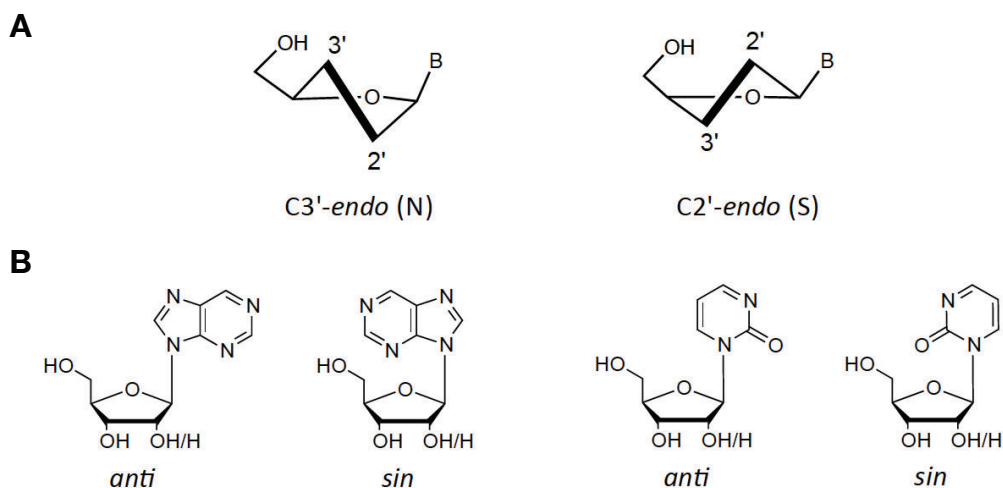


Figura 18. Possibles estructures conformacionals dels nucleòsids (Claudio Montero, Ana María (2012). *Estudis in vivo d'internalització cel·lular de nucleòsids fluorescents*. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona). Possibles conformacions dels nucleòsids a nivell de (A) l'anell de ribosa, ja sigui una conformació C3'-endo o nord (N) o C2'-endo o sud (S); i de (B) l'enllaç N-glicosídic, conformacions anti i sin.

2.5. Regulació dels transportadors de nucleòsids

Els transportadors de nucleòsids estan altament regulats per hormones i factors de creixement (Sakowicz *et al.*, 2004), nutrients (Soler *et al.*, 2001), hipòxia (Saito *et al.*, 1999; Eltzschig *et al.*, 2005) i progressió del cicle cel·lular (Valdes *et al.*, 2002). La regulació dels transportadors de nucleòsids s'exerceix més aviat sobre el nombre de transportadora, és a dir, per regulació de la seva expressió, que no pas a nivell de l'afinitat envers el substrat (Ruiz-Montasell *et al.*, 1993). La regulació dels transportadors de nucleòsids té lloc a diversos nivells: transcripcional, posttranscripcional, posttraduccional i proteica. La regulació dels transportadors de nucleòsids, de la mateixa manera que la regulació dels transportadors de membrana en general, té lloc tant a nivell transcripcional com a nivell posttranscripcional, i és específica de teixit (Delicado *et al.*, 1994; Sen *et al.*, 1996). La regulació transcripcional incideix en els nivells de mRNA dels transportadors, mentre que la regulació posttranscripcional actua sobre la traducció o sobre la proteïna, modulant aspectes de la proteïna com la localització subcel·lular, la funcionalitat o la taxa de degradació. L'expressió dels transportadors de nucleòsids i la seva corresponent regulació és essencial a l'hora d'estudiar la biodisponibilitat de fàrmacs anàlegs de nucleòsids, donat que aquesta depèn directament dels nivells d'aquestes proteïnes (Molina-Arcas *et al.*, 2008; Cano-Soldado i Pastor-Anglada, 2012). Mentre que l'expressió dels

transportadors equilibratius està lligada a la proliferació cel·lular; pel contrari, l'expressió dels transportadors concentratius està més aviat associada a processos de diferenciació cel·lular (**Molina-Arcas et al.**, 2003 i 2005). L'expressió dels transportadors de nucleòsids divergeix significativament entre teixits sans i tumors (**Gloeckner-Hofmann et al.**, 2006; **Lane et al.**, 2010).

2.5.1. Regulació transcripcional

L'expressió d'hENT1 és constitutiva i respon a estímuls proliferatius, de forma que un augment de la proliferació cel·lular sol cursar amb un augment en l'expressió d'hENT1 (**Soler et al.**, 2001a). És per aquesta raó que els nivells d'hENT1 es veuen incrementats en tumors (**Huang et al.**, 2004), un fenomen que podria estar regulat pel factor de transcripció E2F1 (**Denechaud et al.**, 2017). hENT1 no és indispensable per a la supervivència cel·lular (**Choi et al.**, 2004). Els factors de transcripció de receptors activats per proliferadors peroxisomals PPAR α i PPAR γ activen la transcripció del gen *SLC29A1*, i a més, PPAR α també regula positivament el transport d'adenosina mitjançat per hENT1 (**Montero et al.**, 2012). L'expressió transcripcional d'hENT1 també està regulada pels factors de transcripció CREB, GATA-1, Sp-1 i MAZ (proteïna de zinc associada a *myc*, de l'anglès, *myc-associated zinc protein*) (**Choi et al.**, 2000; **Abdulla i Coe**, 2007). La reducció en el transport d'adenosina mitjançat per hENT1 en resposta a elevades concentracions de glucosa sembla ser regulat a nivell del silenciament de la transcripció de *SLC29A1* (**Grden et al.**, 2008; **Puebla et al.**, 2008). L'expressió transcripcional d'hENT1 es veu silenciada en situacions d'hipòxia pel factor induïble per hipòxia 1 α (HIF-1 α), de forma que ocasiona un increment en els nivells extracel·lulars d'adenosina (**Chaudary et al.**, 2002 i 2004a; **Casanello et al.**, 2005; **Chu et al.**, 2013) com a conseqüència de la menor disponibilitat de translocació a través d'hENT1 (**Chaudary et al.**, 2004b; **Loffler et al.**, 2007), contrarestant així el fenotip d'hipòxia (**Eltzschig et al.**, 2005). L'activitat transcripcional de *SLC29A1* també és regulada negativament per òxid nítric (**Farias et al.**, 2010). El mecanisme de regulació transcripcional per hipòxia també es dona en hENT2 (**Morote-Garcia et al.**, 2009) i en hCNT2 (**Medina-Pulido et al.**, 2013). En macròfags, l'estimulació amb factor de necrosi tumoral α (TNF- α) o amb lipopolisacàrid (LPS) estimula l'expressió tant d'hCNT1 com d'hCNT2 (**Soler et al.**, 2003), així com interleucina 6 (IL-6) (**Fernandez-Veledo et al.**, 2004), interferó α (IFN- α) (**Pinilla-Macua et al.**, 2014b) i

interferó γ (IFN- γ) (Soler *et al.*, 2003), en el cas del darrer. Tot i que inicialment es creia que les hormones esteroïdals inhibien l'expressió dels transportadors i en reduïen el nombre (Fideu i Miras-Portugal, 1993) i que inhibien el transport d'adenosina mitjançant la inhibició de la triiodetironina (T_3) (Fideu i Miras-Portugal, 1992); alguns glucocorticoids, com la dexametasona, activen la transcripció dels gens *SLC28A1*, *SLC28A2* i *SLC28A3*, augmentant els nivells de les proteïnes corresponents, hCNT1, hCNT2 i hCNT3 (Aymerich *et al.*, 2004). Tot i això, aquest fet no implica que necessàriament els diversos transportadors concentratius comparteixin exactament els mateixos mecanismes d'expressió gènica (Mercader *et al.*, 1996). Per exemple, el factor de creixement tumoral β (TGF- β) (Freathy *et al.*, 2000) activa la transcripció de *SLC28A2* (hCNT2) però no la de *SLC28A1* (hCNT1) (Valdes *et al.*, 2004 i 2006). En canvi, l'activació de la transcripció de *SLC28A1* produïda pel factor de transcripció nuclear 4α d'hepatòcit (HNF4 α o NR2A1), que al seu torn està regulat pel coactivador PGC-1 α i pel corepressor SHP, té efectes només sobre els nivells d'hCNT1, ja que no regula l'expressió de *SLC28A2* ni de *SLC28A3* (Klein *et al.*, 2009). La marcada disminució de l'expressió d'hCNT1 en tumors esdevé majoritàriament mitjançant mecanismes de regulació transcripcional (Farre *et al.*, 2004; Bhutia *et al.*, 2011). A més, no només s'ha detectat el silenciament de l'expressió de *SLC28A1* (hCNT1) associat a desdiferenciació cel·lular en el marc de fenotips tumorals, com per exemple en colangiocarcinoma (Urtasun *et al.*, 2017), sinó que també disminucions en l'expressió de *SLC28A2* (hCNT2) estan associades a fenotips tumorals (Dragan *et al.*, 2000). La transcripció de *SLC28A2* està regulada per àcids biliars (Fernandez-Veledo *et al.*, 2006) i per l'acció coordinada dels factors de transcripció C/EBP α i HNF3 γ (Fernandez-Veledo *et al.*, 2007), per tant, la regulació transcripcional de hCNT2 té lloc preminentment a nivell hepàtic (Felipe *et al.*, 1997). L'expressió de hCNT3 també està associada a un major grau de diferenciació cel·lular en cèl·lules HL-60 (Ritzel *et al.*, 2001) i en monòcits diferenciats a partir de macròfags (Minuesa *et al.*, 2008). L'augment en els nivells de transportador de zinc 4 (ZNP4), codificat pel gen *SLC39A4*, produeix una activació de la via de senyalització ZEB1-integrina-JNK, que inhibeix l'expressió d'hENT1 (Leisewitz *et al.*, 2011) i alhora promou processos de tumorigènesi i d'invasió i metàstasi (Liu *et al.*, 2020). La regulació dels transportadors de nucleòsids a nivell transcripcional també és susceptible d'estar subjecta a l'acció de micro RNAs (miRNAs), com és el cas d'hENT2 (Kozomara i Griffiths-Jones, 2011). En malaltia

intestinal inflamatòria foren detectats nivells baixos d'mRNA tant d'hENT1 com d'hENT2 (Wojtal *et al.*, 2009).

2.5.2. Regulació posttranscripcional

Els transportadors de nucleòsids també estan subjectes a mecanismes de regulació posttranscripcional. *SLC29A2* o hENT2 té dues variants de *splicing* alternatiu descrites, hENT2^{HNP32} i hENT2^{HNP39}, que, a diferència de la proteïna hENT2 canònica, no localitzen a membrana plasmàtica sinó que són direccionades a membrana nuclear (Grañe-Boladeras *et al.*, 2016). En el cas de *SLC28A3* o hCNT3 existeix una variant de *splicing* alternatiu, hCNT3^{ins}, que es caracteritza per tenir una semivida ($t_{1/2}$) notablement inferior a la variant hCNT3 canònica (Errasti-Murugarren *et al.*, 2009). La proteïna hCNT1 té una isoforma generada per *splicing* alternatiu i que es troba sobre-expressada en càncer (Wang i Buolamwini, 2019).

2.5.3. Regulació posttraduccional

El transportador hENT1 és d'entre els transportadors de nucleòsids el més regulat a nivell posttraduccional. hENT1 és regulat posttraduccionalment per la concentració de substrat (Zafar *et al.*, 2016), per les proteïnes quinasa A (PKA) (Reyes *et al.*, 2011b) i C (PKC) (Coe *et al.*, 2002), per la caseïna quinasa 2 (CK2) (Bone *et al.*, 2007), per cicle cel·lular (Nivillac *et al.*, 2011) i per la concentració d'oxigen (Song *et al.*, 2017). El cicle cel·lular regula el trànsit d'hENT1 a la membrana plasmàtica i la seva degradació (Nivillac *et al.*, 2011). Pel que fa a la concentració d'oxigen, situacions d'hipòxia estimulen la degradació proteasòmica d'hENT1 (Song *et al.*, 2017). Els llocs susceptibles de fosforilació d'hENT1 es troben entre els dominis transmembrana 6 i 7 (Reyes *et al.*, 2011b); particularment, els residus fosforilables per PKA són Ser²⁶⁷, Ser²⁷¹ i Thr²⁷⁴ (Reyes *et al.*, 2011b), i els residus fosforilables per PKC són Ser²⁷⁹, Ser²⁸¹ (Hughes *et al.*, 2015) i Ser²⁸⁶ (Grañe-Boladeras *et al.*, 2019). hENT2 també és fosforilable per PKA i PKC (Blom *et al.*, 2004) caseïna quinasa 2 (CK2) (Handa *et al.*, 2001; Stolk *et al.*, 2005; Grañe-Boladeras *et al.*, 2019). hENT2 també és fosforilable per PKC i CK2 (Lu *et al.*, 2010). Tant hENT1 com hENT2 presenten llocs susceptibles de glicosilació compresos entre els dominis transmembrana 1 i 2 (Boletti *et al.*, 1997; Vickers *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2003; Bicket i Coe, 2016). En el cas d'hENT1, la glicosilació a nivell del

residu Asn⁴⁸ és essencial per al trànsit de la proteïna a membrana plasmàtica, i per a la seva oligomerització i funció (**Bicket i Coe**, 2016). Pel que fa a hENT2, la glicosilació als residus Asn⁴⁸ i Asn⁵⁷ en regula la localització a membrana plasmàtica (**Ward et al.**, 2003). El trànsit a membrana plasmàtica d'hCNT3 és promogut posttraduccionalment per àcid *all-trans*-retinoic (ATRA), mitjançant un augment dels nivells de TGF- β i senyalització via ERK1/2 (**Fernandez-Calotti i Pastor-Anglada**, 2010). Aquest fenomen de regulació del trànsit d'hCNT3 a membrana plasmàtica regulat per TGF- β via ERK1/2 és, sens dubte, determinant en termes de resposta terapèutica i sensibilitat a fludarabina (**Fernandez-Calotti et al.**, 2012). Contràriament, la proteïna RS1, coneguda per la inhibició del cotransportador de sodi i glucosa SGLT1 (**Veyhl et al.**, 2006; **Vernaleken et al.**, 2007), inhibeix el trànsit d'hCNT1, hCNT2 i hCNT3 a la membrana plasmàtica (**Errasti-Murugarren et al.**, 2012).

2.5.4. Regulació proteica

La proteïna disulfat-isomerasa A3 (PDIA3; de l'anglès, *Protein Disulfide-Isomerase A3*) o GRP58 (proteïna regulada per glucosa 58; en anglès, *Glucose-Regulated Protein 58*) (**Turano et al.**, 2011) i l'aldolasa B (**Tao et al.**, 2015) regulen directament la proteïna hCNT2 modulant-ne l'afinitat envers el substrat. Per una banda, aldolasa B activa hCNT2 i n'augmenta l'afinitat pel substrat; però d'una altra, GRP58 inhibeix hCNT2 i dona lloc a una pèrdua d'afinitat del transportador pel substrat (**Huber-Ruano et al.**, 2010). Tant la localització d'hCNT3 a la membrana plasmàtica com, en conseqüència, l'augment de la seva activitat transportadora són promogudes per la seva interacció amb galectina-4 (**Fernandez-Calotti et al.**, 2016). L'activitat d'hENT1 és susceptible de regulació proteica per calmodulina; essent hENT1, per tant, regulable per nivells de calci (**Bicket et al.**, 2016). Els transportadors hENT1 i hENT2 també són regulables per la formació d'heteròmers d'hENT1 i hENT2, el resultat de la qual és una disminució del transport mitjançat per hENT1 i un augment de l'activitat d'hENT2 (**Grane-Boladeras et al.**, 2019).

La regulació proteica dels transportadors de nucleòsids mitjançant interaccions proteïna-proteïna pot tenir un paper tan rellevant en la regulació de la seva activitat a tots els nivells que es parla de l'interactoma dels transportadors de nucleòsids. Un interactoma consisteix en una xarxa completa d'interaccions entre proteïnes amb repercussions a nivell funcional (**Sanchez et al.**, 1999; **Schwikowski et al.**, 2000). El principal

interactoma que s'ha descrit és el dels receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs) (**Sokolina et al.**, 2017).

2.5.5. Regulació purinèrgica

La regulació purinèrgica (**Abbracchio i Burnstock**, 1998; **Miras-Portugal et al.**, 1998) comprèn una sèrie de mecanismes de regulació que són rellevants en el cas dels transportadors de nucleòsids (**Tattersall et al.**, 1983). L'adenosina té una alta capacitat regulatòria sobre hCNT2 a nivell de la seva interacció i activació de receptors A₁ a nivell dels hepatòcits (**Medina-Pulido et al.**, 2013) i de receptors A₁ i A_{2A} neuronals (**Duflot et al.**, 2004). L'adenosina trifosfat (ATP) regula els transportadors hCNT2 i hCNT3 a nivell de l'activació de receptors P2Y (**Fischer et al.** 1999; **Godoy et al.**, 2014). Per aquesta raó, no només és important el metabolisme intracel·lular dels nucleòtids, en aquest cas de l'adenosina, sinó que el seu metabolisme extracel·lular també és essencial (**Zimmerman**, 2000). De fet, un dels factors que porten a la intoxicació etílica és l'activació purinèrgica exacerbada que es dona com a conseqüència de la inhibició dels transportadors de nucleòsids (**Hack i Christie**, 2003).

2.6. Aspectes dels transportadors de nucleòsids aliens a translocació

2.6.1. Biomarcadors

Els transportadors de nucleòsids representen eines útils d'avaluació de la prognosi de tractaments en tant que l'eficàcia d'aquests depèn en gran mesura de la sensibilitat o la resistència respecte els diversos fàrmacs utilitzats la biodisponibilitat i/o el mecanisme d'acció dels quals depèn, en gran mesura, d'aquestes proteïnes transportadores (**Pastor-Anglada i Perez-Torras**, 2015). Per exemple, nivells elevats d'hENT1 impliquen una major sensibilitat a gemcitabina i, per tant, una millor resposta al tractament en adenocarcinoma ductal pancreàtic (**Mori et al.**, 2007; **Perez-Torras et al.**, 2008); però pel contrari, uns nivells baixos d'hENT1 donen lloc a una resistència al tractament amb gemcitabina i una pitjor resposta terapèutica (**Spratlin et al.**, 2004; **Giovannetti et al.**, 2006b). hENT1 pot ser un bon biomarcador en els primers estadis de la malaltia de Huntington pel que respecta a la modulació dels nivells d'adenosina a sistema nerviós central (**Guitart et al.**, 2016). A més, hENT1 també pot ser un bon biomarcador de pronòstic de resposta terapèutica a citarabina, donat que

una disminució en els nivells d'hENT1 causats per una reducció de tirosina quinasa tipus-*Fms* 3 (FLT3) neutralitzen la sensibilitat al tractament de pacients amb leucèmia mieloblàstica aguda amb citarabina (**Song et al.**, 2015; **Catala et al.**, 2016). Els nivells baixos d'hCNT1 en càncers d'ovari i de cèrvix estan associats a una mala prognosi (**Farre et al.**, 2004). hCNT1 també pot servir com a marcador de prognosi del risc de recaiguda o de supervivència en pacients sotmesos a cirurgia i teràpia combinada amb ciclofosfamida, metotrexat i 5-fluorouracil (**Gloeckner-Hofmann et al.**, 2006). El transportador hENT2 s'utilitza com a biomarcador de prognosi en pacients de limfoma de cèl·lules del mantell i com a biomarcador de sensibilitat de resposta a fludarabina en pacients de leucèmia limfocítica crònica (**Pastor-Anglada et al.**, 2004; **Molina-Arcas et al.**, 2005).

2.6.2. Transceptors

El concepte de transceptors es va establir a partir de la identificació de proteïnes transportadores que activen mecanismes de senyalització cel·lular de manera independent del mecanisme de translocació de substrat (**Schwoppe et al.**, 2003; **Holsbeeks et al.**, 2004). Les proteïnes classificades com a transceptors es poden categoritzar en transceptors que retenen activitat transportadora (**Hundal i Taylor**, 2009; **Lacoste et al.**, 2012; **Tanaka et al.**, 2014) i transceptors que han perdut l'activitat transportadora (**Forsberg i Ljungdahl**, 2001). No es coneix amb certesa si existeix correspondència entre els llocs d'unió al substrat i al lligand del transceptor, en funció que aquest actui com a transportador o com a receptor (**Thevelein i Voordeckers**, 2009; **Conrad et al.**, 2014). Un exemple de transportador amb diferents llocs d'unió per diversos substrats, tot i no tractar-se d'un transceptor, és hOCT1 (**Koepsell**, 2011). Més enllà dels transportadors de nucleòsids, existeixen transceptors en el sinus d'altres famílies de transportadors, com ara el transportador d'aminoàcids LAT1-4F2hc (**Zheng et al.**, 2016) que participa en processos d'invasió i metàstasi en colangiocarcinoma (**Janpipatkul et al.**, 2014), i diversos transceptors vegetals (**Giehl i von Wiren**, 2015; **Sun i Zheng**, 2015). També està descrit un transportador, el transportador SMCT1 (de l'anglès, *Sodium-coupled MonoCarboxylate Transporter 1*), que actua com a transceptor regulant l'apoptosi mitjançant el reconeixement de survivina (**Coothankandaswamy et al.**, 2013).

Els transportadors de nucleòsids no només tenen la capacitat d'actuar com a translocadors, sinó que també poden comportar-se, en certa manera, com a receptors *per se*, podent arribar a tenir incidència en processos tumorigènics i invasius com la transició epiteli-mesènquima, migració cel·lular i regulació o desregulació del cicle cel·lular (**Kriel et al.**, 2011; **Diallinas**, 2017). Els primers transceptors foren descrits en llevats (**Hirimburegama et al.**, 1992; **Didion et al.**, 1998; **Ozcan et al.**, 1998; **Iraqi et al.**, 1999; **Klasson et al.**, 1999; **Holsbeeks et al.**, 2004) i comprenen des de transportadors d'aminoàcids (**Donaton et al.**, 2003), de glucosa (**Forsberg i Ljungdahl**, 2001) i d'uracil (**Galan et al.**, 1996) fins a transportadors de fòsfat (**Petersson et al.**, 1999), sideròfors (**Kim et al.**, 2002; **Erpapazoglou et al.**, 2008) i ions metàl·lics (**Felice et al.**, 2005). En aquest sentit, hENT1 pot actuar a nivell de promoure la transició epiteli-mesènquima en cèl·lules tubulars renals d'una forma independent del mecanisme de translocació (**Guillen-Gomez et al.**, 2012), i alhora pot prendre part en processos d'invasió i metàstasi en adenocarcinoma ductal pancreàtic (**Rhim et al.**, 2012). En canvi, un augment en l'expressió d'hCNT3 i/o hENT2, a més de conferir una major sensibilitat al tractament amb gemcitabina, també podria regular negativament la transició epiteli-mesènquima (**Zheng et al.**, 2015). Els nivells baixos de transportadors concentratius en general pot induir a una major desdiferenciació dels osteoclasts essent un factor molt rellevant en l'afavoriment de processos metastàtics, en tant que l'os és un dels nínxols premetastàtics preferents (**Katsuyama et al.**, 2016). L'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids està lligada al grau de diferenciació cel·lular (**Molina-Arcas et al.**, 2008; **Pastor-Anglada et al.**, 2008). Per això, l'expressió d'aquests transportadors es veu molt disminuïda en tumors (**del Santo et al.**, 1998; **Farre et al.**, 2004; **Mohelnikova-Duchonova et al.**, 2013). La restitució d'una proteïna hCNT1 desproveïda de capacitat translocadora en un model d'adenocarcinoma ductal pancreàtic va resultar en una reducció important del creixement tumoral mitjançant tant la modulació del cicle cel·lular com un augment de la mortalitat cel·lular, i una reducció en la migració cel·lular; ambdós efectes mitjançats a nivell de la regulació de les vies de senyalització PI₃K/AKT/mTOR i MAPK/ERK (**Perez-Torras et al.**, 2013).

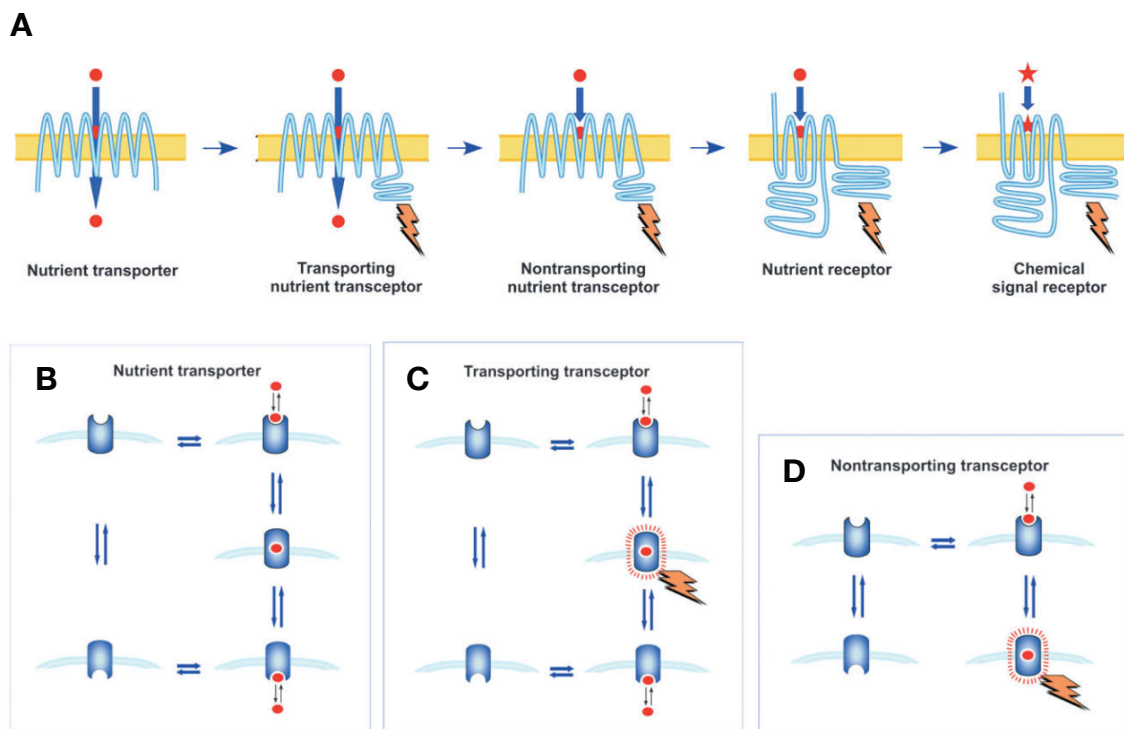


Figura 19. Transceptors (Thevelein i Voordeckers, 2009). **(A)** Aparició dels diversos tipus de transceptors com a diversos estadis evolutius a mode d'efecte col·lateral en el procés d'evolució dels transportadors de substrats als receptors de lligands. **(C i D)** Diversos tipus de transceptors corresponents als diferents graus evolutius que es reflecteixen en el **(C)** manteniment o la **(D)** pèrdua de la funció translocadora en relació al **(B)** transportador inicial.

3. Fàrmacs derivats de nucleòsids

Mitjançant modificacions químiques en els nucleòsids naturals es poden obtenir derivats farmacològicament actius que comparteixen els mateixos mecanismes de captació i metabolització (Jordheim *et al.*, 2013). Els anàlegs de nucleòsids comparteixen característiques amb els nucleòsids naturals, com ara la seva naturalesa hidròfila. És precisament per la seva hidrofília que no poden travessar la membrana plasmàtica mitjançant difusió passiva i requereixen transportadors de membrana específics per poder travessar-la i arribar al citoplasma (Katsura i Inui, 2003). Un cop internalitzats, tant els nucleòsids naturals com els derivats farmacològicament actius requereixen activació metabòlica mitjançada per enzims intracel·lulars, donant lloc a les formes fosforilades farmacològicament actives, en el cas dels darrers. Són, precisament, aquestes formes fosforilades les que poden ser incorporades al DNA i/o a l'RNA. Els fàrmacs derivats de nucleòsids poden actuar farmacològicament a nivell de la inhibició de la divisió cel·lular, de la inhibició de la replicació vírica, o bé inhibint enzims essencials tant en humans com en virus, entre els quals s'hi troben quinases, la ribonucleòtid reductasa, DNA metiltransferases, nucleòsid fosforilases i la timidilat sintasa, entre

d'altres. Els anàlegs de nucleobases i els derivats de nucleòsids s'utilitzen com a tractament de primera elecció en una gran varietat de patologies humanes: càncer (tumors sòlids i càncers hematològics), infeccions víriques (HIV, etc.) i malalties autoimmunitàries i inflamatòries, com per exemple, la colitis ulcerosa i malaltia de Crohn (Galmarini *et al.*, 2002; Jordheim *et al.*, 2013).

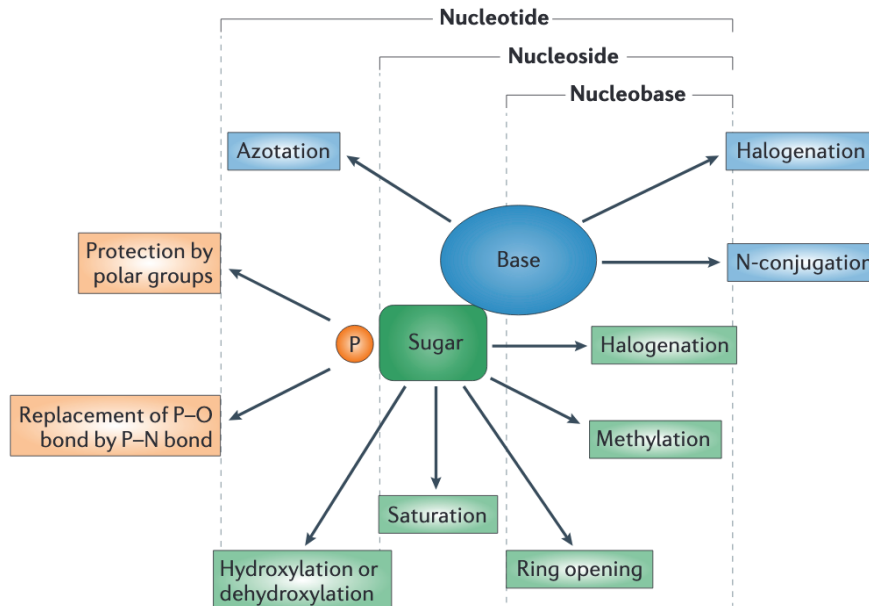


Figura 20. Fàrmacs anàlegs de nucleòsids (Jordheim *et al.*, 2013). Estructura general i modificacions químiques dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids i de nucleòtids. Les modificacions químiques poden introduir-se a nivell de la nucleobase (triazotització – addició d'un grup $-N_3$ en forma de $-N=N^+=N^-$, N -conjugació i halogenació), de la ribosa (halogenació, hidroxilació o deshidroxilació, metilació, obertura d'anell i saturació) i del fosfat en el cas dels nucleòtids (addició de grups protectors polars i substitució de l'enllaç fosfodièster – “P-O” – per un enllaç fosfamida – “P-N” –). **N** = nitrogen, **O** = oxigen, **P** = fosfat.

3.1. Mecanismes d'acció farmacològica

Els anàlegs de nucleòsids i els anàlegs de nucleòtids comparteixen les mateixes vies metabòliques que els nucleòsids naturals i els nucleòtids naturals. Tant els uns com els altres utilitzen transportadors específics i són substrats de fosforilacions successives realitzades per nucleòsid quinases, nucleòsid monofosfat quinases i per nucleòsid difosfat quinases, creatina quinasa o 3-fosfoglicerat quinasa, successivament, per acabar donant lloc a la forma trifosforilada corresponent. És precisament la forma trifosforilada la que s'acumula a les cèl·lules diana, és a dir, les cèl·lules tumorals, o bé, les cèl·lules infectades amb virus (Vivet-Boudou *et al.*, 2006).

Tant els nucleòsids monofosforilats, com els difosforilats i els trifosforilats (és a dir, tot tipus de nucleòtids), poden ser formes

farmacològicament actives. En alguns casos, aquestes formes actives inhibeixen enzims intracel·lulars, com ara polimerases i ribonucleòtid reductases (tant humanes com víriques, en ambdós casos), i en d'altres inhibeixen la síntesi de DNA o RNA mitjançant la incorporació de la molècula activa a la polimerització de la cadena corresponent, resultant en la terminació de l'elongació, l'acumulació de variacions a la seqüència o inducció de l'apoptosi (**Jordheim et al.**, 2013; **Pastor-Anglada et al.**, 1998a; **Pastor-Anglada et al.**, 2005).

3.1.1. Terminació de l'elongació de la cadena d'àcids nucleics

La terminació prematura de l'elongació de la cadena d'àcids nucleics s'assoleix farmacològicament mitjançant la utilització de 2',3'-didesoxinucleòtids. En absència de grup hidroxil a la posició 3' a l'anell de ribosa impedeix la formació de l'enllaç fosfodièster 3' – 5' entre l'anàleg incorporat i el següent nucleòtid a la seqüència, resultant així en la terminació precoç de la síntesi de la cadena de DNA o de RNA. Les polimerases víriques presenten una millor predisposició a la incorporació d'anàlegs respecte les polimerases de mamífers, donat que les primeres tenen una menor especificitat de substrat que les segones.

3.1.2. Acumulació de variacions a la seqüència

Tant 5-fluorouracil com 5-azacitidina, així com altres derivats de desoxiguanosina, són incorporats en la síntesi de la cadena de DNA o de RNA, però com a conseqüència de la presència del grup funcional a la posició 5, posseeixen una especificitat de substrat diferent en quant a l'establiment de ponts d'hidrogen es refereix. Per aquesta raó, la incorporació d'aquests anàlegs a la polimerització de la cadena resulta en una diferent complementaritat de nucleobases en l'establiment d'emparellaments correctes de parells de bases entre les cadenes complementàries, i donant lloc en última instància a variacions en la seqüència de la cadena complementària que esdevenen en el transcurs de la seva síntesi i la seva polimerització. Aquest és el mecanisme d'acció més habitual en anàlegs de nucleòsids destinats al tractament d'infeccions víriques, essent la ribavirina (**Yamamoto et al.**, 2007) un exemple representatiu d'inducció de variacions letals a la seqüència en genomes vírics (**Chevaliez et al.**, 2007; **Leysen et al.**, 2008).

3.1.3. Inducció de l'apoptosi

Els mecanismes exactes d'inducció de l'apoptosi mitjançant anàlegs de nucleòsids no són completament coneguts. En aquest mecanisme, els anàlegs de nucleòsids són habitualment administrats en combinació amb altres fàrmacs que tenen el DNA com a diana, com és el cas dels agents alquilants i els compostos de platí (*cis-platí*). Ambdós tipus de fàrmacs causen lesions al DNA i inhibeixen mecanismes de reparació del DNA (**Ewald et al.**, 2008).

3.2. Antivirals

Els anàlegs de nucleòsids són utilitzats com antivirals en teràpia de la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) (**Perez-Bercoff et al.**, 2007). Es tracta de fàrmacs inhibidors de la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa derivats de nucleòsids (**Cherry i Wesselingh**, 2003). Poden ser tant anàlegs de nucleòsids de pirimidina (zidovudina o AZT, zalcitabina o ddC, estavudina o d4T, lamivudina o 3TC, i emtricitabina o FTC) com anàlegs de nucleòsids de purina (didanosina o ddl, abacavir o ABC, entecavir, tenofovir o TDF, i ribavirina) (**Errasti-Murugarren i Pastor-Anglada**, 2010; **Tozzi**, 2010). Zidovudina o AZT és transportada pels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1 i hCNT2 i pels transportadors equilibratius de nucleòsids hENT2 i hENT3; però, en canvi, no és translocada per hENT1, transportador que precisament és inhibit per AZT (**Yao et al.**, 2001a; **Cano-Soldado et al.**, 2004; **Errasti-Murugarren et al.**, 2007; **Govindarajan et al.**, 2009). Zalcitabina, tot i tractar-se d'un anàleg de pirimidina, no és transportat pel transportador concentratiu amb preferència estructural per pirimidines hCNT1, i, no només no n'és substrat de translocació, sinó que a més hCNT1 és inhibit per zalcitabina (**Cano-Soldado et al.**, 2004). D'aquesta manera, succeeix quelcom semblant amb zalcitabina que el que succeeix amb el nucleòsid natural adenosina que – tot i tractar-se en aquest cas d'un nucleòsid de purina – s'uneix a hCNT1, però no per ser transportat sinó per inhibir el transport d'altres nucleòsids substrat d'aquest transportador (**Larrayoz et al.**, 2004). El ventall d'anàlegs que s'utilitzen per a tractaments antivirals és molt divers estructuralment, en tant que s'utilitzen tant nucleòsids com nucleòtids i nucleòsids acíclics (**De Clercq i Holy**, 2005).

3.2.1. Inhibidors de la transcriptasa inversa derivats de nucleòsids

Els inhibidors de la transcriptasa inversa o NRTIs (de l'anglès, *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*) foren els primers antiretrovirals descoberts i aprovats per al tractament de la infecció per virus de la immunodeficiència humana (**Collier et al.**, 1996). Són 2',3'-didesoxinucleòsids que competeixen amb els nucleòtids naturals fisiològics (2'-desoxinucleòtids) pel centre actiu de la polimerasa de la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, en ser convertits mitjançant fosforilació als 2',3'-didesoxinucleòtids corresponents (**Esposito et al.**, 2012). El grup funcional 3'-hidroxil de la ribosa del nucleòsid és essencial en tant que participa en el reconeixement del substrat per part del transportador (**Zhang et al.**, 2003). No obstant, també existeixen inhibidors que consten de grup 3'-hidroxil i que no cursen amb terminació de la síntesi de DNA, però que, en canvi, introdueixen variacions a la seqüència del genoma del virus de manera que en redueixen la seva capacitat infectiva (**Leysen et al.**, 2008).

Entre els anàlegs de citidina s'hi troben la lamivudina o 3TC, l'emtricitabina o FTC i la zalcitabina o ddC (2',3'-didesoxicitidina). La zalcitabina o ddC no s'utilitza actualment, degut a la seva baixa efectivitat i la seva elevada toxicitat (**Anderson et al.**, 2004). La lamivudina o 3TC i l'emtricitabina o FTC són molt similars estructuralment. Ambdós, a diferència dels nucleòsids naturals conformacionalment (b-D-nucleòsids), són b-L-nucleòsids. Tots dos requereixen activitat 2'-desoxicitidina quinasa (dCK) per a la seva activació farmacològica (**Hazen i Lanier**, 2003).

Pel que fa als anàlegs de timidina, destaquen l'azidotimidina o zidovudina o AZT i l'estavudina o d4T (2',3'-didehidro-2',3'-didesoxitimidina). Ambdós requereixen d'enzims intracel·lulars per a la seva activació, timidina quinasa 1 o 2 (TK1, TK2) (**Pressacco et al.**, 1995) i timidilat sintasa (TS) (**Rauchwerger et al.**, 2000). La zidovudina o AZT es caracteritza per un grup azida que li confereix lipofília elevada, que al seu torn en facilita la difusió passiva a través de la membrana plasmàtica (**Kline et al.**, 2009). L'estavudina o d4T no s'utilitza en clínica, per un excés d'efectes adversos (acidèmia làctica, pancreatitis, lipodistrofia i neuropatia perifèrica) (**Price et al.**, 2006).

El principal anàleg de guanosina és l'abacavir o ABC. L'abacavir o ABC segueix un mecanisme d'activació farmacològica diferent al que s'ha exposat prèviament. En primera instància, l'ABC és fosforilat per adenosina fosfotransferasa (APT) donant ABC monofosfat, essent aquest convertit a

carbovir monofosfat per desaminació mitjançant adenosina monofosfat desaminasa (AMPDA). El carbovir monofosfat és fosforilat per la guanilat quinasa (GK) per donar carbovir difosfat. En últim terme, aquest és fosforilat al metabòlit farmacològicament actiu, carbovir trifosfat, per l'enzim guanosina difosfat quinasa.

L'anàleg d'inosina tenofovir (TDF, de Tenofovir Disoproxil Fumarat) és l'únic nucleòtid inhibidor de la transcriptasa inversa aprovat per l'associació americana d'aliments i medicaments (FDA, de l'anglès *Food and Drug Administration*). El tenofovir disoproxil fumarat o TDF és un profàrmac de la forma activa trifosforilada, tenofovir. Actua com a competidor de l'adenosina 5'-monofosfat (AMP) pel centre actiu de la transcriptasa inversa, comportant-se, per tant, com un fals substrat a la reacció de retrotranscripció. En tant que és administrat directament en la seva forma monofosfat, només requereix dues fosforilacions addicionals per a la seva activació farmacològica completa. El TDF és l'antiretroviral més utilitzat.

3.2.2. Inhibidors no nucleòsids utilitzats en teràpia antiretroviral

Els inhibidors de la transcriptasa inversa no derivats de nucleòsids o NNRTIs (de l'anglès, *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*) actuen mitjançant la inhibició no competitiva de la unió del substrat al centre actiu, a nivell de la unió al·lostèrica a una cavitat a distància de 10 Å respecte el centre actiu. Els principals NNRTIs són l'efavirenz o EFZ, la nevirapina o NVP, la delavirdina o DLV, i la etravirina o ETV.

Els inhibidors de proteases inhibeixen la proteasa vírica que és la responsable de la proteòlisi de les proteïnes víriques precursors per convertir-les en proteïnes víriques madures. Aquesta és una etapa essencial en el desenvolupament de nous virions del virus de la immunodeficiència humana. Aquests inhibidors es caracteritzen per tenir una estructura d'hidroxiètilè que mimetitza la unió del pèptid substrat però sense possibilitat de ser hidrolitzat. Entre els diversos inhibidors de proteases s'hi troben: saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (INV), nelfinavir (NFV), amprenavir (AMV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATV), fosamprenavir, tipranavir (TPV) i darunavir (DRV).

Els inhibidors de la integrasa inhibeixen les dues funcions catalítiques essencials d'aquest enzim, el processament 3' i la transferència de cadena, per a la integració del material genètic del virus en el genoma de les cèl·lules infectades. Els principals inhibidors de la integrasa són raltegravir (RAL) i elvitegravir.

Els inhibidors de l'entrada del virus actuen a nivell d'una o diverses de les tres etapes del procés d'entrada del virus a la cèl·lula infectada: l'adhesió, la interacció amb el receptor i la fusió. L'enfuvirtidina inhibeix la fusió i mavaviroc inhibeix la unió a receptor.

3.2.3. Anàlegs de nucleòsids antivirals utilitzats en infeccions diferents a la infecció pel virus de la immunodeficiència humana

En el tractament de la infecció per virus de l'herpes simple s'utilitzen anàlegs de guanosina (aciclovir, famciclovir, ganciclovir) i anàlegs de timidina (brivudina). L'activació farmacològica d'aciclovir consisteix en una primera fosforilació a aciclovir monofosfat mitjançada per la timidina quinasa vírica i per successives fosforilacions per acabar resultant en la forma activa, aciclovir trifosfat, mitjançades en aquests casos per quinases cel·lulars. L'aciclovir trifosfat és substrat de la DNA polimerasa, de manera que s'incorpora l'aciclovir trifosfat a la cadena de DNA víric, resultant, per tant, en la terminació prematura de la replicació vírica. L'aciclovir també és emprat en el tractament de la infecció pel virus de la varicel·la zòster. Pel que fa a famciclovir, aquest és el profàrmac de penciclovir. El penciclovir, al seu torn, segueix el seu propi procés d'activació farmacològica a nivell d'una primera fosforilació mitjançada per la timidina quinasa vírica per donar penciclovir monofosfat, i fosforilacions subsegüents portades a terme per quinases cel·lulars, per resultar en la forma activa penciclovir trifosfat. En quant a ganciclovir, aquest és fosforilat en primer terme per la UL97 quinasa, i seguidament ganciclovir monofosfat és fosforilat successivament a ganciclovir trifosfat mitjançant quinases cel·lulars. En últim lloc, la brivudina consisteix en timidina 5'-halogenada, i també requereix d'activació a brivudina trifosfat per tal d'incorporar-se al DNA i donar lloc a la terminació de la síntesi del DNA víric (**Razonable**, 2011).

En el tractament de les infeccions per virus de l'hepatitis, s'utilitza principalment ribavirina, un anàleg de guanosina (**Crotty et al.**, 2000). El mecanisme d'acció farmacològica de ribavirina no és del tot conegut, però se sap que és un inhibidor competitiu d'enzims cel·lulars (**Crotty i Andino**, 2002). S'administra en combinació amb interferó- α tant en hepatitis A com en hepatitis B i C cròniques (**Zoulim**, 2005). En el tractament de l'hepatitis B també s'utilitza adefovir, un anàleg acíclic d'adenosina monofosfat. En el cas d'adefovir, la seva forma farmacològicament activa és adefovir difosfat, que actua a nivell de la DNA polimerasa mitjançant inhibició competitiva. No obstant, el tractament més efectiu en hepatitis B és l'entecavir. L'entecavir és un anàleg de guanosina

amb un mecanisme d'acció triple: inhibició de la iniciació de la polimerització per la DNA polimerasa vírica, inhibició de la transcripció de la cadena principal (5'→3') de DNA i inhibició de la transcripció de la cadena complementària de (3'→5') de DNA. També s'utilitza telbivudina, un anàleg de timidina que inhibeix competitivament la DNA polimerasa vírica.

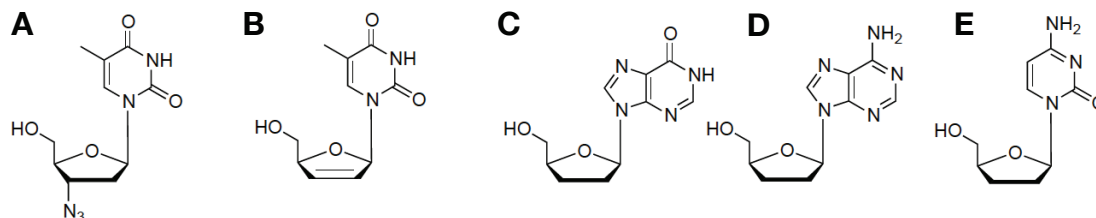


Figura 21. Fàrmacs antivirals anàlegs de nucleòsids. Estructura d'alguns fàrmacs anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpies antivirals; (A) zidovudina o AZT, (B) estavudina o d4T, (C) 2',3'-didesoxiinosina o ddl, (D) 2',3'-didesoxiadenosina o ddA i (E) 2',3'-didesoxicitidina o ddC.

3.3. Antitumorals

En teràpia del càncer existeix una variabilitat clínica molt elevada que, d'altra banda, no es correspon amb un ventall igualment ampli de mecanismes d'acció farmacològica (McGinn *et al.*, 1996). Tot i així, entre els diversos anàlegs de nucleòsids emprats en teràpia del càncer existeix un cert nivell de diversificació en quant a mecanismes d'acció es refereix (Parker, 2009). Els anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpia antitumoral es caracteritzen per una elevada toxicitat que pot ser deguda a la inhibició de la replicació i la reparació del DNA mitocondrial (Agarwal i Olivero, 1997) com a conseqüència de l'acumulació intramitocondrial de metabòlits fosforilats del fàrmac (Lewis, 2005), i als efectes nocius sobre les cèl·lules del sistema immunitari (Phillips i Munson, 1997).

3.3.1. Càncers hematològics

Entre els anàlegs de nucleòsids àmpliament utilitzats en el tractament de neoplàsies hematològiques s'hi troben fludarabina o F-ara-A, cladribina o 2-CdA (2-cloro-3'-desoxiadenosina), citarabina (ara-C) i nelarabina (ara-G) (Pastor-Anglada *et al.*, 2004; Lamba *et al.*, 2009; Robak *et al.*, 2009; Molina-Arcas *et al.*, 2013). La fludarabina o F-ara-A és un anàleg d'adenosina resistent a la desaminació per adenosina desaminasa (ADA) (Brockman *et al.*, 1977; Ross *et al.*, 1993) que és actiu tant en cèl·lules quiescents com en cèl·lules en divisió (Plunkett i Saunders, 1991). En cèl·lules en divisió, fludarabina inhibeix la síntesi i la

replicació del DNA (**Tseng et al.**, 1982) i la ribonucleòtid reductasa (**Huang et al.**, 1990; **McGinn et al.**, 1994). En cèl·lules quiescents, fludarabina inhibeix els mecanismes de reparació del DNA activant l'apoptosi mitjançada per p53 (**Stoetzer et al.**, 1999; **Pettitt et al.**, 2000) i inhibeix la síntesi de mRNA i la transcripció (**Huang et al.**, 2000). Fludarabina és captada pels transportadors equilibratius hENT1 i hENT2 (**Molina-Arcas et al.**, 2005) i pels transportadors concentratius hCNT1, hCNT2 i hCNT3 (**Tsang et al.**, 2008). En el tractament de pacients refractaris de leucèmia limfoblàstica aguda i limfoma limfoblàstic s'utilitza clofarabina (2-cloro-2'-fluoro-3'desoxiadenosina). Cladribina s'incorpora al DNA en la seva síntesi, però sense afectar a la replicació (**Lotfi et al.**, 2001). L'efecte de la cladribina té lloc a nivell de la inhibició de la ribonucleòtid reductasa (**Parker et al.**, 1991). Cladribina introdueix alteracions en la metilació dels nucleòtids en la seqüència del DNA afectant de forma crítica tant la síntesi de nucleòtids com la proliferació cel·lular (**Fabianowska-Majewska i Wyczechowska**, 1996). La cladribina és internalitzada a la cèl·lula mitjançant hENT1, hENT2 i hCNT2 (**Gerstin et al.**, 2002; **Molina-Arcas et al.**, 2005), i és més efectiva que la fludarabina (**Genini et al.**, 2000a). Clofarabina té un mecanisme d'acció dual, inhibeix la ribonucleòtid reductasa i també s'incorpora al DNA i provoca la terminació de la síntesi de DNA (**Parker et al.**, 1991). La clofarabina és fosforilable tant per dCK com per dGK, de forma que el seu mecanisme d'acció també té lloc a nivell mitocondrial (**Sjoberg et al.**, 1998). També s'utilitza en teràpia un anàleg de nucleòsid hidrosoluble, acadesina. L'acadesina actua a nivell d'activació de l'enzim AMP quinasa (AMPK) (**Aymerich et al.**, 2006) i, a més, també és responsable de la privació de nucleòtids de pirimidina de manera independent de AMP quinasa (**Bardeleben et al.**, 2013). Acadesina s'ha utilitzat en assaigs clínics per al tractament de leucèmia limfocítica crònica (**Van Den Neste et al.**, 2013). Altres anàlegs de nucleòsids de pirimidina actualment utilitzats són azacitidina, citarabina (arabinòsid de citosina o ara-C) (**Johnson**, 2001; **Wong et al.**, 2009), decitabina (5-aza-2'desoxicitidina) i zebularina (**Robak**, 2011). La citarabina o ara-C, igual que la fludarabina o F-ara-A i la nelarabina, es caracteritza pel fet de ser un arabinòsid, és a dir, té una arabinosa en lloc de la ribosa (**Wright et al.**, 2002). Els arabinòsids inhibeixen la DNA polimerasa i, per tant, la incorporació de nucleòtids a la cadena, resultant en la terminació prematura de l'elongació de la cadena de DNA (**Iwasaki et al.**, 1997; **Grant**, 1998; **Wright et al.**, 2002). Tant la citarabina com la gemcitabina impedeixen l'elongació de la síntesi de la cadena de DNA mitjançant la

terminació prematura (**Merriman et al.**, 1996; **Fowler et al.**, 2008) i confereixen al DNA sintetitzat una susceptibilitat molt major a la seva degradació (**Doyle et al.**, 2001), que acaba en la inducció dels mecanismes proapoptòtics de la cèl·lula (**Bouffard i Momparler**, 1995).

Els inhibidors de DNA metiltransferases inhibeixen la metilació del carboni 5 de la citosina que s'uneix immediatament a una guanina adjacent formant un dinucleòtid de citosina i guanina (illa CpG). Molts tumors cursen amb hipometilació generalitzada en regions d'hipermetilació localitzades en illes CpG, resultant en inactivació transcripcional, quan això esdevé en regions promotores (**Ewald et al.**, 2008). Tant la hipermetilació com la hipometilació poden ser responsables de creixement tumoral. Mentre que per una banda, la desregulació per metilació de certs gens supressors de tumors que contenen regions promotores enriquides en illes CpG resulta en una metilació del promotor que dóna lloc a la iniciació del tumor; per una altra banda, el silenciament mitjançat per hipermetilació de p15 i p16 ocasiona una pèrdua epigenètica de funció de gens supressors de tumors en càncers hematològics, càncer de mama, càncer de còlon i càncer de pulmó (**Ewald et al.**, 2008). Aproximadament un 10% de les illes CpG del DNA estan anormalment metilades en càncer (**Ahluwalia et al.**, 2001; **Yan et al.**, 2001). No obstant, el fet que siguin reversibles, en permet el seu ús com a dianes terapèutiques en càncer (**Ewald et al.**, 2008).

Tant l'azacitidina com la decitabina s'utilitzen en síndrome mielodisplàsica i en leucèmia mieloblàstica aguda. En el cas de l'azacitidina, també s'utilitza en el tractament de leucèmia mielomonocítica crònica (**Gros et al.**, 2012). A més, tots dos també són emprats en el tractament de tumors sòlids (**García-Manero**, 2012; **Ghai et al.**, 2013; **Quintas-Cardama et al.**, 2010a; **Rius i Lyko**, 2012). En el seu procés d'activació, l'azacitidina i la decitabina són transformades a les seves corresponents formes monofosfat mitjançant els enzims uridina-citidina quinasa (UCK) i desoxicitidina quinasa (dCK), respectivament. Seguidament, aquestes formes monofosfat són convertides a les formes trifosfat actives mitjançant diverses quinases cel·lulars. L'azacitidina és un anàleg de ribonucleòsid, de manera que s'incorpora preferentment a l'RNA; inhibint, per tant, la síntesi de proteïnes. Una proporció molt menor d'azacitidina, al voltant d'un 10%, és incorporada al DNA (**Li et al.**, 1970). En canvi, la decitabina és el desoxiriboanàleg de l'anàleg azacitidina, de forma que s'incorpora únicament al DNA i en cap cas a l'RNA (**Brueckner et al.**, 2007). Tant en el cas de l'azacitidina com en el de la decitabina, després de la seva incorporació, s'uneixen covalentment a DNA metiltransferases dirigint-les a la seva degradació, donant com a resultat la pèrdua passiva en la metilació

del DNA cel·lular (**Stresemann** i **Lyko**, 2008; **Bouchard** i **Momparler**, 1983). El que resulta curiós tant de l'azacitidina com de la decitabina és el fet que actuin mitjançant dos mecanismes d'acció diferents segons la dosi. Mentre que a dosis elevades ocasionen citotoxicitat i desencadenen una resposta clàssica a dany en el DNA (**Patrick et al.**, 2005), a dosis baixes cursen amb inhibició de DNA metiltransferases i reactivació de gens supressors de tumors. Tots dos són susceptibles d'inactivació farmacològica mitjançant desaminació a través de l'enzim citidina desaminasa (CDA). Per aquesta raó es va desenvolupar un altre fàrmac que no estigués subjecte a aquest mecanisme d'inactivació farmacològica, la zebularina. La zebularina és un inhibidor efectiu de DNA metiltransferases i, a més, no és tòxic i és altament estable (**Billam et al.**, 2010). La zebularina, a diferència de l'azacitidina i la decitabina, té el RNA com a diana després de ser activat per la uridina-citidina quinasa (UCK). La zebularina no és un bon substrat per a la desoxicitidina quinasa (dCK), de manera que la seva incorporació al DNA té lloc via ribonucleòtid reductasa (RNR). La zebularina no és inactivada per desaminació a través de la citidina desaminasa (CDA), més aviat tot el contrari, és un inhibidor de la CDA i, per tant, no està subjecta a inactivació (**Yoo et al.**, 2004). No obstant, tot i que en el cas dels anàlegs de nucleòsids en teràpia del càncer transformacions com la desaminació majoritàriament impliquen fenòmens de resistència al tractament, no sempre és així, donat que algun fàrmac, com per exemple és el cas de la nelarabina, requereix precisament de la seva desaminació per l'ADA per a la seva activació farmacològica (**Tsesmetzis et al.**, 2018). La nelarabina s'utilitza en el tractament de neoplàsies hematològiques i el seu mecanisme d'acció es fonamenta en la inducció de dany mitocondrial (**Cohen et al.**, 1983; **Gandhi et al.**, 1998). Existeix un altre fàrmac utilitzat en el tractament de leucèmies i diversos tumors epitelials, troxacitabina, la biodisponibilitat del qual no depèn de transportadors de nucleòsids donat que travessa la membrana plasmàtica per difusió passiva (**Gourdeau et al.**, 2001; **Alvarado et al.**, 2002).

La bendamustina no és un anàleg de nucleòsid o nucleòtid clàssic. La seva estructura està formada per un anell de benzoimidazol, que és característic de les purines, per una mostassa nitrogenada a la posició 5 i per un àcid carboxílic. Les indicacions terapèutiques de la bendamustina són la leucèmia limfocítica crònica i el limfoma no-Hodgkin de cèl·lula B indolent. El seu mecanisme d'acció antineoplàsic consisteix en l'actuació de la mostassa nitrogenada com a agent alquilant, de forma que es forma una unió covalent entre les cadenes complementàries del DNA, impedit la síntesi i la replicació de DNA, la reparació del DNA, la inhibició de punts de control de la mitosi, la

inhibició del mecanisme de reparació d'escissió de base (BER, de l'anglès *Base Excision Repair*). En conseqüència, no pot completar-se la mitosi i s'activen els mecanismes apoptòtics de la cèl·lula.

3.3.2. Tumors sòlids

Els anàlegs de nucleòsids utilitzats en tumors sòlids són principalment anàlegs de pirimidina (**Saiko et al.**, 2005; **Wong et al.**, 2009). La gemcitabina o dFdC (2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina) és un anàleg de citarabina amb dos àtoms de fluor a la posició 2', que li confereixen una major lipofília i una major eficiència de fosforilació per part de la desoxicitidina quinasa o dCK. La gemcitabina s'utilitza per al tractament de càncer de pàncrees (**Farrell et al.**, 2009; **O'Reilly**, 2009; **Perez-Torras et al.**, 2008; **Okazaki et al.**, 2010), càncer de bufeta (**O'Reilly et al.**, 2009), càncer de pulmó de cèl·lula no petita (**Oguri et al.**, 2007), càncer de mama i càncer d'ovari (**Errasti-Murugarren i Pastor-Anglada**, 2010). A més, més enllà de tumors sòlids, la gemcitabina també s'empra en algunes neoplàsies hematològiques, com ara leucèmies i limfoma no-Hodgkin (**Nabhan et al.**, 2001). A més, la gemcitabina es caracteritza per actuar amb mecanismes d'acció farmacològica alternatius segons el seu estat de fosforilació (**Heinemann et al.**, 1988). Mentre que la forma trifosforilada s'incorpora al DNA en la seva síntesi i inhibeix la DNA polimerasa, la forma difosforilada inhibeix la ribonucleòtid reductasa (**Ostruszka i Shewach**, 2003). En el cas de gemcitabina, la seva efectivitat està molt lligada als *pools* dels desoxinucleòtids dCTP, dATP i dGTP, en tant que són competidors pels mateixos llocs d'unió; de forma que l'efectivitat de la gemcitabina és inversament proporcional a les concentracions d'aquests nucleòtids (**Smid et al.**, 2001). És habitual també la utilització de combinacions de fàrmacs per tal de potenciar-ne la seva acció terapèutica i la seva efectivitat, com per exemple, les combinacions de fludarabina i citarabina (**Avramis et al.**, 1998) i de gemcitabina i cisplatí (**Mosconi et al.**, 1997). La gemcitabina és captada per les cèl·lules diana mitjançant hENT1, tot i que també els transportadors hENT2, hCNT1 i hCNT3 poden fer aquest paper (**Santini et al.**, 2011). Igual que clofarabina, la gemcitabina també té un mecanisme dual, donat que a més de promoure la terminació prematura de la síntesi de DNA, també inhibeix la ribonucleòtid reductasa (**Huang et al.**, 1995).

Les fluoropirimidines com ara el 5-fluorouracil (5FU), la 5-fluoro-5'-desoxiuridina i la 5-fluoro-2'-desoxiuridina, s'utilitzen en el tractament de càncer colorectal, càncer gàstric i càncer de mama (**Errasti-Murugarren**

i **Pastor-Anglada**, 2010; **Galmarini et al.**, 2002). En el cas concret de 5-fluorouracil o 5FU, s'utilitza el profàrmac capecitabina que pot administrar-se per via oral i és activat pel metabolisme hepàtic (**Lamont i Schilsky**, 1999; **Johnston i Kaye**, 2001). La capecitabina és hidrolitzada i desaminada per la carboxil esterasa i la citidina desaminasa, respectivament, en reaccions successives al fetge, per donar lloc a 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-dFU). Al seu torn, la 5'-desoxi-5-fluorouridina és fosforilada per l'enzim timidina fosforilasa a nivell de cèl·lules tumorals per donar el fàrmac actiu, 5-fluorouracil o 5FU (**Walko i Lindley**, 2005). 5-fluorouracil inhibeix la timidilat sintasa (TS) (**Santi et al.**, 1974) i també actua sobre la síntesi dels diversos tipus de RNA de la cèl·lula com a mecanisme d'acció farmacològica (**Longley et al.**, 2003), i s'utilitza en el tractament de càncer de mama i càncer de còlon, en ambdós casos, metastàsics. 5-fluorouracil és susceptible d'inactivació mitjançant activitat enzimàtica dihidropirimidina deshidrogenasa. Pel que fa a transportadors, mentre que 5-fluorouracil o 5FU és captat pels transportadors equilibratius de nucleòsids hENT1 i hENT2, 5'-desoxi-5-fluorouridina o floxuridina és translocada pels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hCNT3 (**Pastor-Anglada i Perez-Torras**, 2015). De fet, per la presència de l'àtom de fluor a la posició 5, té un elevat grau de lipofília que fa que aquesta molècula pugui entrar a la cèl·lula travessant la membrana plasmàtica per difusió passiva (**Wohlhueter et al.**, 1980). En canvi, no existeixen mecanismes d'entrada coneguts per a capecitabina (**Pastor-Anglada i Perez-Torras**, 2015). Generalment, els anàlegs de purina empen com a mecanismes d'entrada els transportadors concentratius de nucleòsids hCNT2 i hCNT3 i els transportadors equilibratius hENT1 i hENT2, i els anàlegs de pirimidina utilitzen els transportadors hCNT1 i hCNT3 i també, igualment, hENT1 i hENT2 (**Pastor-Anglada i Perez-Torras**, 2015).

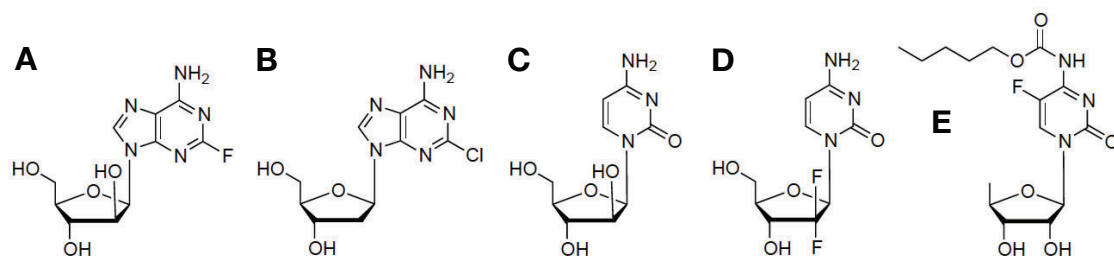


Figura 22. Fàrmacs antitumorals anàlegs de nucleòsids. Estructura d'alguns fàrmacs anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpies antitumorals; (A) fludarabina o F-ara-A, (B) cladribina o CdA, (C) citarabina o ara-C, (D) gemcitabina o dFdC i (E) capecitabina.

3.4. *Altres indicacions*

3.4.1. Immunosupressors

Les tiopurines com azatioprina, 6-mercaptopurina i 6-tioguanina s'utilitzen en el tractament de malalties reumàtiques, condicions dermatològiques, malaltia de Crohn, colitis ulcerosa (**Axelrad et al.**, 2016) i rebuig de transplantaments d'òrgans sòlids (**Longley et al.**, 2003; **Sahasranaman et al.**, 2008). La cladribina actua a nivell d'inhibició de la ribonucleòtid reductasa (RNR) i és emprada en el tractament d'esclerosi múltiple, anèmia hemolítica autoimmunitària, artritis reumàtica, lupus eritematós sistèmic, psoriasi i en pacients amb inhibidors refractaris de factor VIII (**Robak et al.**, 2006). La mizoribina és un inhibidor de la síntesi de purines i s'utilitza com agent immunosupressor en transplantament renal en humans administrat per via oral (**Mori et al.**, 2008). Tant 6-tioguanina com 6-mercaptopurina són substrats de l'enzim hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), donant lloc a tioguanosina monofosfat (TGMP) i 6-tioinosina monofosfat (TIMP), respectivament, com a productes de reacció. Al seu torn, 6-tioinosina monofosfat pot ser convertida a tioguanosina monofosfat mitjançant inosina monofosfat deshidrogenasa. La tioguanosina monofosfat (TGMP) és fosforilada a tioguanosina difosfat (TGDP) i tioguanosina trifosfat (TGTP), successivament. Aquesta última és convertida al desoxinucleòtid corresponent, tiodesoxiguanosina trifosfat (TdGTP) per la ribonucleòtid reductasa, que és el fàrmac actiu que actua a nivell de DNA (**Karran**, 2006). Tant tioguanosina monofosfat com tioinosina monofosfat són susceptibles de metilació per part de S-metiltransferases (**Karran**, 2006). Tioinosina monofosfat exerceix acció inhibidora sobre fosforibosil pirofosfat aminotransferasa (PRPP-AT), de manera que per això s'utilitza el seu precursor, 6-mercaptopurina, com inhibidor de la síntesi *de novo* d'àcids nucleics. A nivell de transportadors de nucleòsids, les tiopurines interaccionen amb els transportadors equilibratius de nucleòsids hENT1 i hENT2 en el rang de concentracions mil·limolar (mM) (**Yao et al.**, 2011).

3.4.2. Neuroprotectors i cardioprotectors

L'adenosina actua com a protector sobre dues dianes principals: les neurones i les cèl·lules cardíaques. L'adenosina exerceix aquest efecte farmacològic a dos nivells: a nivell de captació cel·lular d'adenosina i a nivell de l'activitat intracel·lular d'adenosina quinasa (ADK). L'increment de la concentració extracel·lular d'adenosina dóna lloc a l'activació de receptors d'adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 i A_4) que confereix neuroprotecció en cèl·lules neuronals per una banda, i cardioprotecció a nivell de la vasculatura per l'altra

(**Jordheim et al.**, 2013). La mimetització de l'activació per adenosina amb anàlegs d'adenosina permet tant l'activació farmacològica de receptors d'adenosina com la inhibició de transportadors de nucleòsids responsables de la internalització cel·lular d'adenosina (**Sharma et al.**, 2013).

3.4.3. Antihiperuricèmics

L'alopurinol és un isòmer estructural de l'hipoxantina que inhibeix l'enzim xantina oxidasa. S'utilitza en el tractament d'hiperuricèmia crònica o gota.

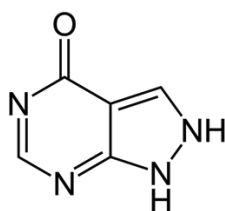


Figura 23. Alopurinol. Estructura del principal fàrmac per al tractament de la gota o antihiperuricèmic, anàleg estructural isomèric d'hipoxantina.

3.4.4. Antiparasitaris

Els fàrmacs derivats de nucleòsids també s'utilitzen en teràpia antiparasitària en les infestacions per *Plasmodium falciparum* o malària (**Quashie et al.**, 2008; **Riegelhaupt et al.**, 2010), per *Trypanosoma brucei* o tripanosomiasi africana (**Landfear**, 2010), i per *Toxoplasma gondii* o toxoplasmosi (**De Koning et al.**, 2003).

3.5. Implicacions farmacològiques dels transportadors de nucleòsids

El genoma humà codifica per més de 400 transportadors de membrana (**Hediger et al.**, 2013). Els transportadors de membrana són un factor important o determinant en farmacocinètica (**International Transporter Consortium**, 2010), principalment en quant al pas de fàrmacs a través de les diverses barreres epitelials (**Balnave et al.**, 1981; **Giacomini i Huang**, 2013). A més, transportadors com els que són codificats per les famílies gèniques *SLC* (*Solute Carrier*), també són utilitzats com a dianes terapèutiques per sé (**Lin et al.**, 2015). Pel que fa als fàrmacs que no poden ser internalitzats a l'interior de la cèl·lula ni per

mecanismes de difusió passiva o difusió facilitada a través de la membrana plasmàtica ni tampoc per transportadors de membrana, s'han desenvolupat tècniques alternatives com, per exemple, la conjugació de fàrmacs amb biopolímers (Gorzkiwicz i Klajnert-Maculewicz, 2017). Els fàrmacs derivats de nucleòsids són internalitzats principalment per hENT1, encara que també poden ser captats pels transportadors concentratius (Chow *et al.*, 2005; Hubeek *et al.*, 2005), ja sigui hCNT1 (Graham *et al.*, 2000), hCNT2 (Lang *et al.*, 2004) o hCNT3 (Huber-Ruano i Pastor-Anglada, 2009).

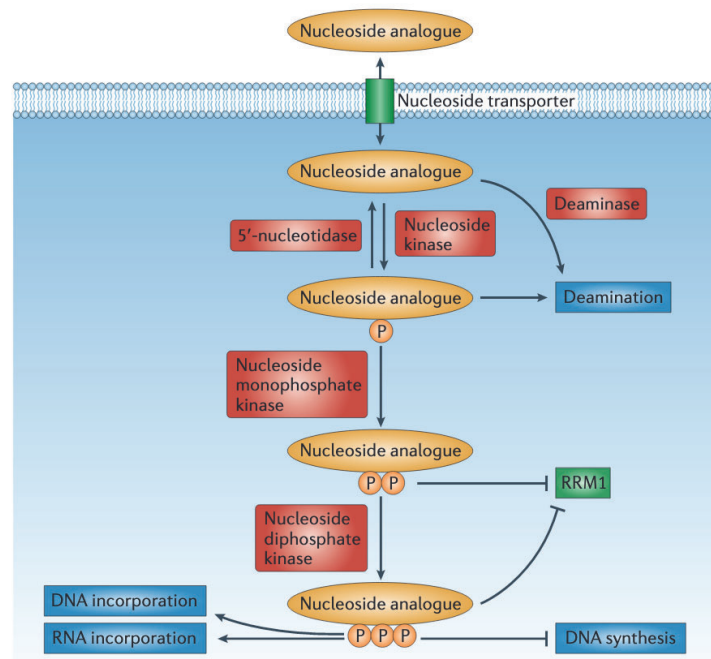


Figura 24. Activació i mecanismes d'acció dels fàrmacs derivats de nucleòsids (Jordheim *et al.*, 2013). Representació esquemàtica de la translocació dels anàlegs de nucleòsids (transportador de nucleòsids), de les diverses transformacions enzimàtiques (nucleòsida quinasa, 5'-nucleotidasa, desaminasa, nucleòsida monofosfat quinasa i nucleòsida difosfat quinasa) i els seus mecanismes d'acció farmacològica (inhibició de la síntesi de DNA, incorporació al DNA i/o a l'RNA, desaminació i inhibició de la ribonucleòtid reductasa. **RRM1** = ribonucleòtid reductasa M1).

3.5.1. Mecanismes de resistència al tractament

Els transportadors, com la majoria de les proteïnes, estan subjectes a modulació i alteració de la seva funcionalitat per part de múltiples factors que poden ser molt diversos (Nies *et al.*, 2009; Sakamoto *et al.*, 2013; Prasad *et al.*, 2014). Per tant, els transportadors de nucleòsids i la seva expressió són crucials en relació a la sensibilitat als fàrmacs derivats de nucleòsids i en l'aparició de resistències (Aran i Plagemann, 1992). Els principals mecanismes de resistència al tractament amb anàlegs de nucleòsids generalment cursen amb una disminució de la concentració

intracel·lular de fàrmac, que pot ser causada per diversos factors com ara una reducció en la captació de fàrmac per una disminució en l'expressió de transportadors, l'expressió de variants polimòrfiques que resulten en una baixa activitat dels transportadors, un augment en l'expressió de transportadors *ATP Binding Cassette* o ABC que són responsables de l'eflux de fàrmac de la cèl·lula, una disminució en els nivells d'enzims d'activació com ara quinases, o bé un augment en els nivells d'enzims de degradació del fàrmac com nucleotidases (**Galmarini et al.**, 2001). Nivells baixos o absents de transportadors de nucleòsids correlacionen amb una elevada resistència al tractament amb gemcitabina (**Mackey et al.**, 1998). Una reducció de l'activitat transportadora d'hENT1, correlaciona amb una disminució de la sensibilitat al tractament amb capecitabina (**Molina-Arcas et al.**, 2006) i amb fludarabina (**Sobrero et al.**, 1985; **Mackey et al.**, 2002), una resistència que, d'altra banda, pot ser contrarestada mitjançant la utilització d'hCNT1 per part del fàrmac (**Mata et al.**, 2001; **Garcia-Manteiga et al.**, 2003; **Cano-Soldado et al.**, 2008). La sensibilitat als tractaments amb citarabina en leucèmia mieloblàstica aguda (**Gati et al.**, 1997 i 1998; **Hubeek et al.**, 2005) i amb gemcitabina en limfomes no-Hodgkin i Hodgkin refractari es veu afectada per l'expressió i els nivells d'hENT1 (**Galmarini et al.**, 2002). L'expressió d'hENT1 també és determinant en la sensibilitat a teràpia anticancerosa en tumors sòlids, com és el cas del tractament d'adenocarcinoma ductal pancreàtic amb gemcitabina (**Spratlin et al.**, 2004; **Giovannetti et al.**, 2006b). El tractament conjunt amb anàlegs de nucleòsids i amb tamoxifè, com succeeix en els càncers de mama, pot portar a l'aparició de resistència per la inhibició del transportador equilibratiu per tamoxifè (**Cai i Lee**, 1996). Els nivells d'hENT2 són rellevants en la resposta terapèutica al tractament amb fludarabina de leucèmia limfocítica crònica (**Marce et al.**, 2006). L'activitat del transportador hCNT2 és determinant en la sensibilitat a cladribina, però no en la de fludarabina (**Lang et al.**, 2001). A part dels transportadors de nucleòsids, l'eflux de fàrmacs de la cèl·lula al medi extracel·lular per part dels transportadors de resistència a múltiples fàrmacs (MDR, de l'anglès, *MultiDrug Resistance*) (**Reid et al.**, 2003), que pertanyen a la superfamília de transportadors ABC (**Eckford i Sharom**, 2009).

Els mecanismes de resistència a fàrmacs derivats o anàlegs de nucleòsids no només són produïts pels transportadors de nucleòsids, també poden ser provocats per alteracions en enzims de les vies de recuperació i del metabolisme de nucleòtids (**Dumontet et al.**, 1999). La resistència al

tractament amb fludarabina pot venir donada per un dèficit en desoxicitidina quinasa (dCK) o en adenosina quinasa (ADK) (**Verhoef et al.**, 1981). Així mateix, una deficiència en dCK també pot ocasionar resistències a citarabina (ara-C) (**Bhalla et al.**, 1984; **Stegmann et al.**, 1993; **Gourdeau et al.**, 2001), cladribina (CdA) (**Orr et al.**, 1995), nelarabina (ara-G) (**Shewach i Mitchel**, 1986; **Curbo et al.**, 2001), gemcitabina (**Ruiz van Haperen et al.**, 1993, 1994 i 1995; **Kroep et al.**, 1998), fludarabina (**Verhoef et al.**, 1981; **Bai et al.**, 1998) i troxacitabina (**Gourdeau et al.**, 2001). La restitució de l'activitat dCK retorna la sensibilitat a citarabina i cladribina (**Hapke et al.**, 1996). La sensibilitat terapèutica a gemcitabina depèn de la ràtio entre l'activitat enzimàtica dCK i timidina quinasa 2 (TK2), de forma que la intensitat de la resposta al tractament amb gemcitabina és directament proporcional a l'activitat dCK i inversament proporcional a l'activitat TK2 (**Nielsen et al.**, 1995; **Kroep et al.**, 2002). Un dèficit en desoxiguanosina quinasa (dGK) dona lloc a resistència a fludarabina (**Lotfi et al.**, 2002). Variacions en l'activitat d'altres enzims com citidina desaminasa (**Neff i Blau**, 1996; **Eda et al.**, 1998; **Bardenheuer et al.**, 2005) i timidilat sintasa (**Johnston et al.**, 1995) també poden ser determinants en la sensibilitat a fàrmacs derivats de nucleòsids. Tant citarabina com gemcitabina són inactivades mitjançant reaccions de desaminació (**Clarke et al.**, 2002; **Giovannetti et al.**, 2008). Les reaccions de desaminació de fàrmacs derivats de nucleòsids representen un dels principals mecanismes d'inactivació i d'aparició de resistències al tractament (**Momparler et al.**, 1996; **Hanna et al.**, 1997). L'augment de l'activitat de les 5'-nucleotidases confereix resistència a anàlegs de nucleòsids de pirimidines (**Hunsucker et al.**, 2001; **Galmarini et al.**, 2003), a cladribina (**Kawasaki et al.**, 1993; **Arner et al.**, 1994) i a gemcitabina (**Dumontet et al.**, 1999; **Seve et al.**, 2005). Un augment de l'activitat ribonucleòtid reductasa genera resistència a tractaments amb derivats de nucleòsids (**Goan et al.**, 1999), especialment en el cas de la gemcitabina com a conseqüència del rol central que ocupa RNR en el seu mecanisme d'acció (**van Moorsel et al.**, 1999; **Wong et al.**, 2009). A més de les resistències aparegudes a causa d'un increment dels nivells de desoxiribonucleòtids per part de la ribonucleòtid reductasa (**Shewach et al.**, 1992), l'aparició de mutacions en el seu lloc de regulació al·lostèrica també pot ocasionar resistències (**Caras i Martin**, 1988). Les mutacions que generen alteracions en el centre actiu de les DNA polimerases també suposen l'aparició de resistències farmacològiques a anàlegs de nucleòsids (**Higashigawa et al.**, 1991). Altres possibles mecanismes de generació de resistències a la teràpia amb

4. Nucleòsids naturals no canònics o modificats epigenèticament

Des de la descoberta de l'estructura en doble hèlix del DNA (**Watson i Crick**, 1953a i 1953b), ha sigut perfectament establert que el codi genètic està format per quatre nucleobases; desoxiadenina (dA), desoxicitosina (dC), desoxiguanina (dG) i desoxitimina (dT) (**Franklin i Gosling**, 1953; **Wilkins et al.**, 1953), que es troben formant parells de bases en una proporció 1:1 (**Elson i Chargaff**, 1952) i que és el responsable de contenir tota la informació necessària que codifica per a la síntesi de les proteïnes i dels diversos elements reguladors (**Diehl i Boyle**, 2016).

4.1. 5-metildesoxicitosina / 5-metildesoxicitidina (5mdC) i nucleobases no canòniques

Més enllà de les quatre nucleobases canòniques que componen el codi genètic, es va descobrir la que va considerar-se com la “cinquena” base, la 5-metildesoxicitosina (5mdC) (**Hotchkiss**, 1948; **Wyatt i Khoo**, 1950; **Bareyt i Carell**, 2008), que és el principal regulador epigenètic (**Jaenisch i Bird**, 2003; **Cusack et al.**, 2020) encarregat de la regulació de l'expressió gènica a nivell transcripcional (**Bannister i Kouzarides**, 2011). En cèl·lules pluripotents el recanvi de 5mdC es caracteritza per ser molt actiu (**Spada et al.**, 2020). Processos com la replicació i la reparació del DNA estan associats a mutagènesi a nivell de 5mdC (**Tomkova et al.**, 2018). Sense anar més lluny, la metilació del DNA en determinats gens a teixit adipós guarda molta relació amb fenotips com la diabetis o l'obesitat (**Huang et al.**, 2019). Un altre exemple significatiu de regulació de processos a nivell de la metilació del DNA és la regulació gènica de l'apoptosi en fotoreceptors (**Farinelli et al.**, 2014). A part de la 5-metildesoxicitosina i el seu rol àmpliament descrit i caracteritzat en regulació epigenètica de l'expressió gènica, foren descobertes 3 noves bases (**Munzel et al.**, 2011a i 2011b) a cervell i en cèl·lules mare embrionàries (**Benitah et al.**, 2014; **Liu et al.**, 2015), en molt menor proporció, i que difereixen en el grau d'oxidació del carboni directament enllaçat al carboni 5 de l'heterocicle aromàtic de pirimidina de la 5-metildesoxicitosina (**Kriaucionis i Tahiliani**, 2014). Aquestes tres noves bases són 5-hidroximetildesoxicitosina (5hmdC) (**Kriaucionis i Heintz**, 2009; **Tahiliani et al.**, 2009), 5-formildesoxicitosina (5fdC) (**Pfaffeneder et al.**, 2011) i 5-hidroximetildesoxiuracil (5hmdU) (**He et al.**, 2011). Mentre que les nucleobases canòniques (dA, dC, dG i

dT) componen el codi genètic, es podria considerar que les bases no canòniques podrien formar un codi “epigenètic” encarregat principalment de la regulació transcripcional del genoma (**Booth et al., 2015; Lu et al., 2015b**). A més, tant 5-hidroximetildesoxicitosina com 5-formildesoxicitosina tenen funcions epigenètiques pròpies (**Ooi et al., 2009; Wu i Zhang, 2017**).

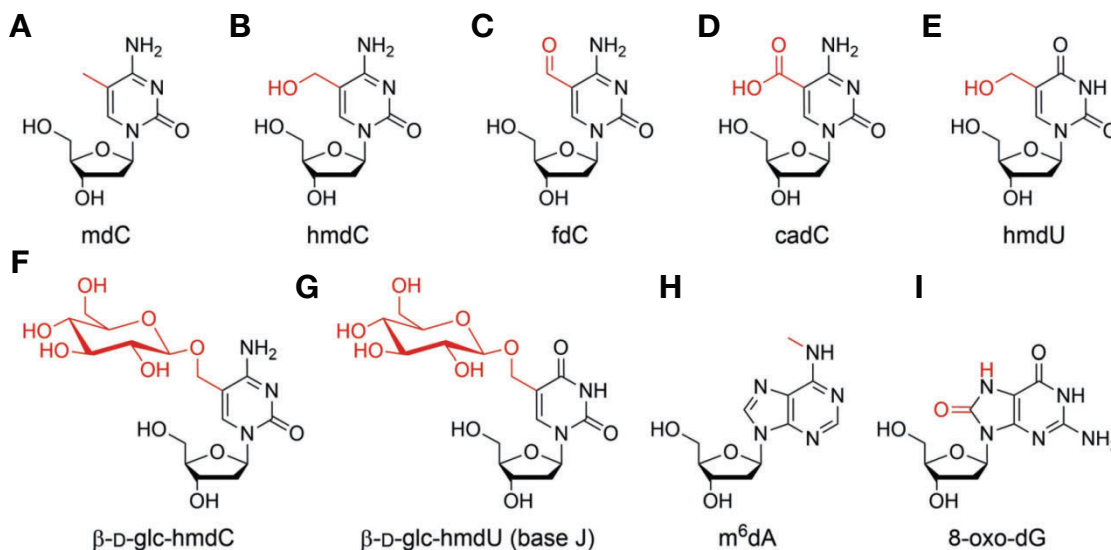


Figura 26. Nucleòsids naturals no canònics (Carell et al., 2018). Estructura dels diversos nucleòsids no canònics que es troben al DNA de forma natural; **(A)** 5-metil-2'-desoxicitidina (**mdC**), **(B)** 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (**hmdC**), **(C)** 5-formil-2'-desoxicitidina (**fdC**), **(D)** 5-carboxil-2'-desoxicitidina (**cadC**), **(E)** 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (**hmdU**), **(F)** *O*- β -*D*-glucosil-5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (**β -*D*-glc-hmdC**), **(G)** *O*- β -*D*-glucosil-5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (**β -*D*-glc-hmdU** o **base J**), **(H)** 6-metil-2'-desoxiadenosina (**m⁶dA**) i **(I)** 8-oxo-2'-desoxiguanosina (**8-oxo-dG**).

4.2. 5-hidroximetildesoxicitosina / 5-hidroximetildesoxicitidina (5hmdC)

Inicialment, donats els nivells considerablement baixos de 5-hidroximetildesoxicitosina al genoma, es va considerar que tan sols es tractaria del producte resultant de l'oxidació de 5mdC alliberat en la degradació del DNA en resposta a dany (**Zuo et al., 1995; Valinluck et al., 2004; Wagner i Cadet, 2010**). Els primers indicis de la presència de 5hmdC al DNA genòmic de forma natural (**Penn et al., 1972**) van sorgir arran de la detecció de quantitats molt significatives de 5hmdC en neurones de Purkinje (0,6%/dC) i més baixes però igualment significatives en cèl·lules granulars (0,2%/dC) i en cèl·lules desdiferenciades (0,1%/dC) (**Kriaucionis i Heintz, 2009**). La generació de 5hmdC a partir de 5mdC és portada a terme per unes oxidases dependents d'oxigen i

d' α -cetoglutarat denominades TET (de l'anglès, *Ten-to-Eleven Translocation*) (Ito et al., 2010; Schroder et al., 2016). Existeixen tres ortòlegs de les proteïnes TET; TET1 (Mulholland et al., 2020b), TET2 (Chen et al., 2014) i TET3 (Hajkova et al., 2010). L'enzim TET1 s'expressa en nivells elevats al blastocist i en cèl·lules germinals primordials i, en quantitats molt menors, en cèl·lules somàtiques (Zhang et al., 2016). La pèrdua de TET1 ocasiona una reducció en l'espermatogònia i un menor grau de diferenciació en cèl·lules germinals (Huang et al., 2020). Els enzims TET2 i TET3 es troben àmpliament distribuïts en una gran quantitat de teixits i en diversos estadis del desenvolupament (Gu et al., 2011; Wossidlo et al., 2011). L'aparició de mutacions en TET2 ocasiona desordres hematològics com síndromes mielodisplàsiques (Langemeijer et al., 2009) i leucèmia mieloblàstica aguda (Shih et al., 2012). La pèrdua de TET2 pot ocasionar hipertròfia i fibrosi cardíques a través d'alteracions en la via de senyalització d'ERK (Tao et al., 2021). De fet, es coneix que la presència de 5hmdC controla l'expressió gènica en cardiomiòcits amb implicacions rellevants en hipertròfia cardíaca (Greco et al., 2016). A més, es coneix que la proteïna TET2 té una funció important a la meiosi i és rellevant en termes de fertilitat i envelliment reproductiu (Wang et al., 2020). TET3 reconeix 5cadC al DNA a nivell de dominis CXXC i té un efecte protector envers processos neurodegeneratius (Jin et al., 2016). De fet, la RNA polimerasa II reconeix 5-carboxilcitosina (5caC) mitjançant un mecanisme semblant (Xue i Xu, 2015). Les proteïnes TET no actuen soles en la catàlisi dels processos d'oxidació successius de 5mdC i la seva acció pot veure's potenciada mitjançant la cooperació amb altres proteïnes com SALL4A (Xiong et al., 2016). Les proteïnes TET no només permeten la formació de 5hmdC al DNA (Munzel et al., 2010b), sinó que també poden catalitzar la generació de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) a l'RNA (Fu et al., 2014). És més, no només pot trobar-s'hi 5hmC a l'RNA, sinó que aquest també conté 5-formilcitosina (5fC) i 5-carboxilcitosina (5caC) (Michaelides et al., 2017). 5hmdC es troba distribuïda en molts òrgans, tot i que – a diferència de 5mdC que s'expressa en nivells constants d'aproximadament 4–5%/dG a tots els teixits (Traube et al., 2019) – la seva proporció en el DNA és molt variable en funció del teixit (Globisch et al., 2010). De fet, els nivells de 5hmdC venen més determinats per l'especificitat tissular que no pas per la mateixa regulació del gen regulat en qüestió (Nestor et al., 2012). Això és d'aquesta manera per l'alta capacitat de 5hmdC de modular la unió de factors de transcripció (Lercher et al., 2014). Per exemple, la proteïna MeCP2 (de l'anglès, *Methyl-CpG binding Protein 2*) s'uneix al DNA a nivell de 5hmdC

(**Kriaucionis** i **Bird**, 2003), especialment en gens actius a sistema nerviós central (**Mellen et al.**, 2012). El cervell és l'òrgan on es detecten els nivells més elevats de 5hmdC que poden ser de fins a 1,3%/dG (**Munzel et al.**, 2010a). De fet, s'han realitzat associacions entre els nivells de 5hmdC a cervell i funcionalitat cognitiva (**Wagner et al.**, 2015). Existeix una relació inversa entre el grau de proliferació i els nivells de 5hmdC (**Gackowski et al.**, 2015), de manera que els nivells de 5hmdC són més alts en cèl·lules diferenciades i més baixos en cèl·lules desdiferenciades (**Bachman et al.**, 2014). És per aquesta raó que la presència de 5hmdC s'associa a regions gèniques amb una baixa taxa de mutagenicitat (**Tomkova et al.**, 2016).

Els nivells de 5hmdC es troben molt alterats en tumors respecte teixits sans, de forma que els nivells de 5hmdC són més baixos en la gran majoria de tumors (**Kraus et al.**, 2012; **Haffner et al.**, 2011; **Kudo et al.**, 2012; **Lian et al.**, 2012; **Yang et al.**, 2013), excepte en glioblastoma en què els nivells de 5hmdC es troben incrementats respecte cèl·lules sanes (**Takai et al.**, 2014). Per aquesta raó, es consideren les proteïnes TET com supressors de tumors (77), especialment en neoplàsies hematològiques (**Cimmino et al.**, 2015; **An et al.**, 2015; **Li et al.**, 2011; **Moran-Crusio et al.**, 2011; **Quivoron et al.**, 2011), molt particularment en leucèmia mieloblàstica aguda (**Kroeze et al.**, 2014). Arran de la mateixa lògica, els enzims isocitrat deshidrogenasa 1 i 2 (IDH1 i IDH2) es consideren oncogens, donat que l'augment de la seva activitat en tumors ocasiona un augment en la generació de 2-hidroxisuccinat que actua com a competidor directe d' α -cetoglutarat i inhibeix les proteïnes TET (**Xu et al.**, 2011), resultant en una reducció dels nivells de 5hmdC (**Figuerola et al.**, 2010; **Sasaki et al.**, 2012; **Sturm et al.**, 2012; **Turcan et al.**, 2012). En canvi, l'àcid ascòrbic o vitamina C contribueix a l'activitat dels enzims TET – mitjançant el manteniment de l'estat d'oxidació II del cofactor metàl·lic de l'enzim (Fe^{2+}) impedint-ne l'oxidació a ferro III (Fe^{3+}) – i, per tant, al manteniment o augment dels nivells de 5hmdC (**Yin et al.**, 2013; **Blaschke et al.**, 2013; **Minor et al.**, 2013). Les situacions d'hipòxia en tumors, en tant que l'activitat enzimàtica de les proteïnes TET no només depèn d' α -cetoglutarat sinó també d'oxigen, ocasionen un bloqueig de l'oxidació de 5mdC a 5hmdC, resultant en conseqüència en un bloqueig de la desmetilació de gens rellevants en el processos de tumorigènesi i/o d'invasió i metastasi (**Laukka et al.**, 2016, **Sciacovelli et al.**, 2016; **Thienpont et al.**, 2016). La presència de 5hmdC en potenciadors transcripcionals o *enhancers*

d'oncogens està associada a una major severitat clínica en càncer, especialment en mieloma múltiple (**Alberge et al.**, 2020).

4.3. 5-formildesoxicitosina / 5-formildesoxicitidina (5fdC) i 5-carboxildesoxicitosina / 5-carboxildesoxicitidina (5cadC)

Es van detectar nivells significatius de 5-formildesoxicitosina per primer cop en cèl·lules mare embrionàries mesenquimàtiques (mESCs, de l'anglès, *mesenchymal Embryonic Stem Cells*) (**Pfaffeneder et al.**, 2011) i en neurones (**Wagner et al.**, 2015; **Condliffe et al.**, 2014). Les diverses nucleobases s'obtenen a partir de les oxidacions successives del carboni enllaçat a la posició 5 de l'anell de pirimidina per part dels enzims TET1-3; de forma que de 5-metildesoxicitosina fins a 5-carboxildesoxicitosina, passant per 5-hidroximetildesoxicitosina i 5-formildesoxicitosina, totes les etapes oxidatives són catalitzades per aquests enzims (**Ito et al.**, 2011). L'enzim encarregat de reconèixer i d'hidrolitzar les bases 5fdC i 5cadC al DNA és la timina DNA glicosilasa (TDG) (**Maiti i Drohat**, 2011). Per tant, una disminució en l'activitat timina DNA glicosilasa implica un augment dels nivells de 5cadC al DNA (**He et al.**, 2011). La timina DNA glicosilasa detecta 5fdC i 5cadC mitjançant la detecció d'alteracions geomètriques estructurals generades per la seva presència a nivell del solc menor del DNA (**Dubini et al.**, 2020). En base a aquesta anormalitat estructural, els "lectors" de 5hmdC, 5fdC i 5cadC detecten aquestes bases (**Spruijt et al.**, 2013). Aquest enzim és un dels components del mecanisme de reparació del DNA d'escissió de base (BER, de l'anglès, *Base Excision Repair*) (**Kitsera et al.**, 2019); de manera que, sumat a la relació estreta d'aquest enzim amb els nivells de 5cadC, s'estableix un triangle d'interrelacions entre els mecanismes de reparació del DNA (**Carell**, 2015), l'epigenètica i els mecanismes de regulació transcripcional de l'expressió gènica (**Kitsera et al.**, 2017). 5fdC, a diferència de 5cadC, té funcions epigenètiques pròpies (**Song et al.**, 2013; **Iurlaro et al.**, 2016). Existeix una correlació entre els nivells de 5fdC a DNA (**Lu et al.**, 2015a) i la regulació epigenètica exercida tant a nivell de promotors (**Neri et al.**, 2015) com de potenciadors transcripcionals (en anglès, *enhancers*) (**Shen et al.**, 2013; **Wu et al.**, 2017). Això es dona com a conseqüència de l'elevada heterogeneïtat de la presència de 5fdC a nivell cel·lular (**Zhu et al.**, 2017). Mentre que 5fdC és considerada com una base "semipermanent" al DNA (**Brazauskas i Kriaucionis**, 2014; **Bachman et al.**, 2015; **Su et al.**, 2016); 5cadC es troba a nivells tan baixos al DNA – aproximadament una desena part dels nivells de 5fdC –

que, a diferència de 5fdC, la seva presència es considera esporàdica (**Eleftheriou et al.**, 2015; **Ramsawhook et al.**, 2017).

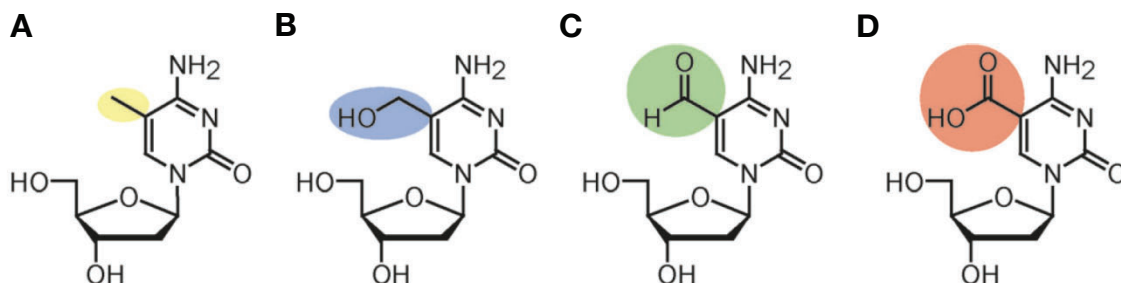


Figura 27. Nucleòsids naturals de citosina no canònics (Carell et al., 2012). Estructura dels diversos nucleòsids de citosina no canònics que es troben al DNA de forma natural ordenats de menor a major grau d'oxidació del carboni enllaçat a la posició 5 de l'heterocicle de pirimidina del nucleòsids: **(A)** 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC), grau d'oxidació 1 (**groc**); **(B)** 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5hmdC), grau d'oxidació 2 (**blau**); **(C)** 5-formil-2'-desoxicitidina (5fdC), grau d'oxidació 3 (**verd**); i **(D)** 5-carboxil-2'-desoxicitidina (5cadC), grau d'oxidació 4 (**vermell**).

4.4. 5-hidroximetildesoxiuracil / 5-hidroximetildesoxiuridina (5hmdU)

La base 5-hidroximetildesoxiuracil es troba al DNA com a conseqüència de l'oxidació de desoxitimina per part dels enzims JBP (de l'anglès, *J Binding Proteins*), que són homòlegs de les proteïnes TET (**Cliffe et al.**, 2012). Les proteïnes JBP1 i JBP2 s'encarreguen de la hidroxilació del carboni del grup metil directament enllaçat al carboni 5 de l'anell pirimidínic de la desoxitimina de forma que aquesta és convertida a 5-hidroximetildesoxiuracil com el primer pas per a la reacció següent d'O-glicosilació d'aquest hidroxil mitjançant una glicosiltransferasa (GT) per proporcionar la base O-glicosildesoxiuracil o "base J" (**Cliffe et al.**, 2012).

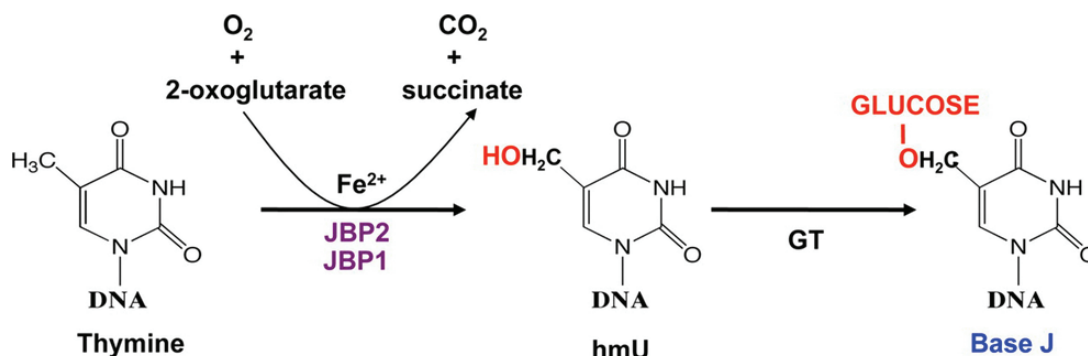


Figura 28. Oxidació de timina a 5-hidroximetiluracil i síntesi de la base J (Cliffe et al., 2012). Representació de les dues reaccions seqüencials de síntesi de base J a partir de timina, passant per l'oxidació de timina a 5-hidroximetiluracil, la primera etapa del conjunt de les dues reaccions. CO_2 = diòxid de carboni, **hmU** = 5-hidroximetiluracil, **JBP1** = proteïna d'unió a J 1 (de l'anglès, *J Binding Protein 1*), **JBP2** = proteïna d'unió a J 2 (de l'anglès, *J Binding Protein 2*), O_2 = oxigen molecular.

Els nivells elevats de 5hmdU al DNA, i sobretot els del producte de la seva oxidació, 5-formildesoxiuracil o 5fdU, són indicatius d'un alt grau d'estrès oxidatiu (**Bjelland et al.**, 1995), que resulta força tòxic especialment en cèl·lules de mamífers (**Waschke et al.**, 1975). Les bases de 5hmdU incorporades a DNA són eliminats principalment per la glicosilasa SMUG1 (**Kemmerich et al.**, 2012), que és el factor més determinant en la tolerància a toxicitat per la presència de 5hmdU al DNA (**Boorstein et al.**, 1992). En canvi, 5hmdC, a diferència de 5hmdU, no és tòxic – excepte a concentracions molt elevades –; és més, la toxicitat de 5hmdC rau en la seva desaminació a 5hmdU (**Zauri et al.**, 2015). De la mateixa manera que 5hmdC, 5fdC i 5cadC tampoc són tòxics *per se* (**Rahimoff et al.**, 2017). El tipus cel·lular en què 5hmdU és més abundant són les cèl·lules mare embrionàries mesenquimàtiques (mESCs) i s'hi troba com a resultat dels alts nivells de proteïnes tipus TET i la desaminació de desoxitimina (**Pfaffeneder et al.**, 2014; **Gontcharov et al.**, 2019). Una dieta rica en àcid ascòrbic o vitamina C resulta en un increment dels nivells de 5fdC i 5hmdU al DNA (**Chen et al.**, 2013b) i també, encara que en menor mesura per la seva saturació a baixes concentracions, de 5hmdC (**Modrzejewska et al.**, 2016).

4.5. 6-metildesoxiadenina / 6-metildesoxiadenosina (m^6dA)

La 6-metildesoxiadenina és l'única de les bases no canòniques aquí llistades que no es tracta d'una base pirimidínica, sinó púrica (**Spingardi i Kriaucionis**, 2020). La presència de m^6dA al DNA genòmic no està clara i no està establert si es tracta d'una base present al DNA de forma natural, o bé com un producte col·lateral del dany a DNA (**Zhang et al.**, 2015; **Wu et al.**, 2016). A més, es coneix que 6-metiladenina (m^6A) té capacitat reguladora a nivell de l'homeòstasi de l'RNA (**Edupuganti et al.**, 2017). No obstant, no existeixen evidències clares de la presència de m^6dA ni de 4-metildesoxicitosina (m^4dC) en cèl·lules pluripotents embrionàries de forma natural (**Schiffers et al.**, 2017).

4.6. Distribució de les bases no canòniques al DNA genòmic

La 5-hidroxiimetildesoxicitosina es troba normalment en disposició asimètrica, és a dir, tan sols en una de les dues cadenes del DNA (Yu *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015; Mooijman *et al.*, 2016). Només en aproximadament un 20% dels casos 5hmdC és present en ambdues cadenes (5hmCpG/5hmCpG) (Booth *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2016). La presència de 5hmdC a la seqüència dels gens correlaciona amb un marcat augment de l'activitat transcripcional dels gens (Szulwach *et al.*, 2011b; Khare *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). El mateix succeeix tant amb 5fdC com amb 5cadC (Song *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2013). D'altra banda, els promotors transcripcionalment actius es caracteritzen per nivells baixos de 5hmdC, 5fdC i/o 5cadC a la seqüència immediatament propera del lloc d'inici de la transcripció o TSS (de l'anglès, *Transcription Start Site*) (Pastor *et al.*, 2011; Szulwach *et al.*, 2011a). Per contra, els promotors i els potenciadors transcripcionals específics de determinats factors de transcripció es caracteritzen per una presència incrementada de 5fdC (Shen *et al.*, 2013).

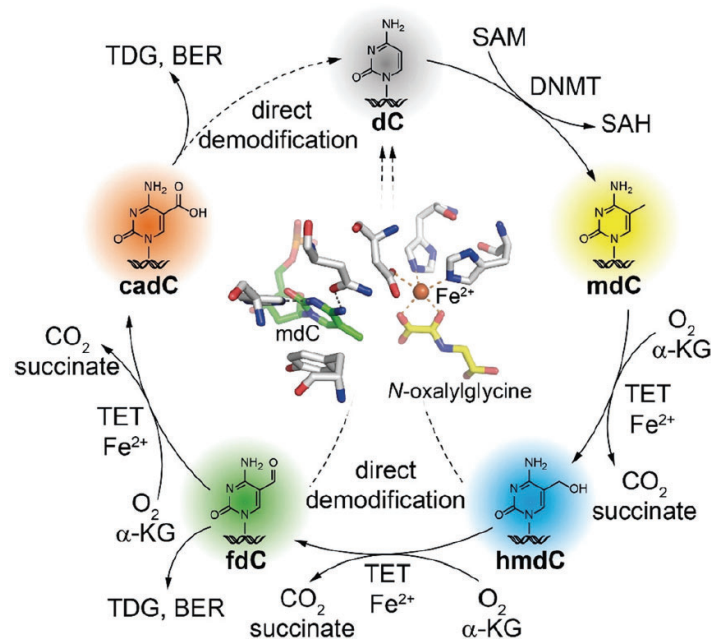


Figura 29. Cicle de metilació i desmetilació de desoxicitosina i d'oxidacions de 5mdC (Carell *et al.*, 2018). Representació esquemàtica del cicle putatiu de metilació de desoxicitosina i de desmetilació i successives oxidacions de 5-metil-2'-desoxicitosina. α -KG = α -cetoglutarat, BER = reparació per escissió de base, cadC = 5-carboxil-2'-desoxicitosina, CO₂ = diòxid de carboni, dC = 2'-desoxicitosina, DNMT = DNA metiltransferasa, fdC = 5-formil-2'-desoxicitosina, hmdC = 5-hidroxiimetil-2'-desoxicitosina, mdC = 5-metil-2'-desoxicitosina, O₂ = oxigen molecular, SAH = S-adenosilhomocisteïna, SAM = S-adenosilmetionina, TDG = timina DNA glicosilasa, TET = Ten-to-Eleven Translocation.

4.7. Funció fisiològica i mecanismes d'eliminació de bases no canòniques

Les bases no canòniques 5mdC, 5hmdC i 5fdC es troben tant en cèl·lules somàtiques com en cèl·lules desdiferenciades (**Carell et al.**, 2012), essent 5mdC la base més abundant amb molta diferència a nivell de la metilació de les illes CpG en aproximadament entre un 70% i un 80% d'aquestes illes (**Cedar i Bergman**, 2012; **Smith i Meissner**, 2013). En canvi, 5cadC es troba únicament en cèl·lules somàtiques (**Condliffe et al.**, 2014). La funció principal de 5mdC és la regulació transcripcional de l'expressió de multitud de gens, fonamentalment a nivell del reclutament de repressor transcripcionals (**Schubeler**, 2015) i de l'accessibilitat a la cromatina per part dels diversos reguladors transcripcionals (**Kriaucionis i Klose**, 2020) amb el conseqüent silenciament de l'expressió gènica (**Miranda i Jones**, 2007). Per aquesta raó, patrons aberrants de metilació del DNA ocupen un rol preponderant en processos relacions amb càncer, principalment mitjançant el silenciament de supressors de tumors (**Feinberg i Tycko**, 2007; **Sproul i Meehan**, 2013; **O'Donnell et al.**, 2014). La metilació de desoxicitosina a 5-metildesoxicitosina al DNA es portada a terme per metiltransferases dependents de S-adenosilmetionina (SAM) (**Jurkowska et al.**, 2011); DNMT1 (**Hermann et al.**, 2004; **Song et al.**, 2011), DNMT3A i DNMT3B (**Okano et al.**, 1999). DNMT1 té un paper important en la formació de la forquilla de replicació (**Bostick et al.**, 2007; **Sharif et al.**, 2007) i les metiltransferases DNMT3A i DNMT3B són essencials en el manteniment del patró de metilació del DNA (**Chen et al.**, 2003; **Jones i Liang**, 2009).

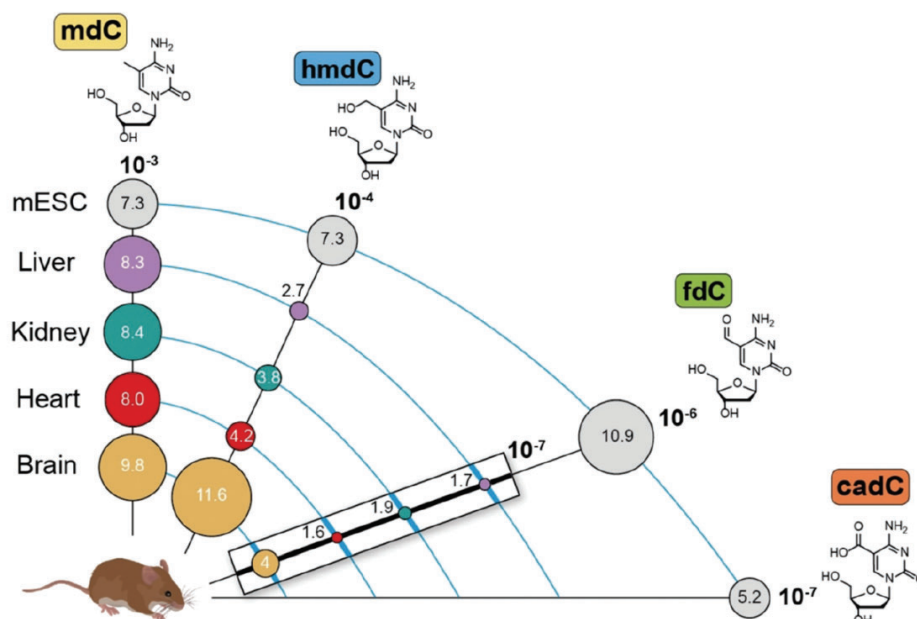


Figura 30. Distribució cel·lular i tissular dels desoxinucleòsids naturals de citosina (Carell *et al.*, 2018). Presència i proporció dels diversos desoxinucleòsids de citosina no canònics a diversos òrgans i teixits (fetge, ronyó, cor i cervell) i en cèl·lules mare embrionàries mesenquimàtiques (mESC). Els valors estan expressats en forma de nucleòsid de desoxicitosina no canònic per nucleòsid de desoxiguanosina (dncNu/dG) en forma de potències de 10. **cadC** = 5-carboxil-2'-desoxicitidina, **fdC** = 5-formil-2'-desoxicitidina, **hmdC** = 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina, **mdC** = 5-metil-2'-desoxicitidina, **mESC** = *mesenchymal Embryonic Stem Cell*, dncNu = desoxinucleòsid no canònic.

4.7.1. Desmetilació passiva

La desmetilació passiva es dona mitjançant la replicació del DNA en absència de la metiltransferasa DNMT1 (Du *et al.*, 2016), de manera que no es pot mantenir el patró de metilació establert de les illes CpG (Carell *et al.*, 2018). Aquest mecanisme de desmetilació de DNA genòmic és independent de l'oxidació del carboni metílic enllaçat a la posició 5 de l'heterocicle de pirimidina mitjançant proteïnes TET i, per tant, no implica oxidació de 5mdC (Hackett *et al.*, 2013; Kagiwada *et al.*, 2013; Seisenberger *et al.*, 2012; von Meyenn *et al.*, 2016). No només l'absència de DNMT1 pot ser responsable de processos de desmetilació passiva, sinó també la seva inhibició per part de molècules com, per exemple, 5-azadesoxicitidina (Jutterman *et al.*, 1994; Wildenhof *et al.*, 2019). D'altra banda, també és possible la desmetilació passiva no realitzada però sí regulada per proteïnes TET, una regulació que exerceixen sobre la proteïna responsable del fenomen de desmetilació, DDP3/STELLA, un marcador cel·lular de desdiferenciació i pluripotència, que impedeix el manteniment del patró de metilació del DNA en el transcurs del procés de replicació mitjançant el segrest de la proteïna E3 ubiquitina-proteïna ligasa UHRF1 (Mulholland *et al.*, 2020a).

4.7.2. Desmetilació activa

Contràriament a la desmetilació passiva, la desmetilació activa és independent de la replicació del DNA, de fet, té lloc en absència de processos replicatius (Traube i Carell, 2017). Els mecanismes moleculars de desmetilació activa consisteixen en l'oxidació del carboni del grup metil enllaçat a la posició 5 de l'anell de pirimidina de la base (Wu *et al.*, 2014). Els processos de desmetilació activa del DNA són especialment rellevants a nivell de potenciadors transcripcionals o *enhancers* (Bogdanovic *et al.*, 2016). Existeixen tres possibles mecanismes de desmetilació activa; un dependent de l'activitat timina DNA glicosilasa (TDG) i els altres dos

TDG-independents (**Bochtler et al.**, 2017). El primer mecanisme consisteix en la hidròlisi de l'enllaç glicosídic per part de TDG (**Maiti et al.**, 2013), un mecanisme propi de la reparació de DNA per escissió de base o BER (**Drohat i Coey**, 2016). La presència d'algunes lesions al DNA com la formació de 5-hidroxi-5-metilhidantoina poden inhibir TDG (**Le Bihan et al.**, 2011). L'enzim uracil DNA glicosilasa (UDG) també pot realitzar la desmetilació de DNA (**Xue et al.**, 2016). Aquest mecanisme requereix l'oxidació prèvia de 5mdC a 5hmdC. El segon mecanisme de desmetilació activa consisteix en la desformilació directa de 5fdC a dC (**Munzel et al.**, 2011a) o la descarboxilació directa de 5cadC a dC (**Wu i Zhang**, 2017). Aquest mecanisme també pot actuar sobre la deshidroximetilació de 5hmdC a dC (**Liutkeviciute et al.**, 2009), tot i que en aquest cas a diferència de la desformilació i la descarboxilació, el procés és reversible (**Chen et al.**, 2013a). En tots tres casos, el procés, curiosament, pot ser realitzat per DNA metiltransferases (DNMTs) (**Liutkeviciute et al.**, 2014). El tercer i darrer mecanisme, també TDG-independent igual que l'anterior, està basat en la desaminació de 5mdC a desoxitimina i de 5hmdC a 5hmdU (**Guo et al.**, 2011) per part de l'activitat citosina desaminasa AID/APOBEC3A (de l'anglès, *Activation-Induced Deaminase*) (**Morgan et al.**, 2004; **Schutsky et al.**, 2017). En el cas de la desaminació de 5hmdC a 5hmdU (**Schiesser et al.**, 2013), la generació d'aquesta darrera implica l'activació dels mecanismes de resposta a dany a DNA d'escissió de base (BER) i, en conseqüència, l'activació de les glicosilases SMUG1 i TDG (**Cortellino et al.**, 2011). El rol de les proteïnes TET i de TDG en la desmetilació del DNA és especialment important en invasió i metàstasi del càncer, concretament a nivell de la inducció de la reprogramació cel·lular en cèl·lules somàtiques, que resulta determinant en les transicions mesènquima-epiteli (**Hu et al.**, 2014). Recentment, també s'ha descrit algun altre mecanisme de desmetilació activa per acció de dioxigenases, com per exemple, AlkB (**Xu i Bochtler**, 2020). Aquests mecanismes de desmetilació activa regulen i controlen la gastrulació mitjançant la via de senyalització Lefty-Nodal (**Dai et al.**, 2016). Es van desenvolupar estratègies d'enginyeria genètica basades en la tecnologia CRISPR/Cas9 amb la finalitat d'assolir capacitat de desmetilació de DNA dirigida (**Xu et al.**, 2016).

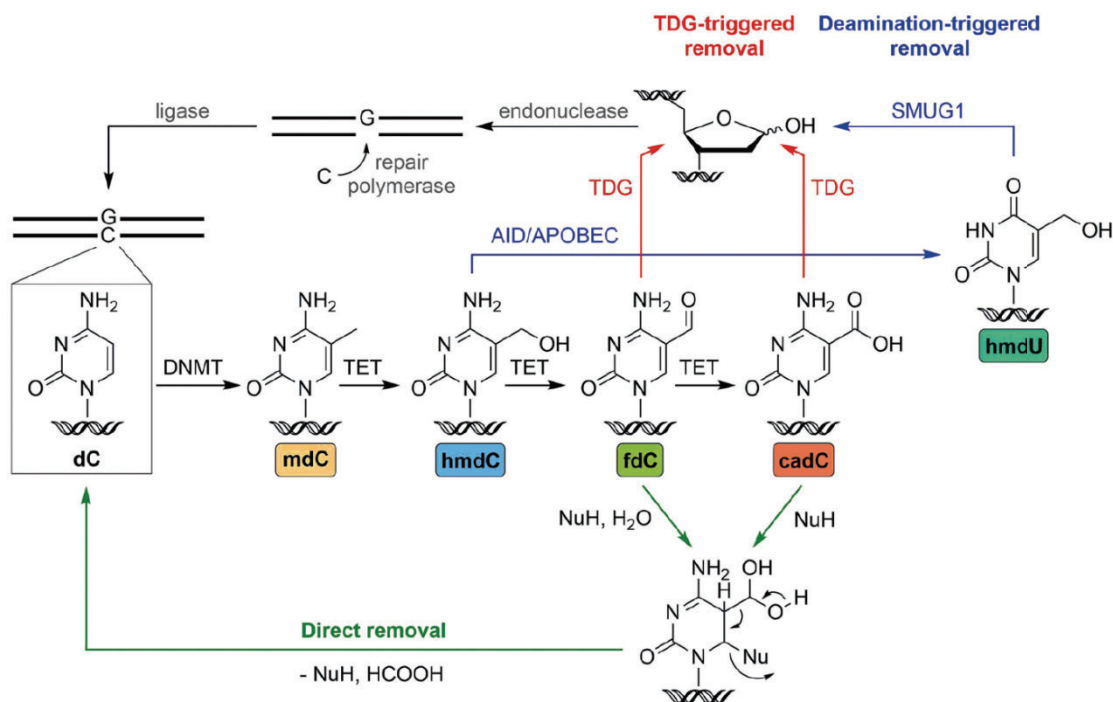


Figura 31. Mecanismes d'eliminació del grup metil de la posició 5 (Carell *et al.*, 2018). Representació esquemàtica de les diverses possibilitats d'eliminació del grup metil de la posició 5 de l'heterocicle pirimidínic de la nucleobase no canònica; (vermell i blau) per desmetilació activa, ja sigui (vermell) per timina DNA glicosilasa o (blau) per desaminació i acció de SMUG1 o bé (verd) per desformilació o descarboxilació directa. **AID/APOBEC** = *Activation Induced Deaminase / APOlipoprotein B mRNA Editing enzyme Catalytic polypeptid-like*, **cadC** = 5-carboxil-2'-desoxicitosina, **dC** = 2'-desoxicitosina, **DNMT** = DNA metiltransferasa, **fdC** = 5-formil-2'-desoxicitosina, **hmdC** = 5-hidroxi-metil-2'-desoxicitosina, **hmdU** = 5-hidroxi-metil-2'-desoxiuridina, **mdC** = 5-metil-2'-desoxicitosina, **Nu** = nucleòfil, **SMUG1** = *Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosylase 1*, **TDG** = timina DNA glicosilasa, **TET** = *Ten-to-Eleven Translocation*.

4.7.3. Desformilació i descarboxilació

Més enllà dels processos de desmetilació, també existeixen mecanismes de desformilació i descarboxilació directes (Iwan *et al.*, 2018), tot i que són molt minoritaris respecte als mecanismes de desmetilació i, com s'ha exposat prèviament, també poden classificar-se com a mecanismes de desmetilació activa del segon tipus. La desformilació directa (Schon *et al.*, 2020) és portada a terme mitjançant enzims de la superfamília del citocrom P450, concretament CYP51A1 (Hargrove *et al.*, 2011; Lepesheva *et al.*, 2008). Pel que fa a la descarboxilació (Schuesser *et al.*, 2012), aquesta és realitzada per l'enzim isoorotat descarboxilasa (IDCsa) que catalitza la conversió d'àcid isooròtic a uracil (Smiley *et al.*, 2005) i que és capaç de descarboxilar 5cadC a desoxicitosina (Xu *et al.*, 2013).

4.8. Implicacions biològiques de la bidimensionalitat del codi genètic

A nivell biològic i supramolecular, es pot dir que el codi genètic consta de dues dimensions de codificació de la informació consistents en una primera capa més estable i rígida consistent en la seqüència de nucleobases o parells de bases (dA, dC, dG i dT), coneguda com codi “genètic”; i una segona capa molt més flexible i làbil basada en la funcionalització de la posició 5 de l’anell de pirimidina de la desoxicitosina basada en diferents graus d’oxidació (dC – grau d’oxidació “0” –; 5mdC – grau d’oxidació 1 –; 5hmdC – grau d’oxidació 2 –; 5fdC – grau d’oxidació 3 –; i 5cadC – grau d’oxidació 4 –) (**Schroder et al.**, 2014; **Becker et al.**, 2018). Tot i així, això no implica necessàriament que les nucleobases 5hmdC, 5fdC i 5cadC hagin de deixar de ser considerades com a possibles lesions oxidatives del DNA, més enllà del seu paper com a reguladors epigenètics que ja està perfectament establert (**Schelter et al.**, 2021).

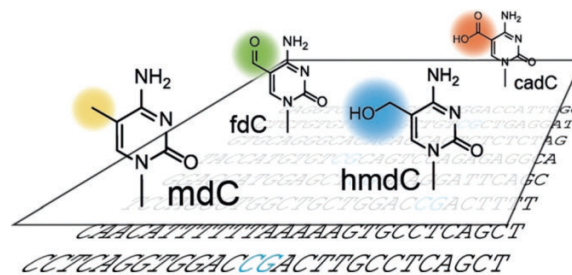


Figura 32. Estructura bidimensional del codi genètic (Carell et al., 2018). Representació gràfica de les dues capes d’informació contingudes al codi genètic-epigenètic; en què a la primera capa s’hi troba la seqüència de nucleòtids i a la segona diversos graus d’oxidació de la posició 5 de la citosina; grau 1 (**groc**), grau 2 (**blau**), grau 3 (**verd**) i grau 4 (**vermell**). **cadC** = 5-carboxil-2'-desoxicitosina, **fdC** = 5-formil-2'-desoxicitosina, **hmdC** = 5-hidroxil-2'-desoxicitosina, **mdC** = 5-metil-2'-desoxicitosina.

4.9. Potencials aplicacions terapèutiques dels nucleòsids naturals no canònics

Els nucleòsids naturals no canònics 5-hidroximetildesoxicitidina (5hmdC), 5-formildesoxicitidina (5fdC) i 5-carboximetildesoxicitidina (5cadC); igual que els seus nucleòsids d’uracil respectius, 5-hidroximetildesoxiuridina (5hmdU), 5-formildesoxiuridina (5fdU) i 5-carboxildesoxiuridina (5cadU), poden ser incorporats al DNA en el procés de síntesi i de replicació; sempre i quan es trobin en forma dels nucleòtids trifosforilats respectius, és a dir, els seus nucleòsids trifosfat (5hmdCTP, 5fdCTP, 5cadCTP, 5hmdUTP, 5fdUTP i 5cadUTP) (**Steigenberger et al.**, 2013). Es va observar com alguns d’aquests nucleòsids naturals de citosina, concretament 5hmdC i 5fdC, que no

són tòxics per si mateixos, esdevenien altament tòxics en presència d'activitat citidina desaminasa (CDA) (Zauri *et al.*, 2015). En canvi, no succeeix el mateix en administrar 5cadC (Zauri *et al.*, 2015). És la desaminació d'aquests dos nucleòsids administrats en forma lliure; és a dir, com a desoxinucleòsids (5-hidroximetil-2'-desoxicitidina i 5-formil-2'-desoxicitidina), la responsable de l'elevat grau de citotoxicitat observat per la generació dels seus respectius anàlegs d'uridina, 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5hmdU) i 5-formil-2'-desoxiuridina (5fdU) que en ser incorporats en la seva forma trifosforilada al DNA són reconeguts per la maquinària de dany i reparació de DNA i s'activen els mecanismes d'apoptosi cel·lular resultant, en última instància, en la mort de les cèl·lules que incorporen aquests nucleòsids d'uridina funcionalitzats a la posició 5 de la nucleobase (Zauri *et al.*, 2015). Els nucleòsids de citosina funcionalitzats a la posició 5 no s'incorporen al DNA perquè són reconeguts com a substrats per part de la desoxicitidina quinasa (dCK) però no per part de la citidina monofosfat quinasa 1 (CMPK1), denominada "protectora de la integritat epigenètica" – precisament perquè evitar la incorporació de nucleòsids de citidina ja modificats –, de manera que no poden ser fosforilats ni en segona ni en tercera instàncies (Zauri *et al.*, 2015). Per contra, els nucleòsids d'uridina – és a dir, els productes de la desaminació dels nucleòsids de citidina per part de CDA – sí poden ser trifosforilats seqüencialment per part de les timidina quinases 1 i 2 (TK1 i TK2), de la desoxitimidina monofosfat quinasa (DTYMK) i de les nucleòsid difosfat quinases (NDPKs), proporcionant els nucleòsids d'uridina trifosfat que sí estan disponibles per a la seva incorporació en la síntesi de DNA (Zauri *et al.*, 2015). Per tant, aquesta nova aproximació farmacològica representa una innovació triple pel que fa al seu mecanisme d'acció; en primer lloc, tan sols les cèl·lules que tinguin una sobreexpressió de CDA són susceptibles al tractament amb aquests nucleòsids conferint un alt grau de selectivitat en quant a diana terapèutica es refereix; en segon lloc, aquests nucleòsids són naturals i són produïts per l'organisme en quantitats molt menors a les que es podrien arribar a utilitzar farmacològicament de forma que serien una excel·lent eina terapèutica en tant que no són molècules estranyes a l'organisme i no serien xenobiòtics com a tals, i en tercer i últim lloc, la desaminació per CDA està clarament classificada com un mecanisme de resistència a tractaments, però en aquest cas particular, suposaria tot el contrari esdevenint el procés limitant d'activació en aquest abordatge terapèutic i que a l'hora confereix un elevat grau d'especificitat pel que fa a tractament (Zauri *et al.*, 2015).

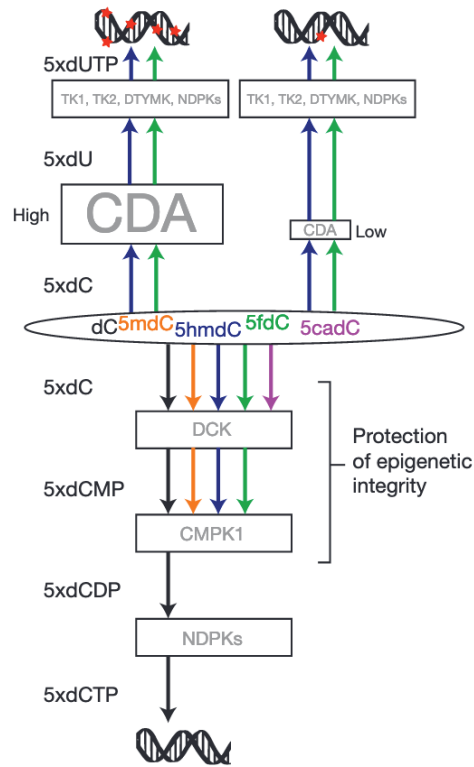


Figura 33. Utilització de la via de recuperació de nucleòsids per part dels nucleòsids epigenètics (Zauri et al., 2015). Representació esquemàtica de la utilització que fan els nucleòsids naturals no canònics o modificats epigenèticament de la via de recuperació de nucleòsids per incorporar-se (en el cas dels nucleòsids d'uracil) o no (en el cas dels nucleòsids de citosina) al DNA en la seva síntesi durant la replicació. **5cadC** = 5-carboxil-2'-desoxicitidina, **5fdC** = 5-formil-2'-desoxicitidina, **5hmdC** = 5-hidroxil-2'-desoxicitidina, **5mdC** = 5-metil-2'-desoxicitidina, **CDA** = citidina desaminasa, **CMPK1** = citidina monofosfat quinasa 1, **dC** = 2'-desoxicitidina, **DCK** = desoxicitidina quinasa, **dCMP** = desoxicitidina monofosfat, **dCDP** = desoxicitidina difosfat, **dCTP** = desoxicitidina trifosfat, **DTYMK** = desoxitimidina monofosfat quinasa, **dU** = 2'-desoxiuridina, **dUTP** = 2'-desoxiuridina trifosfat, **NDPKs** = nucleòsids difosfat quinases, **TK1** = timidina quinasa 1, **TK2** = timidina quinasa 2.

5. Ruxolitinib

El mecanisme d'acció farmacològica del Ruxolitinib consisteix en la inhibició de la via de senyalització JAK-STAT (**Quintas-Cardama et al., 2010b**), concretament, les quinases de Janus 1 (JAK1) i 2 (JAK2) (**Pellegrini i Dusanter-Fourt, 1997**). La via de senyalització JAK-STAT és fonamental en la regulació de la proliferació i creixement cel·lulars, especialment a nivell de precursors hematopoiètics i del sistema immunitari (**Kisseleva et al., 2002**).

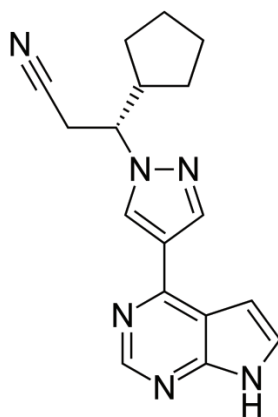


Figura 34. Ruxolitinib. Estructura molecular de l'enantiòmer (*R*) del fàrmac ruxolitinib; (*R*)-Ruxolitinib.

Aquesta via de senyalització és regulada tant per lligands extracel·lulars, com citoquines i factors de creixement (**Sasi et al., 2014**), com per reguladors intracel·lulars, com per exemple el supressor de senyalització per citoquines (SOCS, de l'anglès, *Suppressor Of Cytokine Signaling*) (**Fourouclas et al., 2008**). Les citoquines o els factors de creixement s'uneixen al receptor i produeixen l'activació de les proteïnes JAK mitjançant la dimerització del receptor corresponent. La unió de les proteïnes JAK al receptor dimeritzat dona lloc a processos d'autofosforilació tant de les pròpies proteïnes JAK com del receptor, en aquest ordre (**Kisseleva et al., 2002**). És precisament el domini intracel·lular fosforilat del receptor el que és reconegut per proteïnes activadores de la transcripció i transductores de senyal o STAT (de l'anglès, *Signal Transducer and Activator of Transcription*) que, al seu torn, són fosforilades també per JAK. La forma fosforilada de STAT és dissociada del receptor i forma homodímers que són dirigits al nucli cel·lular on regulen l'expressió gènica mitjançant la seva unió a DNA (**Vainchenker et al., 2008**). La desregulació i la sobreactivació de la via JAK-STAT (**Furqan et al., 2013**) és responsable del desenvolupament de desordres hematològics (**Delhommeau et al., 2010**), majoritàriament

neoplàsies mieloproliferatives cròniques cromosoma Filadèlfia – o Ph (de l'anglès, *Philadelphia*; t(9;22) o BCR-ABL) – negatives. Aquestes patologies comprenen policitèmia vera (càncer d'eritròcits), trombocitèmia essencial (càncer de plaquetes), leucèmia mielocítica crònica Ph negativa i mielofibrosi (càncer de precursors hematopoètics i fibrosi de medul·la òssia) (**Kralovics**, 2008). La mielofibrosi pot ser tant primària (**Tefferi**, 2014) com secundària a policitèmia vera (mielofibrosi postpolicitèmica) o a trombocitèmia essencial (mielofibrosi posttrombocitèmica). Aquestes patologies hematològiques són causades en la majoria dels casos per mutacions somàtiques en els gens *JAK2* (*JAK2*^{Val617Phe}, *JAK2*^{exó-12}) (**Kralovics et al.**, 2005; **Scott et al.**, 2007), *CALR* (*CALR*^{exó-9}) que codifica per la calreticulina (**Nangalia et al.**, 2013; **Rumi et al.**, 2014) i *MPL* (*MPL*^{Trp515Lys}) (**Pikman et al.**, 2006; **Chaligne et al.**, 2008) que codifica pel receptor de trombopoietina. Aquestes mutacions ocasionen una activació constitutiva totalment desregulada de la via de senyalització JAK–STAT, que és la responsable de l'etiopatogènia d'aquestes neoplàsies hematològiques (**Rampal et al.**, 2014). L'aparició de ruxolitinib va representar un canvi de paradigma radical en l'abordatge farmacoterapèutic d'aquests desordres (**Verstovsek**, 2009), molt especialment en pacients de mielofibrosi (**Quintas-Cardama et al.**, 2011) i pacients de formes de policitèmia vera altament resistents a altres tractaments com per exemple la hidroxiurea (**Tefferi et al.**, 2013), millorant molt considerablement tant les perspectives d'esperança de vida com el panorama de qualitat de vida d'aquests pacients hematooncològics (**Keohane et al.**, 2013).

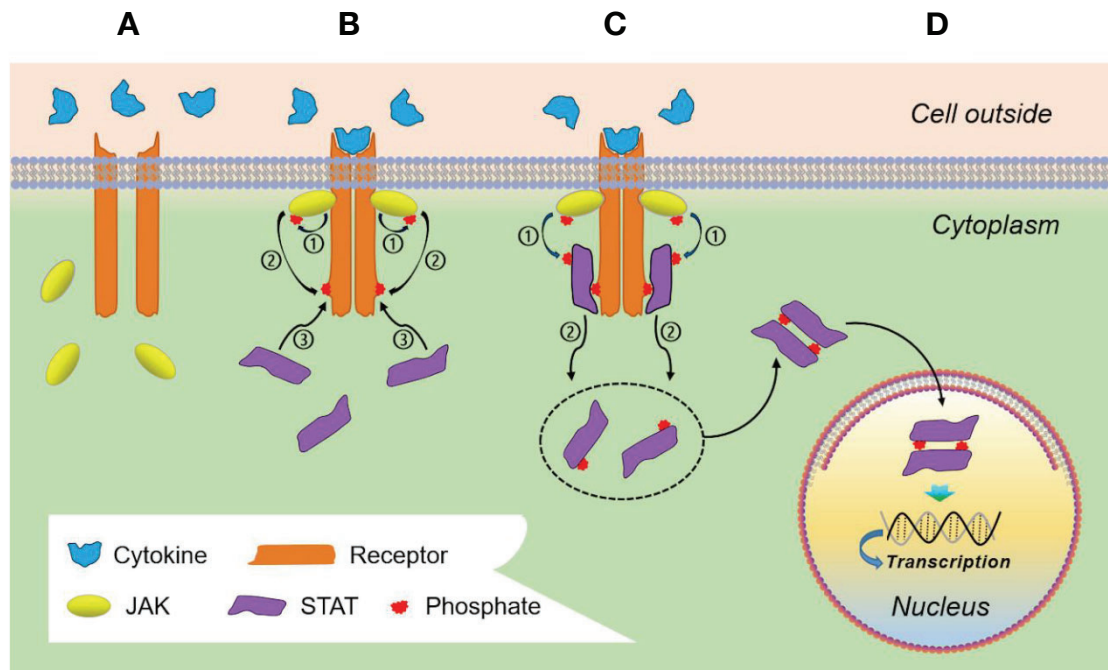
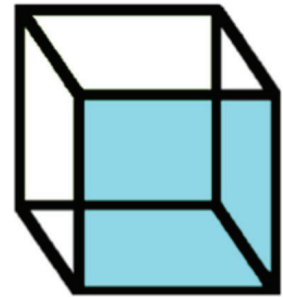


Figura 35. Via de senyalització JAK-STAT (Ou et al., 2021). Representació gràfica de les diverses etapes seqüencials d'activació i senyalització de la via JAK-STAT; **(A)** reconeixement i unió de la citoquina extracel·lular, **(B)** dimerització del receptor, unió de JAKs al domini intracel·lular del receptor, autofosforilació de JAKs i fosforilació del domini intracel·lular del receptor, **(C)** unió de STATs al domini intracel·lular fosforilat del receptor via dominis SH2, fosforilació de STATs i alliberament i dimerització de STATs, i **(D)** translocació del dímer STAT al nucli, unió al DNA i activació de la transcripció de gens diana. **JAK** = *Janus-Activated Kinase*; **STAT** = *Signal Transducer and Activator of Transcription*, SH2 = *Src Homology 2*.



Objectius

Objectius

Els nucleòsids epigenètics es mostren com una potencial opció terapèutica vàlida per càncers amb una elevada expressió de l'enzim citidina desaminasa. Aquests nucleòsids presenten dues singularitats d'elevada rellevància farmacològica: són molècules naturals que es troben a l'organisme de forma endògena i el seu mecanisme d'activació farmacològica, que al mateix temps els confereix selectivitat envers les cèl·lules diana, rau en una reacció enzimàtica que és, alhora, el principal mecanisme d'inactivació del ventall de fàrmacs antitumorals derivats de nucleòsids actualment disponible. Pel que fa al primer fet diferencial, el fet que aquests nucleòsids siguin naturals i produïts endògenament, i no xenobiòtics, els confereix un estatus important en termes de singularitat en relació a la seva condició de fàrmacs en termes de tolerància farmacològica, seguretat i toxicitat. En quant al segon aspecte, els confereix potencialment una posició estratègica preponderant en termes de l'abordatge terapèutic de tumors resistents a altres fàrmacs. Els transportadors de nucleòsids són essencials tant en la regulació homeostàtica dels nucleòsids naturals com en la biodisponibilitat dels fàrmacs derivats de nucleòsids. En tant que els nucleòsids epigenètics es presenten com molècules que, de manera inaudita, copen ambdues qualitats, els transportadors de nucleòsids esdevenen candidats clars a ser determinants i rellevants en el seu mecanisme d'acció farmacològica. Per això, es plantegen els següents objectius en el desenvolupament d'aquest treball:

1. Estudi de la interacció entre els nucleòsids naturals no canònics o "nucleòsids epigenètics" amb els transportadors de nucleòsids.
2. Identificació de vies d'entrada preferents per als nucleòsids epigenètics amb activitat farmacològica, 5hmdC i 5fdC, amb la finalitat d'explorar possibilitats terapèutiques en base al paper que puguin tenir els transportadors de nucleòsids en la seva biodisponibilitat i acció farmacològica.
3. Dissecció dels determinants estructurals i de les característiques moleculars de les interaccions entre els nucleòsids epigenètics i els transportadors de nucleòsids.

El fàrmac inhibidor de JAK quinases ruxolitinib és un fàrmac d'aprovació i utilització terapèutica relativament recent. El ruxolitinib s'utilitza en l'abordatge terapèutic d'uns tipus molt concrets de càncers hematològics, concretament les neoplàsies mieloproliferatives cromosoma Filadèlfia negatives, que comprenen la policitèmia vera, la trombocitèmia essencial i la mielofibrosi. El ruxolitinib resulta útil sobretot en el tractament de pacients de mielofibrosi, tant l'esperança de vida com la qualitat de vida dels quals s'ha vist radicalment millorada a partir de l'aparició d'aquest fàrmac. No obstant, el ruxolitinib també s'utilitza per al tractament d'altres condicions fisiopatològiques com el rebuig entre transplantament i hoste, l'alopecía androgènica, alteracions dermatològiques i, fins i tot, s'ha arribat a avaluar el seu possible paper en la prevenció o tractament de la infecció per SARS-CoV-2. En aquest treball es planteja la interacció i la relació entre el ruxolitinib i els transportadors de nucleòsids per tres raons principals: una, un fragment de l'estructura molecular del ruxolitinib és molt semblant a l'heterocicle de la hipoxantina, que és el determinant estructural bàsic dels nucleòsids de purina; dos, les principals cèl·lules diana d'aquest fàrmac són els precursors hematopoètics que es caracteritzen per la manca de síntesi *de novo* de nucleòtids i que per tant depenen en gran mesura de les vies de recuperació i, en conseqüència, dels transportadors de nucleòsids; i tres, els pocs anys d'experiència en la utilització d'aquest fàrmac fa que la seva relació amb multitud de proteïnes, entre elles els transportadors de nucleòsids, de l'organisme diferents de les seves dianes farmacològiques, JAK1 i JAK2, romanguin encara desconegudes i pendents d'estudi i d'anàlisi. Per aquests motius, es plantegen les següents fites en el desenvolupament d'aquest treball:

4. Estudi de la interacció entre el fàrmac ruxolitinib i els transportadors de nucleòsids, en base a la semblança estructural d'un fragment de la molècula de ruxolitinib amb un heterocicle purínic.
5. Anàlisi del ruxolitinib com a potencial modulador farmacològic en combinació amb fàrmacs derivats de nucleòsids i recerca de possibles sinèrgies.



Materials i Mètodes

1. Cultiu cel·lular

El cultiu cel·lular és el procés pel qual és possible el manteniment de cèl·lules fora de l'organisme al qual pertanyen (*ex vivo*) en condicions controlades (*in vitro*) preservant les seves característiques originals tant com sigui possible. L'experimentació mitjançant cèl·lules en cultiu suposa una eina molt adient per al cribratge de fàrmacs i l'estudi del seu efecte. Aquesta tècnica presenta el gran avantatge de posseir una gran consistència i una alta reproductibilitat dels resultats obtinguts, especialment quan es treballa amb cèl·lules procedents d'un mateix clon. Existeixen dos tipus de cultius cel·lulars: cultius primaris i cultius de línies cel·lulars. Els cultius primaris són aquells obtinguts directament de la disgregació d'un teixit i posseeixen una capacitat de divisió cel·lular limitada determinada pel límit de Hayflick la superació del qual implica l'entrada en senescència de les cèl·lules. En canvi, les línies cel·lulars, a diferència dels cultius primaris, es caracteritzen per una capacitat de divisió cel·lular il·limitada. No obstant, en no disposar dels mecanismes de control de la proliferació, és possible que les línies cel·lulars perdin certes propietats en el temps durant el seu manteniment en cultiu. Els cultius cel·lulars també poden classificar-se en funció de la capacitat d'adhesió de les cèl·lules en cultiu: creixement en monocapa i creixement en suspensió. Mentre que les cèl·lules procedents d'òrgans amb estructura delimitada són normalment cultivades en monocapa, les cèl·lules sanguínies solen ser cultivades en suspensió. Un dels avantatges principals del cultiu cel·lular consisteix en la possibilitat de poder mantenir un alt grau de control sobre diversos paràmetres, ja siguin fisicoquímics (temperatura, pH, proporció d'oxigen i de diòxid de carboni) o fisiològics (presència o absència de determinats nutrients i/o hormones, tractament amb fàrmacs, modificacions genètiques, etc.).

1.1. Àrea de treball

L'àrea de treball ha de ser un espai completament lliure de qualsevol possible contaminació amb microorganismes. Per aquesta raó, és totalment imprescindible treballar en condicions d'esterilitat. Per això, es treballa en campana de flux laminar prèviament esterilitzada amb llum ultraviolada i es ruixa tot el material amb etanol 70%. Tant els medis de cultiu, així com solucions i reactius han de ser estèrils, ja sigui perquè són subministrats comercialment de forma estèril o bé mitjançant autoclau o filtració amb diàmetre de porus de 0,22 µm.

1.1.1. Equipament necessari

- 1) Campana de flux laminar vertical amb filtre HEPA de nivell de bioseguretat II-A amb sistema d'esterilització amb llum ultraviolada i sistema d'aspiració mitjançant bomba de buit
- 2) Incubador de cèl·lules amb atmosfera controlada (37 °C, 5% CO₂ i 95% d'humitat relativa)
- 3) Microscopi invertit
- 4) Bany termostatitzat
- 5) Centrífuga
- 6) Frigorífic (4 °C) i congeladors (-20 °C i -80 °C)
- 7) Tanc de nitrogen líquid (N₂, l) per a criopreservació de cèl·lules
- 8) Comptadors de cèl·lules
 - a. *Countess™ Automated Cell Counter* (Invitrogen, referència C10227) i *Countess™ Cell Counting Chamber Slides* (Invitrogen, referència 10228)
 - b. Cambra de Neubauer
 - c. Blau de tripà
- 9) Material fungible
 - a. Plaques de poliestirè per a cultiu cel·lular en monocapa (60 mm i 100 mm de diàmetre)
 - b. Plaques multipou de poliestirè per a cultiu cel·lular en monocapa (24 i 96 pous)
 - c. Pipetes estèrils de 5 mL, 10 mL i 25 mL
 - d. Tubs de centrífuga (15 mL i 50 mL)
 - e. Tubs de microcentrífuga (0,5 mL; 1,5 mL i 2 mL)
 - f. Puntetes blanques (P2 i P10)
 - g. Puntetes grogues (P20, P100 i P200)
 - h. Puntetes blaves (P1000)
- 10) Micropipetes P2 (0,2 – 2 µL), P10 (1 – 10 µL), P20 (2 – 20 µL), P100 (20 – 100 µL), P200 (50 – 200 µL) i P1000 (200 – 1000 µL)
- 11) Sistema d'autoclau

1.2. *Manteniment de cèl·lules en cultiu*

Les cèl·lules es mantenen a una temperatura de 37 °C, una concentració 5% de diòxid de carboni i una humitat relativa del 95% en un incubador amb una atmosfera controlada.

1.2.1. Passatge i plaqueig

Per expandir i obtenir elevats nombres de cèl·lules i per mantenir-les en cultiu són necessaris els processos de plaqueig i de passatge, respectivament. En el cas de cèl·lules adherides, la desadhesió i la disgregació de les cèl·lules es porta a terme amb tripsina 0,05% – àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) 1×. La tripsina és una serina proteasa que trenca els enllaços de les cèl·lules amb la superfície de polilisina de la placa. L'àcid etilendiaminotetraacètic o EDTA actua com a quelant de ions calci (Ca^{2+}), necessaris per a les adhesions intercel·lulars.

1.2.1.1. Materials

1) PBS 1× (Tampó fosfat salí, de l'anglès *Phosphate Buffered Saline*)

Tampó PBS 1×	Concentració o quantitat
Clorur de sodio (NaCl)	13,7 mM
Clorur de potassi (KCl)	270 μM
Dihidrogenofosfat de potassi (KH_2PO_4)	140 μM
Hidrogenofosfat de sodi dhidratat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	430 μM
Hidròxid de sodi (NaOH) 1 M	q.s.p. pH = 7,4

Taula 3. Preparació de tampó TBS 1× per a cultiu cel·lular. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó PBS 1×.

2) Medis de cultiu

- a. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco™, referència 11995065)
 - b. RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640; Gibco™, referència 31870025)
 - c. DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12; Gibco™, referència 11330032)
- 3) Sèrum boví fetal (FBS) (Gibco™, referència 16141079)
 - 4) Antibiòtics penicil·lina–estreptomicina 5000 U mL^{-1} (Gibco™, referència 15070063)
 - 5) L-glutamina 200 mM (Gibco™, referència A2916801)
 - 6) Tripsina 0,05% – EDTA 1× (Gibco™, referència 25300062)

1.2.1.2. Procediment

Tots els reactius han de ser prèviament temperats a 37 °C, excepte PBS 1× que s'utilitza a temperatura ambient. Per a la realització del passatge de cèl·lules es porta a terme un rentat amb PBS 1× i a continuació s'aplica tripsina–EDTA per desadherir les cèl·lules de la placa i entre elles. Un cop

desadherides i disgregades, es recullen les cèl·lules en el medi de cultiu corresponent. Les cèl·lules poden ser replaquejades tant per al seu manteniment en cultiu com per a la realització d'experiments.

	Superfície (cm²)	Confluència (nombre de cèl·lules)	Volum de medi de cultiu (mL)
60 mm	20	$3,2 \times 10^6$	5
100 mm	60	$8,8 \times 10^6$	10
24 pous	2,0	$2,5 \times 10^5$	1
96 pous	0,32	$6,25 \times 10^4$	0,1

Taula 4. Suports per a cultiu cel·lular. Tipus i dimensions dels diferents suports per a cultiu cel·lular utilitzats en aquest treball.

1.2.2. Congelació, criopreservació i descongelació

Després de successius passatges, les línies cel·lulars són susceptibles d'acumular variacions genotípiques que es tradueixin en canvis fenotípics importants podent influir significativament al seu torn en els resultats experimentals obtinguts. Per aquesta raó, és habitual conservar mostres criogenitzades de les línies cel·lulars normalment a passis baixos, o almenys tan baix com sigui possible a millor conveniència, en nitrogen líquid a una temperatura de -196 °C. Per a l'adient congelació i criopreservació de cèl·lules és necessari l'ús d'agents crioprotectors com dimetilsulfòxid (DMSO).

1.2.2.1. Congelació

Es duu a terme la centrifugació de les cèl·lules prèviament tripsinitzades i recollides en medi de cultiu en tubs de 15 mL a 1200 rpm durant 4 minuts. Un cop centrifugades, es descarta el sobrenedant i es resuspèn el sediment corresponent a les cèl·lules en medi de congelació (FBS 90% i DMSO 10%) i es realitzen sengles alíquotes de 1 mL en criotubs de 2 mL. Els vials són immediatament guardats en contenidors amb isopropanol específics per a la congelació de criotubs de cèl·lules en què la temperatura disminueix 1 °C min^{-1} per a la correcta congelació de les cèl·lules que ha de ser un procés lent i gradual.

1.2.2.2. Criopreservació

El contenidor d'isopropanol amb els criotubs de cèl·lules pot emmagatzemar-se a -80 °C entre un mínim de 4 dies i un màxim d'un mes.

Posteriorment, els criotubs han de traslladar-se i conservar-se en nitrogen líquid a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ on poden romandre durant anys.

1.2.2.3. Descongelació

Així com el procés de congelació és lent i gradual, el procés de descongelació és ràpid i sobtat. Els criotubs extrets del tanc de nitrogen líquid són ràpidament descongelats en un bany a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i es transfereix immediatament el seu contingut a un tub de 15 mL amb medi de cultiu. Aquest procés ha de ser tan ràpid com sigui possible per diluir i neutralitzar el dimetilsulfòxid i evitar d'aquesta manera el seu efecte citotòxic sobre les cèl·lules a nivell de la permeabilització de la seva membrana plasmàtica, que es dona especialment quan la concentració de DMSO és superior al 2%. A continuació, es duu a terme la centrifugació de les cèl·lules a 1200 rpm durant 4 minuts, es descarta el sobrenedant (eliminant d'aquesta manera la quantitat de DMSO corresponent al medi de congelació) i es resuspenen les cèl·lules en el medi de cultiu corresponent per al seu posterior plaqueig.

1.3. *Comptatge de cèl·lules*

Per a la realització del comptatge del nombre de cèl·lules i la quantificació de la densitat cel·lular van utilitzar-se dos mètodes diferents en aquest treball: comptatge en cambra de Neubauer i en *Countess™ Automated Cell Counter*. En ambdós mètodes es pren un volum de 10 μL de mostra de cèl·lules desadherides, disgregades, recollides i degudament resuspeses i es barreja aquest volum amb 10 μL de blau de tripà, implicant per tant una dilució 1:2 que ha de ser tinguda en compte en la realització dels càlculs corresponents per conèixer la densitat cel·lular.

1.3.1. Comptatge de cèl·lules en cambra de Neubauer

Després de col·locar un cobreobjectes sobre la part central de la cambra de Neubauer, s'introdueixen 10 μL dels 20 μL totals corresponents a la dilució 1:2 de la mostra de cèl·lules amb blau de tripà a l'espai existent entre les quadrícules de la part central de la cambra de Neubauer i el cobreobjectes.

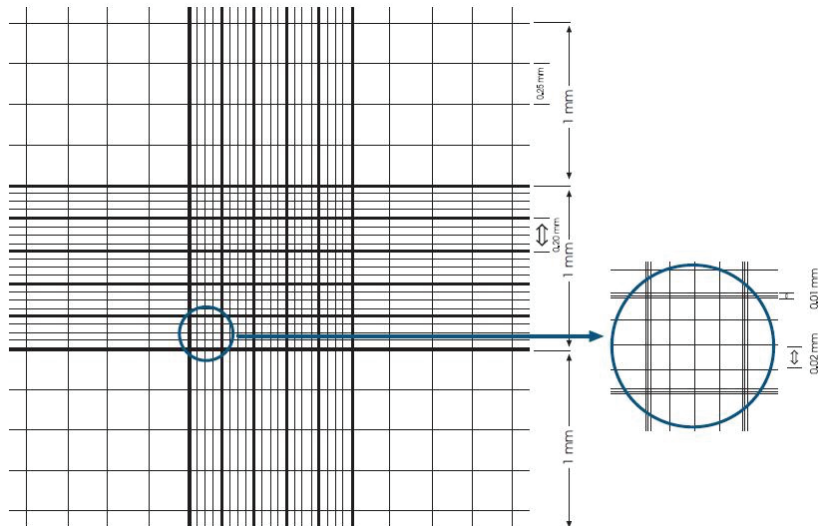


Figura 36. Cambra de Neubauer per a recompte cel·lular. Representació del reticle de Neubauer i les seves dimensions. Obtingut de Santi Badia - Treball propi, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18093767>.

Els comptatges van realitzar-se portant a terme el recompte de cèl·lules vives a cadascuna de les quatre quadrícules de 16 quadrats (4 × 4) a cadascuna de les cantonades. En quant a les dimensions de la cambra, la profunditat estàndard de la cambra de Neubauer és de 0,1 mm i la superfície de cadascuna de les quadrícules 4 × 4 és de 1 mm². Pel que fa al comptatge de cèl·lules vives i la seva diferenciació respecte de les cèl·lules mortes, es consideren cèl·lules vives totes aquelles que conserven la seva membrana plasmàtica en bon estat i que, per tant, no contenen blau de tripà al seu citoplasma en no poder aquest accedir a l'interior cel·lular. Pel contrari, es consideren cèl·lules mortes aquelles que estan tenyides de blau al seu interior en no conservar intacta la seva membrana plasmàtica essent, per tant, permeables al blau de tripà. A efectes del recompte cel·lular, es consideren únicament les cèl·lules vives. El recompte de cèl·lules mortes pot ser d'interès per conèixer la viabilitat de les cèl·lules a partir de la relativització de les cèl·lules vives respecte les cèl·lules totals, incloent les que estan mortes. El càlcul per conèixer el nombre de cèl·lules per unitat de volum és el següent:

$$\text{cèl} \cdot \text{lules} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{\text{cèl} \cdot \text{lules comptades}}{\text{superfície comptada (mm}^2\text{)} \cdot \text{profunditat cambra (mm)} \cdot \text{dilució}}$$

1.3.2. Comptatge de cèl·lules en *Countess™ Automated Cell Counter*

Es prenen 10 µL de mostres de cèl·lules dels 20 µL després de realitzar la dilució 1:2 amb blau de tripà i s'introdueixen en una cambra de comptatge *Countess™ Cell Counting Chamber Slides*. S'introdueix la cambra de

comptatge en el comptador *Countess™ Automated Cell Counter*. Aquest aparell proporciona com a resultat del comptatge els valors de cèl·lules totals i cèl·lules vives (cèl·lules mL⁻¹) i la seva viabilitat (%).

1.4. Línies cel·lulars

1.4.1. Línia cel·lular HEK293 (ATCC® CRL-1573™)

La línia cel·lular de ronyó embrionari humà 293 (*Human Embryonic Kidney 293*) fou obtinguda a partir de la transformació de cèl·lules de ronyó extretes d'un fetus humà aparentment sa legalment avortat sota l'empara de la legislació neerlandesa l'any 1973 mitjançant la inserció de la regió E1 (4,5 kb) del DNA de l'adenovirus de tipus 5 al cromosoma 19. El medi de cultiu utilitzat per a aquesta línia cel·lular és DMEM suplementat amb un 10% de FBS, L-glutamina 2 mM en cas que sigui necessari, penicil·lina 100 U mL⁻¹ i estreptomicina 100 µg mL⁻¹. Les cèl·lules HEK293 es desadhereixen fàcilment i, per tant, el seu temps de tripsinització és breu i no és necessari ni tan sols introduir-les a l'incubador, podent ser la tripsina aspirada mitjançant el buit abans de la recol·lecció de les cèl·lules desadherides i disgregades amb medi de cultiu. La línia cel·lular HEK293 es caracteritza per una elevada taxa de proliferació. El passatge de les cèl·lules HEK293 en cultiu ha de realitzar-se quan aquestes arriben a una confluència d'aproximadament el 90% i aplicant una dilució 1:10 – 1:12. A més, en el cas de la línia cel·lular HEK293, en aquest treball va treballar-se específicament amb diferents línies HEK293 genèticament modificades per a l'expressió estable de cadascuna de les proteïnes hCNT1 (HEK293–hCNT1), hCNT2 (HEK293–hCNT2), hCNT3 (HEK293–hCNT3) i hOCT1 (HEK293–hOCT1) contingudes cadascuna d'elles en el vector pcDNA5, així com la línia cel·lular HEK293 modificada genèticament control (HEK293–pcDNA5) prèviament generades mitjançant la tècnica *Flp-In™*. El fet de disposar de la línia cel·lular HEK293 modificada genèticament per a l'expressió estable de cada proteïna d'interès de forma individual, així com del seu control de transfecció (HEK293–pcDNA5), representa una eina molt útil per al cribratge i estudi de la interacció de molècules amb aquestes proteïnes transportadores.

1.4.2. Línia cel·lular MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)

Es tracta d'una línia cel·lular derivada d'adenocarcinoma ductal invasiu de mama receptor d'estrògens positiu obtinguda a partir de cèl·lules metastàtiques extretes a partir d'un vessament pleural d'una pacient caucàsica de 51 anys ja morta als Estats Units el 1973. El medi de cultiu adequat per al cultiu d'aquesta línia cel·lular és DMEM/F-12 suplementat amb

un 10% de FBS, *L*-glutamina 2 mM en cas que sigui necessari, penicil·lina 100 U mL⁻¹ i estreptomina 100 µg mL⁻¹. El temps de tripsinització d'aquestes cèl·lules és d'aproximadament 5 minuts a una temperatura de 37 °C. La dilució aplicada en el passatge d'aquesta línia cel·lular és 1:4.

1.4.3. Línia cel·lular TFK-1 (DSMZ® ACC 344™)

La línia cel·lular TFK-1 derivada d'adenocarcinoma ductal biliar o colangiocarcinoma humà fou obtinguda a partir de cèl·lules d'un espècimen quirúrgic d'un home japonès de 63 anys amb colangiocarcinoma. Les cèl·lules TFK-1 són *ErbB2* o *HER2/neu* positives. El medi de cultiu indicat per al cultiu d'aquesta línia cel·lular és RPMI 1640 suplementat amb un 10% de FBS, *L*-glutamina 2 mM en cas que sigui necessari, penicil·lina 100 U mL⁻¹ i estreptomina 100 µg mL⁻¹. El temps de tripsinització d'aquestes cèl·lules és d'aproximadament 5 minuts a una temperatura de 37 °C. La dilució adequada per al passatge d'aquesta línia cel·lular és 1:5 – 1:6.

1.5. Test de Mycoplasma

La contaminació dels cultius cel·lulars amb *Mycoplasma* és un problema important donat que la presència de *Mycoplasma* en un cultiu cel·lular pot donar lloc a alteracions fenotípiques i/o metabòliques que al seu torn poden resultar en variacions notables en els resultats experimentals obtinguts. Els bacteris pertanyents al gènere *Mycoplasma* es caracteritzen per no tenir paret cel·lular, de manera que els antibiòtics normalment utilitzats en els medis de cultiu cel·lular, com són penicil·lina i estreptomina, el mecanisme d'acció dels quals consisteix en la inhibició de la síntesi del peptidoglicà necessari per a la formació de la paret cel·lular, són del tot ineficaços en el cas de *Mycoplasma*. A més, la contaminació d'un cultiu cel·lular per *Mycoplasma* no és detectable mitjançant observació visual directa en microscòpia òptica. Per aquesta raó, per a la detecció de possible contaminació amb *Mycoplasma* es realitzen tests de *Mycoplasma* mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb encebadors específics per a la detecció de *Mycoplasma*. En la realització d'aquest treball, els tests per a la detecció de *Mycoplasma* van realitzar-se amb periodicitat quinzenal. Els encebadors o primers específics per a la detecció de *Mycoplasma* utilitzats en aquest treball foren els següents:

Forward 5' - GGCGAATGGGTGAGTAACACG - 3'
Reverse 5' - CGGATAACGCTTGCGACTATG - 3'

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) realitzada per al test de *Mycoplasma* consta de 35 cicles de desnaturalització a 94 °C durant 1 minut,

hibridació a 55 °C durant 1 minut i elongació a 72 °C durant 1 minut i 30 segons.

2. Transport de substrats

Els assaigs de transport de substrat permeten determinar la captació de substrat per part d'un o diversos transportadors mitjançant l'ús del propi substrat marcat radioisotòpicament. En el cas dels transportadors de nucleòsids, el fet que els transportadors concentratius requereixin necessàriament la presència de sodi (Na^+) per dur a terme la translocació del substrat i que, pel contrari, els transportadors equilibratius no el requereixin és la base que permet discernir experimentalment la contribució de sengles tipus de transport al transport total. D'aquesta manera, és possible elucidar el transport concentratiu net mitjançant la subtracció de la mesura corresponent a la suma de transport equilibratiu, fenòmens de difusió i unions inespecífiques en absència de sodi (normalment utilitzant colina com a contraió substituït amb la finalitat de mantenir les mateixes condicions d'osmolaritat respecte el medi amb sodi) al transport total mesurat en un medi amb presència de sodi (Na^+) en què, a més dels fenòmens ja esmentats de transport equilibratiu, difusió i unions inespecífiques, el transport concentratiu té lloc. En el cas del transport independent de sodi mediat pels transportadors equilibratius és possible conèixer la contribució neta d'aquests transportadors respecte els fenòmens de difusió i unions inespecífiques mitjançant la inhibició dels transportadors equilibratius amb dipiridamol 10 μM . En el cas del transportador de cations orgànics hOCT1 s'utilitza medi amb *N*-metil-*D*-glucamina (NMDG) com a medi de transport i 1-metil-4-fenilpiridini (MPP^+) com a substrat. En els experiments de transport de substrat és important que la concentració de substrat sigui de l'ordre de la constant d'afinitat (K_M) del substrat pel transportador que correspon a la concentració de substrat en què la velocitat de captació (v) és la meitat de la velocitat màxima (v_{\max}). En els experiments de transport de nucleòsids la concentració de substrat és 1 μM .

$$[S] \approx K_M = [S] \frac{v_{\max}}{2}$$

Els assaigs de transport han de realitzar-se en condicions de velocitat inicial (v_0), linealitat i no acumulació de substrat. D'aquesta manera, la quantitat de substrat captat és directament proporcional al temps transcorregut sense arribar a la saturació del transportador. A més, l'activitat radioactiva del substrat marcat radioisotòpicament ha de ser detectable, depenent aquest factor tant de l'activitat específica (dpm mol^{-1}) com de l'activitat del

transportador. En el cas del transport de nucleòsids i de MPP⁺ l'activitat radioactiva utilitzada és 1 µCi mL⁻¹.

2.1. Medis de transport, tampons i reactius

2.1.1. Medis de transport

Medi sodi	Component	Concentració o quantitat
	Clorur de sodi (NaCl)	137 mM
	Clorur de potassi (KCl)	5,4 mM
	Clorur de calci dihidratat (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	1,8 mM
	Sulfat de magnesi heptahidratat (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	1,2 mM
	HEPES	10 mM
	Roig fenol	100 µL L ⁻¹
	Tris base 1 M	q.s.p. pH = 7,4

Taula 5. Preparació de medi sodi. Components i concentracions corresponents per a la preparació de medi sodi per a assaigs de transport de substrat.

Medi colina	Component	Concentració o quantitat
	Clorur de colina (ChoCl)	137 mM
	Clorur de potassi (KCl)	5,4 mM
	Clorur de calci dihidratat (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	1,8 mM
	Sulfat de magnesi heptahidratat (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	1,2 mM
	HEPES	10 mM
	Roig fenol	400 µL L ⁻¹
	Tris base 1 M	q.s.p. pH = 7,4

Taula 6. Preparació de medi colina. Components i concentracions corresponents per a la preparació de medi colina per a assaigs de transport de substrat.

Medi NMDG	Component	Concentració o quantitat
	N-metil-D-glucamina (NMDG)	137 mM
	Clorur de potassi (KCl)	5,4 mM
	Clorur de calci dihidratat (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	1,8 mM
	Sulfat de magnesi heptahidratat (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	1,2 mM
	HEPES	10 mM
	Roig fenol	400 µL L ⁻¹
	Àcid clorhídric (HCl) 1 M	q.s.p. pH = 7,4

Taula 7. Preparació de medi N-metil-D-glucamina. Components i concentracions corresponents per a la preparació de medi NMDG per a assaigs de transport de substrat.

Medi STOP	Component	Concentració o quantitat
	Clorur de sodi (NaCl)	137 mM
	HEPES	10 mM
	Roig fenol	200 $\mu\text{L L}^{-1}$
	Tris base 1 M	q.s.p. pH = 7,4

Taula 8. Preparació de medi STOP. Components i concentracions corresponents per a la preparació de medi STOP per a assaigs de transport de substrat.

2.1.2. Tampons

Tampó de lisi	Component	Concentració
	Tritó X-100	0,5%
	Hidròxid de sodi (NaOH)	100 mM

Taula 9. Preparació de tampó de lisi cel·lular per a assaigs de transport. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó de lisi per al trencament de cèl·lules.

2.1.3. Reactius

Substrats	Component	Concentració
	Uridina	1 mM
	Adenosina	1 mM
	1-metil-4-fenilpiridini (MPP ⁺)	1 mM

Taula 10. Substrats utilitzats en assaigs de transport. Substrats model utilitzats en els assaigs de transport de substrat i les concentracions corresponents.

Radioisòtops	Component	Radioactivitat
	[5,6- ³ H]uridina	1 mCi mL ⁻¹
	[2,8- ³ H]adenosina	1 mCi mL ⁻¹
	N-[metil- ³ H]1-metil-4-fenilpiridini ([³ H]MPP ⁺)	1 mCi mL ⁻¹

Taula 11. Substrats marcats radioisotòpicament utilitzats en assaigs de transport. Radioisòtops utilitzats en els assaigs de transport de substrat i les activitats radioactives respectives.

Líquid d'escintil·lació	Nom comercial	Referència
	Ecoscint™ H	National Diagnostics (LS-275)

Taula 12. Líquid d'escintil·lació utilitzat en assaigs de transport. Líquid d'escintil·lació utilitzat per al recompte de desintegracions per minut en tots els assaigs de transport de substrat d'aquest treball.

2.2. Assaig de transport en cèl·lules en monocapa

Els assaigs de transport es realitzen en plaques de 24 pous (4 files × 6 columnes), normalment en quadruplicats o en triplicats, en funció de les condicions experimentals. Per a la realització d'aquests assaigs s'utilitzen medis de transport temperats a una temperatura de 37 °C suplementats amb

substrat no marcat radioisotòpicament o “fred” en excés a una concentració de 1 μM i amb substrat marcat radioisotòpicament a una activitat radioactiva de 1 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$. En el cas dels assaigs de *cis*-inhibició s’afegeix al medi de transport la concentració corresponent de fàrmac o d’inhibidor. En el cas de l’obtenció de corbes d’interacció cinètica, s’afegeixen concentracions creixents de l’inhibidor o del fàrmac al medi de transport. Abans d’exposar les cèl·lules al medi de transport amb substrat, i inhibidor si és el cas, es realitzen dos rentats de les cèl·lules en monocapa amb el medi de transport corresponent (medi sodi, medi colina o medi NMDG). A continuació, s’exposen les cèl·lules en monocapa al medi de transport amb substrat (i, si correspon, amb inhibidor i/o fàrmac) durant un temps delimitat en què es mantinguin condicions de velocitat inicial de captació de substrat, linealitat i no acumulació de substrat, normalment 30 segons o 1 minut. El volum de medi de transport amb substrat per pou és de 240 μL . Seguidament, es deté l’esmentada exposició a substrat en medi de transport amb dos rentats ràpids amb tampó STOP en gel (aproximadament a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$). Posteriorment, les cèl·lules són lisades amb 100 μL de tampó de lisi i són mantingudes en agitació durant 30 minuts amb la finalitat de facilitar la ruptura de les cèl·lules i el consegüent alliberament de substrat radioactiu captat contingut en el seu interior. Després de l’homogeneïtzació del lisat resultant, es recullen 10 μL de mostra per a la determinació de la concentració de proteïna mitjançant el mètode de l’àcid bicinconínic (BCA) i es recullen els 90 μL restants per a la quantificació de radioactivitat. Aquests 90 μL de mostra s’introdueixen en un vial amb 3 mL de líquid d’escintil·lació per al seu posterior comptatge en un comptador de radiacions β que mesura emissió de luminiscència proporcionant desintegracions per minut (dpm) com a mesura resultant. A més, més enllà de la quantificació de les mostres és imprescindible la quantificació de l’activitat específica del medi de transport amb substrat marcat radioisotòpicament de cadascuna de les condicions experimentals estudiades, és a dir, segons medi de transport i per cadascun dels inhibidors i/o fàrmacs utilitzats i, a més, per cadascuna de sengles concentracions utilitzades. Per això, a mode orientatiu, suposant que es realitza cada condició en quadruplicats i que per cada rèplica s’utilitzen 240 μL de medi de transport amb substrat; si es prepara un total de 1 mL de medi de transport amb substrat per una determinada condició experimental, es té que $240 \mu\text{L} \times 4$ correspon a un total de 960 μL , quedant 40 μL restants que són suficients per realitzar una mesura de l’activitat específica en triplicats de 5 μL cadascun. El volum de 5 μL corresponent a cada rèplica de medi de transport amb substrat pres com a mostra per a la quantificació de l’activitat específica s’introdueix, de la mateixa manera que es fa amb les mostres experimentals, en un vial d’escintil·lació amb 3 mL de líquid d’escintil·lació per al seu posterior comptatge en un comptador de radiacions β .

2.3. *Determinació de la concentració de proteïna*

La determinació de la concentració de proteïna a l'assaig de transport de substrat es realitza mitjançant el mètode de l'àcid bicinconínic (BCA). El mètode de l'àcid bicinconínic es fonamenta en la reacció de Biuret que consisteix en la reducció de coure (II) (Cu^{2+}) a coure (I) (Cu^+) per part de la proteïna en medi alcalí, actuant el catió Cu^+ com agent quelant donant lloc a un complex format per dues molècules d'àcid bicinconínic complexades amb un catió Cu^+ essent aquest un producte hidrosoluble i amb un color púrpura intens la detecció colorimètrica del qual pot portar-se a terme mitjançant lectura d'absorbància a una longitud d'ona de 550 nm essent aquesta linealment proporcional a la concentració de proteïna. A nivell metodològic, es dipositen els 10 μL de mostra recollida destinada a la quantificació de la concentració de proteïna de cada rèplica experimental en pous d'una placa de 96 pous. A aquests 10 μL se'ls afegeix 200 μL de barreja dels dos reactius del lot comercial Pierce™ BCA™ *Proteinassay Kit* (referència 23225, ThermoFisher Scientific) en una proporció 1:50. A continuació, s'incuba la placa de 96 pous amb les mostres per a la quantificació de proteïna i el reactiu de BCA a una temperatura de 37 °C durant 30 minuts i, a continuació, a temperatura ambient durant 10 minuts més. Amb la finalitat d'obtenir valors de concentració de proteïna a partir dels valors d'absorbància obtinguts a una longitud d'ona de 550 nm es realitza una corba patró amb albúmina sèrica bovina en tampó de lisi a concentracions creixents (0, 125, 250, 500, 1000 i 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en triplicats.

2.4. *Determinació de l'activitat específica (AE)*

L'activitat específica (AE) s'obté a partir del comptatge de radioactivitat de la mostra de medi de transport amb substrat radioactiu de la condició experimental corresponent, el volum de mostra (5 μL) i la concentració de substrat (1 μM ; es considera únicament la concentració de substrat no marcat radioisotòpicament o "fred" donat que la contribució del substrat marcat radioactivament a la concentració total de substrat es considera negligible).

$$AE \text{ (dpm pmol}^{-1}\text{)} = \frac{\text{comptatge (dpm)}}{V \text{ (}\mu\text{L)} \cdot [\text{substrat}] \text{ (}\mu\text{M)}} = \frac{\text{dpm}}{5 \mu\text{L} \cdot 1 \mu\text{mol L}^{-1}} = \frac{\text{dpm}}{5 \cdot 10^{-12} \text{ mol}} = \frac{\text{dpm}}{5 \text{ pmol}}$$

2.5. *Quantificació del transport de substrat*

La quantitat de substrat captat o l'activitat de transport de substrat s'obté a partir del comptatge de radioactivitat de la mostra experimental (90 μL de mostra en tampó de lisi per cada rèplica experimental), l'activitat específica del medi de transport amb substrat radioactiu corresponent a cada mostra en

particular, el volum de mostra (90 μL), la concentració de proteïna determinada per a cada rèplica individual mitjançant el mètode de l'àcid bicinonínic i el temps d'exposició al substrat (en el cas d'aquest treball, 30 segons o 1 minut).

$$\begin{aligned} \text{Substrat captat (pmol mg}^{-1}\text{prot t}^{-1}) &= \frac{\text{comptatge (dpm)}}{AE \text{ (dpm pmol}^{-1}) \cdot V(\mu\text{L}) \cdot [\text{proteïna}](\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}) \cdot t} = \\ &= \frac{\text{dpm}}{\text{dpm pmol}^{-1} \cdot 90 \mu\text{L} \cdot [\text{prot}] \cdot 10^{-3} \text{ mg } \mu\text{L}^{-1} \cdot t} = \frac{\text{pmol}}{9 \cdot 10^{-2} \cdot [\text{prot}] \text{ mg} \cdot t} \end{aligned}$$

3. Assaigs de viabilitat cel·lular i citotoxicitat

Els assaigs de viabilitat cel·lular i de citotoxicitat portats a terme en aquest treball van realitzar-se mitjançant el mètode MTT. El mètode MTT consisteix en un assaig colorimètric quantitatiu mitjançant l'ús de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli (MTT) que permet quantificar el nombre de cèl·lules metabòlicament actives i, per tant, per extensió, de cèl·lules vives. La sal de tetrazoli, de color groc, és reduïda per part de les cèl·lules vives i, per tant, amb activitat metabòlica, per donar lloc a cristalls de formazan de color púrpura, que després de ser posteriorment solubilitzats amb dimetilsulfòxid (DMSO), la densitat òptica resultant dels quals manté una correlació directament proporcional amb el nombre de cèl·lules metabòlicament actives i, per tant, viables. La reacció de reducció de la sal de tetrazoli a formazan només és possible en cèl·lules amb activitat oxidoreductasa dependent del dinucleòtid de flavina i adenina (FAD), més concretament, amb activitat de l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa.

3.1. Procediment

En aquest treball, van sembrar-se cèl·lules HEK293 o TFK-1, segons correspongués, en plaques de 96 pous a una densitat cel·lular de 8×10^3 cèl·lules per pou en el moment de la sembra. Si les cèl·lules no requerien transfecció per a l'expressió o sobreexpressió d'una proteïna concreta, el tractament va realitzar-se a les 24 hores del moment de la sembra. En el cas que les cèl·lules haguessin de ser transfectades transitòriament per a l'expressió o sobreexpressió d'una o diverses proteïnes en particular, la transfecció va dur-se a terme a les 24 hores després de la sembra i va aplicar-se el tractament corresponent 24 hores després de la transfecció, o el que és el mateix, 48 hores després del moment de la sembra. En aquest últim cas, l'exposició de les cèl·lules als agents de transfecció va mantenir-se durant un període de 6 hores. En tots els casos, la quantificació de la viabilitat cel·lular relativa o/i de l'efecte citotòxic va realitzar-se a les 72 hores de tractament. En el bloc temàtic corresponent a nucleòsids epigenètics, tots els assaigs de

viabilitat cel·lular van portar-se a terme sense retirada del tractament en cap moment fins el moment de la determinació de la viabilitat cel·lular, mantenint l'exposició de les cèl·lules al tractament durant un període de 72 hores. En canvi, en el cas del bloc temàtic corresponent a ruxolitinib, el temps d'exposició a tractament fou en tots els casos de 90 minuts degut a l'elevada magnitud corresponent a la intensitat de l'efecte citotòxic de gemcitabina.

A nivell metodològic, per la determinació de la viabilitat cel·lular o/i l'efecte citotòxic després d'un període de 72 hores des de l'aplicació del tractament corresponent s'aplica un volum de 100 μL a cada pou d'una barreja de PBS 1 \times i medi de cultiu en una proporció relativa 1:9, respectivament, i amb MTT dissolt a una concentració de 7,5 mg mL^{-1} . La sal de tetrazoli és fotosensible de manera que és necessari protegir-la de l'exposició a la llum en tots els punts del procediment. A continuació, s'incuben les cèl·lules a una temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$ durant 30 minuts. Un cop transcorregut aquest temps, es retira la barreja de PBS 1 \times amb medi de cultiu i MTT dissolt i, a continuació, se solubilitzen els cristalls de formazan de color púrpura formats a l'interior de les cèl·lules viables com a conseqüència de la seva activitat metabòlica amb 100 μL de dimetilsulfòxid (DMSO) per pou. En darrer lloc, es determina quantitativament la densitat òptica de cadascun dels punts mitjançant lectura de l'absorbància a una longitud d'ona de 550 nm.

4. Expressió heteròloga de proteïnes

Les tècniques de transfecció possibiliten la introducció d'àcids nucleics, concretament DNA, per l'expressió o la sobreexpressió transitòria de la proteïna o les proteïnes d'interès per l'estudi de la seva funció i els efectes resultants de la modulació i/o regulació de la seva expressió. En aquest treball van utilitzar-se, per una banda, línies cel·lulars transfectades establement prèviament generades mitjançant el sistema *Flp-In*TM que consisteixen bàsicament en línies cel·lulars HEK293 modificades genèticament per a l'expressió de les proteïnes hCNT1 (gen *SLC28A1*), hCNT2 (gen *SLC28A2*), hCNT3 (gen *SLC28A3*) i hOCT1 (gen *SLC22A1*), essent tots aquests gens continguts en el vector pcDNA5, disposant per tant a més de la línia cel·lular HEK293 modificada amb el vector pcDNA5 buit a mode de control de transfecció; i, per una altra banda, mètodes de transfecció transitòria amb agents químics (*Lipofectamine*[®] 2000; ThermoFisher Scientific, referència 11668-019) per a, en el cas particular d'aquest treball, l'expressió de l'enzim citidina desaminasa (gen *CDA*) en cèl·lules HEK293 i l'expressió de les proteïnes transportadores hCNT1 (gen *SLC28A1*) hCNT2 (gen *SLC28A2*) i

hCNT3 (gen *SLC28A3*) en cèl·lules TFK-1, utilitzant en tots els casos el vector pcDNA3 com a vector de transfecció.

Existeixen bàsicament tres grans grups de tècniques de transfecció: ús de virus genèticament modificats, mètodes químics basats en molècules portadores i mètodes físics que faciliten l'entrada dels àcids nucleics directament al citoplasma. En aquest treball van utilitzar-se únicament mètodes químics fent servir liposomes catiònics (*Lipofectamine*® 2000) com agent de transfecció.

4.1. *Transfecció transitòria amb Lipofectamine*® 2000

Lipofectamine® 2000 consisteix en una formulació basada en liposomes catiònics que tenen capacitat d'unir DNA, donat que aquest posseeix càrrega negativa neta. Els liposomes carregats positivament capturen el DNA carregat negativament formant complexos la membrana lipídica dels quals pot fondre's amb el mosaic fluid que formen els fosfolípids de la membrana plasmàtica i, d'aquesta manera, alliberar el contingut del liposoma, el DNA, al citoplasma. Per la transfecció amb *Lipofectamine*® 2000 és necessari substituir prèviament el medi de cultiu per medi no suplementat amb sèrum boví fetal (FBS) ni amb antibiòtics, en tant que ambdós són components susceptibles d'interferir en la formació dels complexos liposoma-DNA. En aquest treball, va utilitzar-se *Opti-MEM*® *Reduced Serum Medium* (referència 31985070, Gibco, ThermoFisher Scientific) com a medi lliure de sèrum.

A nivell procedimental, es realitzen dues barreges per separat en tubs estèrils cadascuna d'elles amb el mateix volum d'*Opti-MEM*® i amb el volum corresponent de *Lipofectamine*® 2000 en un dels dos tubs i amb la quantitat corresponent de DNA a l'altre tub. Ambdós tubs són incubats a temperatura ambient durant 5 minuts. A continuació, es barreja el contingut d'ambdós tubs i s'incuba a temperatura ambient durant 5 minuts més. Aquesta última mescla és la que s'aplica a cadascun dels pous o a cadascuna de les plaques amb la finalitat de transfectar transitòriament les cèl·lules. El temps d'exposició als agents de transfecció, en aquest treball, fou de 6 hores. Al cap d'aquest període de temps, es substitueix el medi amb els agents de transfecció per medi de cultiu fresc.

Les proporcions de cadascun dels components del procés de transfecció transitòria als diversos tipus de plaques de cultiu utilitzades en aquest treball es detallen a continuació a la següent taula:

	Placa de 96 pous	Placa de 24 pous	Placa de 60 mm
DNA	80 ng	0,5 µg	5,25 µg
Lipofectamine® 2000	0,2 µL	1,25 µL	13,13 µL
Opti-MEM®	2 × 5 µL	2 × 31,25 µL	2 × 328,13 µL
Medi de cultiu	q.s.p. 100 µL	q.s.p. 500 µL	q.s.p. 5 mL

Taula 13. Transfecció transitòria de DNA amb Lipofectamine® 2000. Quantitats i volums de cadascun dels components del procés de transfecció transitòria en funció del tipus de placa de cultiu cel·lular.

5. Anàlisi de l'expressió de proteïnes

5.1. Obtenció de proteïnes a partir de cultius cel·lulars

En primer lloc, es realitzen dos rentats amb tampó PBS 1× fred, amb l'objectiu d'eliminar qualsevol resta de medi de cultiu que pugui quedar a la placa de cultiu després de la seva aspiració, i justament immediatament després d'aspirar completament el tampó PBS 1× corresponent al segon rentat es congela instantàniament la placa de cultiu cel·lular mitjançant l'aplicació de nitrogen líquid. En aquest punt, és possible conservar les cèl·lules congelades a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. És crític i absolutament essencial realitzar tot el procés o bé en gel o bé a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ per evitar la degradació de les proteïnes.

Tampó PBS 1×	Concentració o quantitat
Clorur de sodi (NaCl)	13,7 mM
Clorur de potassi (KCl)	270 µM
Dihidrogenfosfat de potassi (KH ₂ PO ₄)	140 µM
Hidrogenfosfat de sodi dihidratat (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	430 µM
Hidròxid de sodi (NaOH) 1 M	q.s.p. pH = 7,4

Taula 14. Preparació de tampó TBS 1× per a extracció de proteïnes. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó PBS 1×.

A continuació, s'aplica tampó de lisi amb la finalitat de trencar les cèl·lules de manera que alliberin el seu contingut intracel·lular en què s'hi troben les proteïnes que es pretén obtenir. Amb l'ajuda d'un raspador o rasqueta (en anglès, *scraper*) es desadhereixen alhora que es trenquen mecànicament les cèl·lules en el tampó de lisi i es recull la mostra en un tub de 1,5 mL de capacitat. Es procedeix a la homogeneïtzació mecànica de la mostra mitjançant una xeringa de 1 mL amb una agulla amb un calibre de 25 Gauge i es deixa en repòs en gel durant 15 minuts. En últim lloc, es centrifuga la mostra a 13200 revolucions per minut a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 15

minuts. Després de la centrifugació es descarta el sediment que conté restes cel·lulars i es recull el sobrenedant que conté la fracció de proteïnes solubles.

Tampó de lisi	Concentració
Tris-HCl; pH = 7,4	50 mM
Clorur de sodi (NaCl)	250 mM
NP-40	1%
Pirofosfat de sodi ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	5 mM
Fluorur de sodi (NaF)	50 mM
Ortovanadat de sodi (Na_3VO_4)	1 mM
Inhibidor de proteases cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets 10× (Roche)	1×

Taula 15. Preparació de tampó de lisi cel·lular per a extracció de proteïnes. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó de lisi per al trencament de cèl·lules.

5.2. Determinació de la concentració de proteïna

La concentració de proteïna de les mostres obtingudes es determina mitjançant el mètode de Bradford que consisteix en un mètode colorimètric basat en el canvi de coloració que experimenta el blau de Coomassie contingut a la solució comercial *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (referència #500-0006EDU, BIO-RAD) en medi àcid en unir-se als residus bàsics de les proteïnes. Per tant, el canvi de coloració és proporcional a la concentració de proteïna de la mostra. Es realitzen dues dilucions de les mostres d'extracte cel·lular de proteïna en PBS 1×, concretament 1:15 (normalment es dilueixen 2 µL de mostra en 28 µL de tampó) i 1:30 (2 µL de mostra en 58 µL de tampó), amb l'objectiu de situar-les en valors assimilables als valors de concentració de proteïna utilitzats per a l'obtenció de la corba patró que possibilitarà la posterior interpolació dels valors obtinguts de cadascuna de les mostres. Per a l'elaboració de la corba patró s'utilitza albúmina sèrica bovina (BSA) a concentracions de 0, 100, 200, 300, 400 i 500 µg mL⁻¹. En plaques de 96 pous s'introdueixen 10 µL de mostra, ja sigui d'extracte cel·lular o d'albúmina sèrica bovina, a cada pou. En el cas de les mostres d'albúmina sèrica bovina per a l'obtenció de la corba patró es realitza en triplicats per cadascuna de les concentracions. Per les mostres d'extractes cel·lulars es realitza en duplicats per cadascuna de les dues dilucions. A continuació, s'aplica a cadascun dels punts un volum de 200 µL d'una dilució 1:5 de *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* en aigua destil·lada prèviament elaborada. En darrer lloc, es duu a terme la lectura espectrofotomètrica de l'absorbància de cadascuna de les mostres a una longitud d'ona de 595 nm. A partir de la corba patró, es realitza la interpolació dels valors d'absorbància obtinguts per les diverses mostres d'extractes

cel·lulars per a la determinació de sengles valors de concentració de proteïna total resultant.

5.3. *Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants*

L'electroforesi és una tècnica que permet separar proteïnes en funció de la seva mida o massa molecular. L'electroforesi per a la separació de proteïnes es realitza en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants mitjançant l'ús de dodecilsulfat sòdic (SDS; també denominat laurilsulfat sòdic o SLS; $C_{12}H_{25}NaO_4S$) al 0,1%; i d'aquí el seu acrònim procedent de la seva denominació en anglès: SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). El dodecilsulfat sòdic o SDS és un tensioactiu que s'uneix a les zones apolars del polipèptid proporcionant-li càrrega negativa neta i trencant els enllaços no covalents de la proteïna resultant en la seva desnaturalització degut a la pèrdua de la seva conformació nativa. És la repulsió electrostàtica creada per la unió del SDS la causa de que la proteïna perdi la seva conformació nativa, eliminant d'aquesta manera la variable corresponent a les diferències degudes a la conformació de les proteïnes respecte la seva separació en el gel en funció de la seva massa molecular. Degut a l'entorn químic desnaturalitzant generat per la presència de SDS les proteïnes adquireixen una relació massa càrrega (m/z) constant de forma que en neutralitzar el factor càrrega com un element de diferenciació entre les diverses proteïnes a separar, aquestes són separades únicament en funció de la seva mida o massa molecular que és l'única variable restant que permet diferenciar les proteïnes unes de les altres i per tant aconseguint separar-les en el gel d'electroforesi.

Els gels de poliacrilamida utilitzats en electroforesi de proteïnes s'obtenen mitjançant la polimerització de dos components, acrilamida (C_3H_5NO) i *N,N'*-metilenbisacrilamida (Bis, MBAm o MBAA) ($C_7H_{10}N_2O_2$), en una proporció relativa 37,5:1; respectivament, al 30% (referència #1610158, BIO-RAD). *N,N'*-metilenbiscacrilamida o Bis actua com agent de reticulació (en anglès, *cross-linking*) en la polimerització de l'acrilamida per a la formació del gel. El procés de polimerització és iniciat per persulfat d'amoni (APS, $(NH_4)_2S_2O_8$) (referència #1610700, BIO-RAD) i l'elongació de la polimerització és realitzada per *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina (TEMED, $C_6H_{16}N_2$) (referència #1610800, BIO-RAD). A l'electroforesi de proteïnes s'utilitzen dos gels, el gel apilador i el gel separador. El gel apilador és el gel superior en què es carreguen les diverses mostres en sengles carrils i es caracteritza per un baix percentatge d'acrilamida que és del 5%. El gel apilador permet l'alineament de les mostres en els diversos carrils abans de la seva separació en el gel separador. El gel separador és el gel inferior en què se separen en

funció de la seva massa molecular les proteïnes de cadascuna de les mostres. El percentatge d'acrilamida del gel separador pot variar en funció de la massa molecular de la proteïna o les proteïnes que es desitja detectar *a posteriori* i es troba entre el 5% i el 15%. En el cas d'aquest treball, van utilitzar-se gels separadors amb un 12% d'acrilamida en tots els casos. El grau de resolució en la separació de proteïnes depèn del percentatge d'acrilamida del gel separador, de manera que un percentatge elevat d'acrilamida confereix una major resolució en la separació de proteïnes de massa molecular baixa i, al seu torn, un percentatge baix d'acrilamida és més adient per obtenir una bona resolució en la separació de proteïnes de massa molecular més elevada.

Acrilamida (%)	Massa molecular (kDa)
7%	50 – 500
10%	20 – 300
12%	10 – 200
15%	3 – 100

Taula 16. Percentatges d'acrilamida en Western Blot i massa molecular de les proteïnes. Percentatges d'acrilamida a utilitzar en els gels apilador i separador per a la realització de *Western Blot* en funció de la massa molecular de la proteïna que es pretén identificar o aïllar. En el cas d'aquest treball, es van utilitzar gels amb un percentatge d'acrilamida del 12%.

5.3.1. Gels de poliacrilamida

En primer lloc, es prepara el gel inferior que correspon al gel separador i, un cop aquest ja ha polimeritzat, es prepara a continuació el gel apilador amb la pinta per a la generació dels pous en els que es carrega la mostra i que generen els diversos carrils en què corre la mostra durant el transcurs de l'electroforesi. Les pintes utilitzades en aquest treball foren pintes de 15 pous de 1,5 mm amb una capacitat màxima de volum de càrrega de 40 µL (Mini-PROTEAN® *Combs*, 15-well, 1.5 mm, 40 µL; referència #1653366, BIO-RAD). El muntatge per a l'elaboració dels gels d'electroforesi d'aquest treball va realitzar-se en dispositius Mini-PROTEAN® *Electrophoresis System* (BIO-RAD).

Gel separador (1 gel, 10 mL)	Volum
Aigua desionitzada (H ₂ O)	3,3 mL
Acrilamida-Bis 30%	4 mL
Tris 1,5 M; pH = 8,8	2,5 mL
Dodecilsulfat sòdic (SDS) 10%	100 µL
Persulfat d'amoni (APS) 10%	100 µL
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina (TEMED)	4 µL

Taula 17. Preparació de gel separador per a Western Blot. Components i volums corresponents per a la preparació d'un volum de 10 mL de gel separador.

Gel apilador (1 gel, 4 mL)	Volum
Agua desionitzada (H ₂ O)	2,7 mL
Acrilamida-Bis 30%	0,67 mL
Tris 1 M; pH = 6,8	0,5 mL
Dodecilsulfat sòdic (SDS) 10%	40 µL
Persulfat d'amoni (APS) 10%	40 µL
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina (TEMED)	4 µL

Taula 18. Preparació de gel apilador per a Western Blot. Components i volums corresponents per a la preparació d' un volum de 4 mL de gel apilador.

5.3.2. Tampons per a l'electroforesi de proteïnes

Es requereixen dos tampons per al procés d'electroforesi de proteïnes, el tampó d'electroforesi i el tampó de càrrega. El tampó d'electroforesi es prepara a una concentració 10× i es dilueix 1:10 en aigua desionitzada prèviament al seu ús en la separació electroforètica de les proteïnes de les mostres. El tampó de càrrega es prepara a una concentració 5× i ja queda diluït a la concentració 1× en el procés de preparació de les mostres per carregar en el gel. A més, en el cas del tampó de càrrega 5× és necessari suplementar-lo amb un 5% de β-mercaptoetanol (C₂H₆OS) que elimina els ponts disulfur de tipus cistina formats per dímers de cisteïna participant també, d'aquesta manera, en la completa desnaturalització de les proteïnes.

Tampó d'electroforesi 10×	Concentració
Tris base	250 mM
Glicina (Gly)	1,91 M
Dodecilsulfat sòdic (SDS)	1%

Taula 19. Preparació de tampó d'electroforesi 10× per a Western Blot. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó d'electroforesi 10×.

Tampó de càrrega 5×	Concentració
Tris-HCl; pH = 6,8	625 mM
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	50%
Dodecilsulfat sòdic (SDS)	5%
Blau de bromofenol	0,5%
β-mercaptoetanol	+ 5%

Taula 20. Preparació de tampó de càrrega 5× per a Western Blot. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó de càrrega 5×.

5.3.3. Preparació de mostres per a càrrega en el gel d'electroforesi

En aquest treball va treballar-se amb quantitats de proteïna d'entre 20 i 40 µg de proteïna total per cada pou o carril del gel d'electroforesi. En principi, en la majoria de les ocasions, es carrega un volum total (mostra, tampó de càrrega i aigua) de 20 µL, fet que implica un volum de 4 µL de tampó de càrrega 5× suplementat amb β-mercaptoetanol, el volum corresponent a la quantitat de proteïna que es desitja carregar i la diferència de volum restant d'aigua Milli-Q (això és, la quantitat d'aigua necessària fins arribar a 16 µL sense comptar el tampó de càrrega 5× o bé la quantitat d'aigua necessària per arribar al volum total de 20 µL). En els casos en què el volum d'extracte cel·lular de proteïna superi els 16 µL per carregar la quantitat desitjada de proteïna, es treballa amb un volum total de 25 µL en lloc de 20 µL, fet que al seu torn implica un volum de 5 µL de tampó de càrrega 5× suplementat amb β-mercaptoetanol, el volum d'extracte de proteïna corresponent a la quantitat desitjada (en aquest cas es tracta d'un volum comprès entre 16 i 20 µL) i el volum restant d'aigua Milli-Q per completar 20 µL sense tenir en compte el volum de tampó de càrrega 5× o bé els 25 µL totals. Abans de carregar-se en el gel d'electroforesi, s'incuben totes les mostres a una temperatura de 95 °C durant 5 minuts. En aquest treball va utilitzar-se *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (referència #1610374, BIO-RAD) com a marcador de massa molecular que conté bandes corresponents a masses moleculars de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 i 250 kDa.

5.3.4. Desenvolupament del gel d'electroforesi i separació electroforètica de proteïnes

La separació electroforètica de les diverses proteïnes es realitza mitjançant l'aplicació d'un corrent elèctric d'intensitat constant de 40 mA per cada gel i de voltatge variable. Per al desenvolupament del gel mitjançant l'aplicació d'un corrent elèctric és necessari omplir prèviament la cubeta d'electroforesi amb tampó d'electroforesi 1×. En aquest treball va utilitzar-se *PowerPac™ Basic Power Supply* (referència #1645050, BIO-RAD) com a font d'alimentació.

5.4. *Western Blot*

La tècnica de *Western Blot* consisteix en l'electrotransferència de proteïnes prèviament separades electroforèticament del gel de poliacrilamida a una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF, $-(C_2H_2F_2)_n-$) per a la seva posterior detecció amb anticossos específics. En aquest treball van utilitzar-se

membranes Immobilon-P de PVDF de 0,45 mm de gruix (referència IPVH00010, Millipore®).

5.4.1. Tampons per a *Western Blot*

Per la realització de la tècnica de *Western Blot*, tant per l'electrotransferència de proteïnes del gel d'electroforesi a la membrana de PVDF com per al processament d'aquesta membrana per a la posterior detecció de proteïnes, es requereixen diversos tampons: tampó de transferència 10×, tampó de transferència 1×, Tris salí tamponat 10× o TBS 10× (de l'anglès, *Tris-buffered saline*) i TBS-Tween 1×. El tampó de transferència 1× és necessari per a l'electrotransferència humida de les proteïnes del gel d'electroforesi a la membrana de PVDF prèviament activada amb metanol. El tampó de transferència 10× s'utilitza per la preparació del tampó de transferència 1×. El tampó TBS 10× és necessari per la preparació del tampó TBS-Tween 1× que s'utilitza per la realització dels successius rentats de la membrana de PVDF amb les proteïnes ja transferides després del bloqueig amb llet, que al seu torn també es dissol en TBS-Tween 1×, i abans i després de les diverses incubacions amb cadascun dels anticossos.

Tampó de transferència 10×	Concentració
Tris base	250 mM
Glicina (Gly)	1,92 M

Taula 21. Preparació de tampó de transferència 10× per a Western Blot. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó de transferència 10×.

Tampó de transferència 1×	Concentració
Tampó de transferència 10×	10%
Metanol (CH ₃ OH)	20%
Aigua desionitzada (H ₂ O)	70%

Taula 22. Preparació de tampó de transferència 1× per a Western Blot. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó de transferència 1×.

Tris salí tamponat o TBS 10×	Concentració o quantitat
Tris base	200 mM
Clorur de sodi (NaCl)	1,5 M
Àcid clorhídric (HCl)	q.s.p. pH = 7,6

Taula 23. Preparació de Tris salí tamponat o TBS 10× per a Western Blot. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tris salí tamponat o TBS 10×.

TBS-Tween 1x	Concentració
TBS 10x	10%
Aigua desionitzada (H ₂ O)	90%
Tween 20 % <i>Nonionic Detergent</i> (referència #1610781, BIO-RAD)	+ 0,1%

Taula 24. Preparació de tampó TBS-Tween 1x per a Western Blot. Components i concentracions corresponents per a la preparació de TBS-Tween 1x.

5.4.2. Electrotransferència de proteïnes

Per dur a terme l'electrotransferència de proteïnes del gel de poliacrilamida a la membrana de fluorur de polivinilidè o PVDF és necessari disposar de fragments rectangulars tant de membrana de polivinilidè com de paper Whatman de dimensions 6 cm × 9 cm. En aquest treball l'electrotransferència de proteïnes va realitzar-se en la modalitat humida mitjançant l'ús d'un casset per la transferència de proteïnes. El casset de transferència està format per un costat de color negre i un altre costat transparent. Els diversos components a introduir al casset de transferència es disposen de la següent forma, de fora cap a dins: immediatament a continuació de cadascuna de les plaques del casset (la negra i la transparent) es col·loca una esponja, seguida de tres trossos rectangulars de paper Whatman a cada costat, quedant a la part central del casset el gel (del costat de la placa negra del casset, que queda al costat de l'ànode) i la membrana de PVDF (del costat de la placa transparent del casset, que queda a la part del càtode) que ha de ser prèviament activada. D'aquesta manera, en tant que les proteïnes separades al gel d'electroforesi posseeixen càrrega negativa neta són transferides de l'ànode al càtode, és a dir, del gel a la membrana després de l'aplicació del corrent elèctric. Prèviament a l'electrotransferència de proteïnes, és imprescindible activar la membrana de PVDF. L'activació de la membrana de PVDF es realitza mitjançant el tractament amb metanol durant 15 segons, amb aigua desionitzada durant 2 minuts i finalment la seva estabilització en tampó de transferència 1x, successivament. L'electrotransferència de les proteïnes del gel a la membrana activada es produeix mitjançant l'aplicació d'un corrent elèctric d'intensitat constant a 180 mA durant un període de 70 minuts i en gel.

5.4.3. Tinció amb vermell Ponceau

Amb la finalitat de comprovar si l'electrotransferència de proteïnes ha tingut lloc correctament es realitza una tinció de la membrana de PVDF amb vermell Ponceau (*Ponceau S* o *Acid Red 112*; 0,2% de tint i 3% d'àcid acètic; C₂₂H₁₂N₄Na₄O₁₃S₄). Les proteïnes es tenyeixen fàcilment amb aquest colorant,

tan sols amb uns pocs segons d'incubació és suficient, i queden tenyides amb un color vermell intens. Aquesta tinció és reversible i la membrana pot destenyir-se fàcilment mitjançant successius rentats amb aigua destil·lada. A més de tractar-se d'una bona eina per validar que la transferència de proteïnes a la membrana hagi tingut lloc de forma correcta, la tinció amb vermell ponçó permet obtenir una idea de les quantitats totals de proteïna carregada a cada carril, encara que únicament de forma eminentment qualitativa i, en cap cas, pot considerar-se una alternativa o substitut del control de càrrega.

5.4.4. Immunodetecció de proteïnes

La immunodetecció de proteïnes es realitza mitjançant incubacions successives amb dos anticossos, l'anticòs primari i l'anticòs secundari. L'anticòs primari és específic de la proteïna d'interès que es desitja detectar. L'anticòs secundari s'uneix a l'anticòs primari permetent l'amplificació del senyal facilitant així la seva detecció i possibilitant la seva detecció mitjançant la unió de peroxidasa de rava a una cadena pesada del propi anticòs secundari.

5.4.4.1. *Bloqueig d'unions inespecífiques*

Amb l'objectiu d'evitar o minimitzar les unions inespecífiques de l'anticòs primari a altres proteïnes o a la membrana de PVDF es realitza el bloqueig de la membrana amb llet desnatada en pols (Nestlé® Sveltesse®) dissolta al 5% (P/V) en TBS-Tween 1×. El bloqueig es porta a terme a temperatura ambient durant un període de 2 hores en agitació suau (40-50 rpm).

5.4.4.2. *Incubacions amb anticossos*

Després del bloqueig de la membrana de PVDF per evitar o minimitzar possibles unions inespecífiques s'incuba amb l'anticòs a la dilució corresponent segons el mateix anticòs en particular en el mateix tampó de bloqueig (llet desnatada en pols dissolta al 5% (P/V) en TBS-Tween 1×) en agitació orbital suau a una temperatura de 4 °C durant tota la nit. A continuació, es realitzen tres rentats successius de 10 minuts cadascun en TBS-Tween 1× en agitació suau (40-50 rpm). Seguidament, es porta a terme la incubació de la membrana amb l'anticòs secundari (el de l'espècie corresponent a l'anticòs primari per a la seva detecció) a la dilució indicada en tampó de bloqueig a temperatura ambient durant un període de 2 hores en agitació orbital suau. Finalment es realitzen tres rentats successius més de 10 minuts cadascun en TBS-Tween 1× en agitació suau (40-50 rpm) i a

continuació ja pot procedir-se al revelatge de la membrana. En el cas del control de càrrega (en aquest treball, actina en tots els casos) se segueix el mateix procediment excepte algunes especificacions a les incubacions dels anticossos primari i secundari. La incubació amb anticòs primari d'actina es realitza a la dilució indicada (1:2000) en tampó de bloqueig a temperatura ambient en agitació orbital suau durant un període de 1 hora. La incubació amb anticòs secundari per al control de càrrega també es realitza a temperatura ambient durant 1 hora en agitació orbital suau.

5.4.4.3. *Revelat de la membrana i detecció de proteïnes*

El revelat de la membrana i la detecció del senyal corresponent a les diverses bandes de les proteïnes detectades es realitza pel mètode de quimioluminiscència amplificada (ECL, de les seves sigles en anglès *Enhanced ChemiLuminescence*). Aquest mètode es basa en la quimioluminiscència generada en reaccionar la peroxidasa de rave unida a una cadena pesada de l'anticòs secundari. En aquest treball va utilitzar-se el reactiu EZ-ECL *Chemiluminescence Detection Kit for HRP* (de l'anglès, *HorseRadish Peroxidase*, és a dir, peroxidasa de rave) (referència 20-500-120, BI Biological Industries). Aquest reactiu consta de dues solucions; la solució A que conté peròxid d'hidrogen o aigua oxigenada (H_2O_2) i la solució B que conté luminol. La peroxidasa de rave de l'anticòs secundari catalitza la reacció d'oxidació de diacilhidrazides cíclics, com és el cas del luminol. Per al revelat de la membrana, s'elabora una barreja d'ambdues solucions, A i B, en proporció 1:1 en una quantitat corresponent a un volum de 500 μ L de barreja per cada membrana a revelar. S'aplica el volum de mescla de reactiu EZ-ECL a la membrana i s'incuba a temperatura ambient durant 1 minut. Finalment, s'obtenen les imatges resultants en un instrument FujiFilm LAS-3000 *Luminiscent Image Analyzer* (FujiFilm) mitjançant la captura successiva d'imatges després d'exposicions repetides i acumulatives de 30 segons cadascuna.

5.5. Anticossos utilitzats

5.5.1. Anticossos primaris

Proteïna	Casa comercial	Referència	Reactivitat	Dilució	Espècie	Massa molecular
CDA	Sigma-Aldrich	SAB1300717	Humà, ratolí	1:500	Conill	16 kDa
hOCT1	<i>H. Koepsell</i>	–	Humà	1:5000	Ratolí	61 kDa
Actina	Sigma-Aldrich	A2066	Humà	1:2000	Conill	42 kDa

Taula 25. Anticossos primaris. Anticossos primaris per a la detecció de les proteïnes CDA, hOCT1 i actina utilitzats en aquest treball.

5.5.2. Anticossos secundaris

Reactivitat	Casa comercial	Referència	Dilució
Conill	BIO-RAD	#1706515	1:2000
Ratolí	BIO-RAD	#1706516	1:2000

Taula 26. Anticossos secundaris. Anticossos secundaris per a la detecció de les proteïnes CDA, hOCT1 i actina utilitzats en aquest treball.

6. Tècniques generals de biologia molecular

6.1. Obtenció i purificació de fragments de DNA lineal

En aquest treball van utilitzar-se dos mètodes per a l'obtenció i purificació de fragments de DNA lineal: purificació per columna i purificació a partir de gel d'agarosa.

6.1.1. Purificació de DNA lineal per columna

Per dur a terme l'obtenció i la purificació de fragments de DNA lineal pel mètode d'extracció per columna va utilitzar-se el lot comercial DNA *Clean & Concentrator*TM-5 (referències D4003, D4004, D4013 i D4014; Zymo Research) que permet extreure i purificar fragments de DNA lineal de mida compresa entre 50 parells de bases i 23 quilobases. La capacitat de cada columna és d'aproximadament 5 µg de DNA i el rendiment d'obtenció de DNA és d'entre un 70% i un 90% per fragments de DNA d'entre 50 parells de bases i 10 quilobases, i d'entre un 50% i un 70% per fragments de DNA d'entre 10 i 23 quilobases.

Prèviament a la realització del protocol ha de preparar-se el tampó de rentat de DNA (*DNA Wash Buffer*). Per això s'afegeixen 24 mL d'etanol 100% (26 mL si es tracta d'etanol 96%) a 6 mL de tampó de rentat de DNA concentrat (*DNA Wash Buffer concentrate*). En primer lloc, s'afegeixen entre 2 i 7 volums (en funció del tipus de DNA del qual es tracti, veure **taula 27**) de tampó d'unió a DNA (*DNA Binding Buffer*) per cada volum de mostra de DNA i es barreja breument mitjançant un vòrtex.

Tipus de DNA	Tampó d'unió a DNA : Mostra	Exemple
Plasmidi, DNA genòmic (> 2 kb)	2:1	200 µL : 100 µL
Producte de PCR, fragment de DNA, vector	5:1	500 µL : 100 µL
DNA de cadena senzilla (ssDNA)	7:1	700 µL : 100 µL

Taula 27. Purificació de DNA per columna. Proporcions de volums de tampó d'unió a DNA i mostra de DNA a extreure o purificar en funció del tipus de DNA que es pretén obtenir segons el protocol del lot comercial *DNA Clean & Concentrator*TM-5.

A continuació, es transfereix la barreja a una columna *Zymo-Spin*TM *Column* proporcionada pel lot i al seu torn al tub de recol·lecció. Seguidament, se centrifuga a 13200 revolucions per minut (rpm) durant 30 segons i es descarta el líquid sobrant. S'afegeixen 200 µL de tampó de rentat de DNA (*DNA Wash Buffer*) a la columna i se centrifuga a 13200 rpm durant 30 segons; i es repeteix un cop més aquest últim pas de rentat. En darrer lloc, s'afegeix a la columna el volum d'aigua Milli-Q en què s'elueix el DNA purificat que es desitja obtenir, essent un volum a conveniència en funció del major o menor grau de concentració que es pretengui obtenir per al DNA resultant essent sempre un volum igual o superior a 6 µL. Una vegada afegit el volum d'aigua Milli-Q a la columna per a la posterior elució del DNA purificat, s'incuba a temperatura ambient durant 1 minut i finalment es transfereix la columna a un tub de microcentrifuga de 1,5 mL per a l'elució del DNA unit a la columna i la seva recol·lecció mitjançant centrifugació a 13200 rpm durant 30 segons.

6.1.2. Purificació de DNA a partir de banda de gel d'agarosa

En el cas en què es pretén extreure, purificar i obtenir DNA a partir d'una banda d'un gel d'agarosa, en lloc d'elaborar el gel d'agarosa amb tampó TBE 1× (tampó Tris, borat i EDTA) s'elabora amb tampó TAE 1× (tampó Tris, acetat i EDTA) donat que aquest últim garanteix una eficiència o rendiment d'extracció i obtenció de DNA major. Després de córrer la mostra en el gel d'agarosa i haver separat els diversos fragments de DNA en funció de la seva mida, es talla el fragment del gel d'agarosa que conté la banda corresponent al fragment de DNA desitjat. Per observar i poder retallar la banda corresponent al DNA per extreure s'utilitza un transil·luminador de llum ultraviolada. Un cop

retallada la banda que conté el DNA corresponent que es desitja purificar, aquesta és processada mitjançant el lot comercial QIAquick® *Gel Extraction Kit* (referència 28704, QIAGEN) que permet purificar i obtenir fragments de DNA de des de 70 parells de bases fins a 10 quilobases. Abans d'iniciar el protocol del lot comercial és necessari afegir etanol 96–100% al tampó PE. En primer lloc, es pesa el fragment de gel d'agarosa que conté la banda corresponent al DNA d'interès prèviament retallada contingut en un tub de 1,5 mL, prèviament tarat. Una vegada coneguda la massa del fragment de gel d'agarosa corresponent a la banda del DNA d'interès s'afegeixen 3 volums de tampó QG per cada volum de fragment de gel d'agarosa, considerant com aproximació vàlida que 100 mg de gel d'agarosa corresponen aproximadament a un volum de 100 µL. La quantitat màxima de gel d'agarosa que admet una columna d'aquest lot és de 400 mg. Per gels d'agarosa > 2%, han d'afegir-se 6 volums de tampó QG per cada volum de fragment de gel d'agarosa. A continuació, s'incuba el fragment de gel d'agarosa amb el volum corresponent de tampó QG a una temperatura de 50 °C durant 10 minuts, o bé fins que el fragment de gel d'agarosa s'hagi dissolt completament. És possible agitar al vòrtex el tub cada 2-3 minuts amb la finalitat de facilitar la dissolució del fragment de gel d'agarosa en el tampó QG. Un cop el fragment de gel d'agarosa ha quedat completament dissolt, el color de la barreja resultant ha de ser groc (un color groc semblant al del tampó QG sense l'agarosa dissolta). En canvi, si el color de la barreja resultés ser taronja o violeta, en aquest cas hauria d'afegir-se acetat de sodi 3 M a pH = 5,0 i barrejar fins que el color es torni groc. Seguidament, s'afegeix un volum d'isopropanol per cada volum de fragment de gel d'agarosa a la dissolució de mostra en tampó QG i es barreja. Es posiciona una columna QIAquick® *spin column* en un tub de 2 mL proporcionat en el propi lot, s'introdueix la mostra a la columna i se centrifuga a 13200 rpm durant 1 minut fins que tota la mostra ha passat per la columna i el DNA ha quedat unit a aquesta. Es descarta el líquid sobrant i es recol·loca la columna en el mateix tub. Per la purificació del DNA unit a la columna, es fa un rentat amb un volum de 750 µL de tampó PE mitjançant centrifugació a 13200 rpm durant 1 minut. Es descarta el líquid sobrant i es torna a centrifugar una vegada més la columna, aquest cop sense afegir res, a 13200 rpm durant 1 minut per tal d'eliminar qualsevol residu de tampó de rentat romanent. A continuació, es posiciona la columna en un tub de microcentrífuga de 1,5 mL net i, per a l'elució del DNA, s'afegeixen 50 µL d'aigua Milli-Q al centre de la columna, s'incuba a temperatura ambient durant 1 minut i, finalment, se centrifuga a 13200 rpm durant 1 minut per obtenir el DNA eluït en aigua en el tub de microcentrífuga de 1,5 mL.

6.1.3. Determinació de la concentració de DNA

La quantificació de la concentració de DNA de les mostres va realitzar-se en un instrument *NanoDrop*TM 1000 *Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific) carregant un volum de 1 μL per cada mesura. L'instrument proporciona els valors de concentració de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) i els quocients entre les absorbàncies a longituds d'ona de 260 nm i 280 nm ($A_{\lambda=260\text{nm}} / A_{\lambda=280\text{nm}}$) i entre els valors d'absorbància de longituds d'ona de 260 nm i 230 nm ($A_{\lambda=260\text{nm}} / A_{\lambda=230\text{nm}}$). Per DNA es consideren valors adequats de puresa del voltant de 1,8 per a la ràtio $A_{\lambda=260\text{nm}} / A_{\lambda=280\text{nm}}$ i compresos entre 2,0 i 2,2 per la ràtio $A_{\lambda=260\text{nm}} / A_{\lambda=230\text{nm}}$.

6.2. Anàlisi i separació de fragments de DNA en gels d'agarosa

Els fragments de DNA poden separar-se fàcilment en funció de la seva mida o massa molecular mitjançant electroforesi en gels d'agarosa.

6.2.1. Tampons per electroforesi de DNA en gels d'agarosa

Tampó TBE (Tris, borat i EDTA) 5x	Concentració o quantitat
Tris base	0,45 M
Àcid bòric (H_3BO_3)	0,44 M
Àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA); pH = 8,0	0,01 M
Àcid clorhídric (HCl)	q.s.p. pH = 8,3

Taula 28. Preparació de tampó TBE 5x per a electroforesi de DNA en gels d'agarosa. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó TBE (Tris, borat i EDTA) 5x.

Tampó TAE (Tris, acetat i EDTA) 10x	Concentració
Tris base	0,4 M
Àcid acètic ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) glacial	0,2 M
Àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA); pH = 8,0	0,01 M

Taula 29. Preparació de tampó TAE 10x per a electroforesi de DNA en gels d'agarosa. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó TAE (Tris, acetat i EDTA) 10x.

Tampó de càrrega (Loading Dye)	Concentració
Sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	1,17 M
Cianol de xilè ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$)	4,6 mM
Blau de bromofenol ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$)	3,7 mM

Taula 30. Preparació de tampó de càrrega per a electroforesi de DNA en gels d'agarosa. Components i concentracions corresponents per a la preparació de tampó de càrrega o *Loading Dye* per a DNA.

6.2.2. Elaboració de gels d'agarosa

Els gels d'agarosa per a l'anàlisi i la separació de fragments de DNA, a diferència dels gels de poliacrilamida per la separació de proteïnes, no es generen per polimerització, sinó que es formen per gelificació de l'agarosa. Els gels d'agarosa s'elaboren mitjançant prèvia solubilització per augment de la temperatura de la quantitat corresponent d'agarosa en tampó TBE o TAE i deixant-la gelificar a temperatura ambient en el suport corresponent amb el posicionament de la pinta o pintes necessàries per la formació dels pous per la posterior càrrega de les mostres en el gel. Tots els gels d'agarosa elaborats i utilitzats en aquest treball contenen un percentatge d'agarosa de l'1,5%. En el cas que els gels d'agarosa s'utilitzin únicament per la separació de bandes corresponents a diversos fragments de DNA de diferent mida i la seva posterior observació sense extracció del fragment de DNA en qüestió, aquests gels d'agarosa s'elaboren amb tampó amb àcid bòric TBE 0,5x. En canvi, si la finalitat de l'electroforesi de DNA en el gel d'agarosa consisteix en últim terme en l'extracció, purificació i obtenció del fragment de DNA en qüestió per al seu processament posterior, el gel d'agarosa s'elabora amb tampó amb àcid acètic TAE 1x. El volum dels gels a elaborar depèn del tipus de suport en què es deixi gelificar i es desenvolupi el gel. En aquest treball, van utilitzar-se suports de dues mides. Per a l'elaboració d'un gel d'agarosa a l'1,5% en un suport de mida petita, es dissolen 0,9 g d'agarosa en un volum de 60 mL de tampó TBE 0,5x o TAE 1x i per la tinció de DNA i l'observació posterior de bandes s'afegeixen 3 µL de SYBRTM Safe DNA Gel Stain (referència S33102, InvitrogenTM). Per elaborar un gel d'agarosa a l'1,5% en un suport de mida gran, es dissolen 2,1 g d'agarosa en un volum de 140 mL de tampó TBE 0,5x o TAE 1x i s'afegeixen 7 µL de SYBRTM Safe DNA Gel Stain.

6.2.3. Desenvolupament del gel d'agarosa i separació electroforètica de DNA

Per a la separació de fragments de DNA en el gel d'agarosa es carreguen les mostres de DNA amb tampó de càrrega (*loading dye*) en una proporció 9:1, respectivament, en els pous corresponents a cada carril del gel. En aquest treball van utilitzar-se dos marcadors de massa molecular, de 100 parells de bases (100bp DNA Ladder; Promega, referència G2101) i de 1 quilobase (1kb DNA Ladder; Promega, referència G5711). Per a la càrrega del marcador de massa molecular es barregen 5 µL de marcador amb 1,5 µL de tampó de càrrega o *loading dye*. La separació electroforètica de fragments de DNA es realitza mitjançant l'aplicació d'un voltatge constant de 120 V. Un cop portada a terme la separació dels fragments de DNA, poden observar-se les

diverses bandes del gel corresponent a cadascun d'ells mitjançant il·luminació amb llum ultraviolada.

6.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i tècniques derivades

6.3.1. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR, de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*) és una tècnica *in vitro* que consisteix en l'amplificació enzimàtica de DNA mitjançant una DNA polimerasa termoestable. La PCR és un mètode basat en l'aplicació de cicles tèrmics definits consecutius mitjançant successius processos alterns d'escalfament i refredament que donen lloc a la successió repetida de processos de desnaturalització, hibridació i extensió de DNA, donant lloc en última instància a la replicació enzimàtica de DNA. La reacció de PCR consta de DNA motlle, una DNA polimerasa termoestable, desoxinucleòtids trifosfat (dNTPs), un parell d'encebadors o *primers* i un tampó de reacció amb catió magnesi (Mg^{2+}). Els encebadors o *primers* són oligonucleòtids sintètics que delimiten la seqüència que es pretén amplificar, essent, per tant, específics del gen a amplificar en qüestió, i són dos: l'encebador d'avançament o *primer forward* i l'encebador revers o *primer reverse*. A cada cicle de PCR es duplica ($2^1 = 2$ còpies) el nombre de còpies del DNA diana, de forma que al cap de, per exemple, 20 cicles de PCR ($2^{20} = 1\,048\,576$ còpies) s'obté un nombre superior al milió de còpies del DNA motlle.

Els components de la reacció en cadena de la polimerasa o PCR per a un volum final de reacció de 50 μ L són els següents:

Component	Volum (μ L)
Aigua Milli-Q (H_2O)	35
Tampó <i>Phusion</i> 5 \times	10
Desoxinucleòtids trifosfat (dNTPs) 10 mM/cadascun (dATP 10 mM + dCTP 10 mM + dGTP 10 mM + dTTP 10 mM) dNTP Mix (referència U1515, Promega)	1
DNA motlle (10 ng μ L ⁻¹)	1
Encebador d'avançament o <i>primer forward</i> (20 μ M)	1,25
Encebador revers o <i>primer reverse</i> (20 μ M)	1,25
<i>Phusion</i>TM High-Fidelity DNA Polymerase (2 U μ L ⁻¹) (referència F-530XL, ThermoFisher Scientific)	0,5

Taula 31. Reacció en cadena de la polimerasa o PCR. Components i volums corresponents per a la preparació d'una reacció en cadena de la polimerasa o PCR per a l'amplificació de fragments de DNA.

De forma general, el programa tèrmic d'una reacció de PCR estàndard pot descriure's de la següent manera: una desnaturalització inicial a una temperatura de 94–98 °C durant 30 segons; seguida d'un nombre d'entre 20 i 40 cicles consistents en una desnaturalització a 94–98 °C durant 10 segons, seguida d'una hibridació a una temperatura de 50–72 °C (en funció de les característiques dels encebadors o *primers*, segons cada cas concret) durant 30 segons, seguida al seu torn d'una fase d'elongació o extensió a una temperatura de 72 °C durant un temps determinat per la longitud del DNA motlle a amplificar a raó de 30 s kb⁻¹. Un cop transcorreguts tots els cicles de duplicació de DNA, la reacció finalitza amb una darrera fase d'elongació a una temperatura de 72 °C durant 7 minuts i el producte de la reacció és conservat a una temperatura de 4 °C.

6.3.2. Reacció en cadena de la polimerasa de seqüenciació (PCR de seqüenciació)

La reacció de PCR de seqüenciació proporciona fragments de DNA de diversa longitud amb resolució d'un nucleòtid que permet l'obtenció de la seqüència de nucleòtids del DNA en qüestió. La reacció en cadena de la polimerasa de seqüenciació es basa en la utilització de didesoxinucleòtids trifosfat fluorescents sense el grup hidroxil a la posició 3', de forma que després de la incorporació del didesoxinucleòtid trifosfat a l'elongació de la cadena té lloc de forma inevitable la terminació de la incorporació de nucleòtids i, per tant, la finalització de la polimerització de la cadena de DNA i de l'elongació de la cadena. Com a resultat d'aquesta reacció, es generen fragments de DNA de diferent longitud en què l'últim nucleòtid incorporat és el didesoxinucleòtid responsable de la terminació de l'elongació de la cadena i que, al seu torn, està marcat amb un fluoròfor assignat a cadascuna de les nucleobases dels diversos didesoxinucleòtids utilitzats a la reacció (ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP). Com a resultat de la reacció de PCR de seqüenciació es genera una barreja amb tots els fragments de totes les longituds possibles amb resolució d'un nucleòtid, de forma que després de la seva separació mitjançant electroforesi capil·lar i la seva posterior excitació amb il·luminació làser és possible elucidar la seqüència del DNA mitjançant la generació d'un electrofluorograma. Per a la realització de la reacció de PCR de seqüenciació en aquest treball va utilitzar-se el lot comercial *Applied Biosystems*TM *BigDye*[®] *Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing Kit* (referència *Applied Biosystems*TM 43–374–55, Fisher Scientific) i oligonucleòtids específics (*Sigma-Aldrich*) d'avançament o *forward* (5'–3') i revers o *reverse* (3'–5'); per separat, només un dels dos per reacció.

Component	Quantitat
Aigua Milli-Q (H ₂ O)	q.s.p. 15 µL
Tampó de seqüenciació <i>BigDye</i> ® 5×	3 µL
Encebador o <i>primer</i> CMV-pcDNA3 <i>Forward</i> 1,6 pmol (estoc 25 µM)	1 µL
DNA motlle	100 ng kb ⁻¹
<i>BigDye</i>® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix <i>Taq</i> polimerasa	1 µL

Taula 32. Reacció en cadena de la polimerasa o PCR de seqüenciació. Components i volums corresponents per a la preparació d'una reacció en cadena de la polimerasa o PCR per a la seqüenciació de fragments de DNA.

El programa tèrmic de la reacció de PCR de seqüenciació consisteix en una desnaturalització inicial a una temperatura de 96 °C durant 5 minuts; seguida de 25 cicles formats per una seqüència de desnaturalització a 96 °C durant 10 segons, seguida d'una fase d'hibridació a 55 °C durant 5 segons, i al seu torn, seguida d'una fase d'elongació o extensió a una temperatura de 60 °C durant 4 minuts. Finalment, una vegada transcorreguts aquests 25 cicles, la reacció finalitza amb una etapa d'elongació final a 60 °C durant 15 minuts i la posterior conservació de la mostra a una temperatura de 4 °C.

6.4. Clonatge de gens

Mitjançant les tècniques de clonatge de gens o clonatge molecular és possible la generació de plasmidis de DNA, és a dir, fragments de DNA circular, normalment vectors, amb el gen d'interès contingut a l'interior de la seva seqüència. El fet de disposar d'un gen d'interès contingut a la seqüència d'un plasmidi de DNA circularitzat o vector possibilita la seva posterior amplificació en bacteris competents.

6.4.1. Digestió enzimàtica de DNA amb endonucleases o enzims de restricció

En primer lloc, és necessari escollir correctament les dianes de restricció adequades per dur a terme la digestió de DNA de forma exitosa. Primer, és imprescindible escollir dos enzims de restricció diferents, un per cada extrem de l'insert que es pretén clonar. Segon, els enzims de restricció escollits han de generar extrems cohesius tant al plasmidi com a l'insert, amb la finalitat de minimitzar possibles fenòmens de recircularització no desitjats. Tercer i últim, és necessari escollir dianes de restricció que es trobin al lloc de restricció múltiple (en anglès *Multiple Cloning Site* o *MCS*, o regió *polylinker*) del vector; però que, alhora, aquestes mateixes dianes de restricció no es trobin contingudes a la seqüència de l'insert. Per a l'elecció dels enzims de

restricció adients per a la digestió tant de vectors com d'inserts va utilitzar-se en aquest treball l'eina bioinformàtica *NEBcutter V2.0* (New England Biolabs® Inc.).

El tampó de restricció a utilitzar es tria en funció dels dos enzims de restricció utilitzats, havent de ser compatible i tenir un funcionament òptim per ambdós enzims alhora. La reacció de digestió de DNA amb endonucleases o enzims de restricció es porta a terme a una temperatura de 37 °C durant un període de 4 hores. La proporció de components per a la realització de la reacció de digestió de DNA és la que es detalla a continuació a la següent taula:

Component	Vector o plasmidi de DNA circular (1 µg µL ⁻¹)	Insert
Aigua Milli-Q (H ₂ O)	15 µL	0 µL
Tampó de restricció ζ ? 10x	2 µL	2 µL
DNA	1 µL	16 µL
Enzim de restricció 1	1 µL	1 µL
Enzim de restricció 2	1 µL	1 µL

Taula 33. Reacció de digestió de fragments de DNA amb enzims de restricció. Components i volums corresponents per a la preparació d'una reacció de digestió de fragments de DNA mitjançant la utilització d'enzims de restricció.

6.4.2. Lligació de DNA

Amb l'objectiu d'introduir el gen d'interès corresponent a l'insert en el vector o plasmidi de DNA circular un cop digerits amb enzims de restricció es duu a terme la reacció de lligació de DNA, en què es lliguen els extrems generats a l'insert amb els extrems generats al vector, en ambdós casos com a conseqüència de l'activitat enzimàtica d'endonucleases. No obstant, abans de realitzar el procés de lligació com a tal, és precís portar a terme la desfosforilació de l'extrem 3' del vector ja digerit per evitar possibles fenòmens de recircularització o autolligació del vector sense la incorporació de l'insert amb el gen d'interès. El tractament amb fosfatasa alcalina es realitza a una temperatura de 37 °C durant 1 hora, seguint la següent proporció de components:

Component	Vector o plasmidi de DNA circular
Aigua Milli-Q (H ₂ O)	1,5 µL
Tampó de fosfatasa alcalina 10x	3 µL
DNA	25 µL
Fosfatasa alcalina	0,5 µL

Taula 34. Reacció de desfosforilació de fragments de DNA a l'extrem 3'. Components i volums corresponents per a la preparació d'una reacció de 3'-desfosforilació de fragments de DNA.

La reacció de lligació és portada a terme per l'enzim DNA ligasa que catalitza la formació d'un enllaç fosfodièster entre un grup 5'-fosfat i un grup 3'-hidroxil. En la lligació de DNA és convenient utilitzar diverses ràtios vector:insert; tractant-se de ràtios 1:1 i 1:3 en el cas de fragments amb extrems roms, i de ràtios 1:3 i 1:5 en el cas d'extrems protuberants. En tots els casos, tant amb extrems roms com amb extrems protuberants, també es duu a terme una ràtio 1:0, això és, en total absència d'insert, com a control negatiu de lligació i control d'absència d'autorelligació del propi vector sense l'insert. Per calcular la quantitat d'insert corresponent a la quantitat de vector aplicada a la reacció de lligació, amb independència de la ràtio aplicada, es realitza el següent càlcul:

$$m_{insert}(ng) = m_{vector}(ng) \cdot \frac{longitud_{insert}(kb)}{longitud_{vector}(kb)} \cdot ràtio (insert:vector)$$

La reacció de lligació de DNA es realitza o bé a una temperatura de 37 °C durant un període de 2 hores, o bé a una temperatura de 4 °C durant tota la nit.

Component	Quantitat
Aigua Milli-Q (H ₂ O)	q.s.p. 10 µL
Tampó de lligació 10×	1 µL
Vector o plasmidi de DNA circular	100 ng
Insert	q.s.p. 100 ng vector segons ràtio
T4 DNA ligasa	0,7 µL

Taula 35. Reacció de lligació de fragments de DNA. Components i volums corresponents per a la preparació d'una reacció de lligació de diversos fragments de DNA.

6.5. Amplificació de plasmidis de DNA

Amb l'objectiu d'amplificar i obtenir grans quantitats de plasmidis de DNA amb un gen d'interès una vegada ja clonat a l'interior de la seva seqüència s'utilitza la maquinària bacteriana de replicació de DNA; es requereix, per tant, la generació i l'obtenció de bacteris competents, la transformació d'aquests bacteris amb el plasmidi que es pretén amplificar i, finalment, l'aïllament i l'obtenció del plasmidi d'interès un cop ja amplificat en bacteris.

6.5.1. Generació i obtenció de bacteris competents

Els bacteris competents són bacteris adaptats i propensos a la incorporació de DNA heterogen exogen, de forma que són una bona eina per a la transformació i l'amplificació ràpida i altament eficaç de plasmidis

recombinants en clonatge molecular. Per generar i obtenir bacteris competents és necessari disposar de brou de lisogènia o medi LB (de l'anglès, *Lysogeny Broth*), brou superòptim o medi SOB (de l'anglès, *Super Optimal Broth*), medi RF1 i medi RF2. En aquest treball van utilitzar-se com a bacteris competents *Escherichia coli* XL1-Blue. És imprescindible treballar en tot moment en condicions d'esterilitat sota la flama del bec Bunsen.

Brou de lisogènia o medi LB (<i>Lysogeny Broth</i>)	Concentració o quantitat
Triptona	1% (m/V)
Extracte de llevat	0,5% (m/V)
Clorur de sodi (NaCl)	1% (m/V)
Hidròxid de sodi (NaOH) 2 M	q.s.p. pH = 7,4

Taula 36. Preparació de brou de lisogènia (medi LB). Components i concentracions corresponents per a la preparació de brou de lisogènia o medi LB per al cultiu i creixement de bacteris.

Brou superòptim o medi SOB (<i>Super Optimal Broth</i>)	Concentració o quantitat
Triptona	2% (m/V)
Extracte de llevat	0,5% (m/V)
Clorur de sodi (NaCl)	10 mM
Clorur de potassi (KCl)	2,5 mM
Clorur de magnesi hexahidratat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) *	5 mM
Sulfat de magnesi heptahidratat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) *	5 mM

* Han d'afegir-se *a posteriori* respecte dels demés components previs, la barreja prèvia dels quals ha de ser autoclavada prèviament a l'addició d'aquests dos últims components, els quals al seu torn han de ser també prèviament esterilitzats per separat encara que en aquest cas mitjançant filtració amb una mida de porus de 0,22 µm de diàmetre.

Taula 37. Preparació de brou superòptim (medi SOB). Components i concentracions corresponents per a la preparació de brou superòptim o medi SOB per al cultiu i creixement de bacteris competents.

Medi RF1	Concentració o quantitat
Clorur de rubidi (RbCl)	100 mM
Clorur de manganès (II) tetrahidratat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mM
Acetat de potassi (CH_3CO_2K) 1 M; pH = 7,5	30 mM
Clorur de calci ($CaCl_2$)	10 mM
Glicerol ($C_3H_8O_3$)	15% (m/V)
Àcid acètic (CH_3CO_2H) 0,2 M	q.s.p. pH = 5,8

Taula 38. Preparació de medi RF1. Components i concentracions corresponents per a la preparació de medi RF1 per a la generació i l'obtenció de bacteris competents.

Medi RF2	Concentració o quantitat
Àcid 3-(N-morfolino)propanosulfònic o MOPS (C ₇ H ₁₅ NO ₄ S) 0,5 M; pH = 6,8	10 mM
Clorur de rubidi (RbCl)	10 mM
Clorur de calci (CaCl ₂)	75 mM
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	15% (m/V)
Àcid acètic (CH ₃ CO ₂ H) 0,2 M	q.s.p. pH = 6,8

Taula 39. Preparació de medi RF2. Components i concentracions corresponents per a la preparació de medi RF2 per a la generació i l'obtenció de bacteris competents.

Per generar i obtenir bacteris competents es realitza un creixement bacterià de *Escherichia coli* XL1-Blue en un volum de 3 mL de medi LB a una temperatura de 37 °C i en agitació durant tota la nit. El matí següent, s'innocula 1 mL d'aquest creixement bacterià en un volum de 50 mL de medi SOB i s'incuba a 37 °C en agitació. En intervals de temps d'entre 15 i 30 minuts, es prenen alíquotes d'aquest creixement, sempre en condicions d'esterilitat, i es determina la seva absorbància a una longitud d'ona de 550 nm. Una vegada la densitat òptica del creixement assoleix valors d'entre 0,375 i 0,4; això implica que el cultiu es troba en fase exponencial de creixement i que és òptim per a l'obtenció de bacteris competents. En aquest moment, es divideix el creixement en dos tubs a parts iguals i s'incuben en gel durant 15 minuts. A continuació, se centrifuguen els tubs a 3000 revolucions per minut durant 15 minuts a una temperatura de 4 °C. Es descarta el sobrenedant, es resuspèn el sediment en una tercera part (1/3 V₀) respecte el volum inicial de creixement de medi RF1 i s'incuba en gel durant 20 minuts. Seguidament, es realitza una altra centrifugació a 3000 rpm durant 15 minuts a 4 °C. Torna a descartar-se el sobrenedant i es resuspèn el sediment en dues vint-i-cinques parts (2/25 V₀) de medi RF2 respecte el volum inicial de creixement. Finalment, els bacteris són incubats en gel durant 15 minuts més; i en aquest punt, ja poden utilitzar-se directament per a transformació, o bé poden ser alíquotats, congelats ràpidament en nitrogen líquid i conservats a una temperatura de – 80 °C.

6.5.2. Transformació de bacteris competents i amplificació de DNA

La transformació de bacteris competents és el procés pel qual és possible introduir material genètic exogen, normalment DNA, en bacteris. En el cas d'aquest treball, tots els processos de transformació bacteriana es van portar a terme per xoc tèrmic. Per dur a terme el procés de transformació és necessari disposar de plaques d'agar per a cultiu bacterià.

Plaques d'agar	Concentració
Triptona	1% (m/V)
Extracte de llevat	0,5% (m/V)
Clorur de sodi (NaCl)	1% (m/V)
Agar	1% (m/V)
Ampicil·lina	100 µg mL ⁻¹

Taula 40. Preparació d'agar per a plaques de cultiu bacterià. Components i concentracions corresponents per a la preparació de plaques d'agar per al cultiu de bacteris i l'aïllament de colònies bacterianes.

El procediment de transformació s'inicia amb la descongelació dels bacteris competents, conservats a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en gel. A continuació, se'ls afegeix el DNA amb què es pretén transformar els bacteris i, després d'una breu agitació manual suau, s'incuben en gel durant 15 minuts. Seguidament, se sotmeten els bacteris a xoc tèrmic a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 1 minut i 30 segons. Un cop transcorregut aquest minut i mig, s'incuben els bacteris en gel durant 2 minuts i després se'ls afegeix un volum de 1 mL de medi LB prèviament temperat a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Després de l'addició de medi LB, es realitza una incubació a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitació durant un període de 1 hora. A continuació, se centrifuguen els bacteris a 3400 revolucions per minut a una temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 5 minuts. Es descarten aproximadament uns 800 µL de sobrenedant i es resuspèn el sediment en el volum romanent que és de poc més de 250 µL. Es procedeix a la sembra d'aquest volum en una placa d'agar prèviament temperada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, i s'incuba a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant tota la nit. El matí del dia següent, es piquen colònies individuals (a cada colònia picada li correspon un creixement independent) per al seu creixement en 3 mL de medi LB suplementat amb ampicil·lina $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant tota la nit en agitació. A partir d'aquest cultiu, ja és possible extreure, aïllar, purificar i obtenir DNA plasmídic segons el procediment de **miniprep**. En el cas que es pretengui obtenir quantitats majors de DNA (**midiprep**), es requereix la realització d'un tercer creixement bacterià de major volum en un matràs d'Erlenmeyer estèril a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitació durant una nit més. Generalment, en aquest treball, aquest tipus de creixement va realitzar-se en un volum de 50 mL de medi LB amb 50 µL d'ampicil·lina $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (realitzant, per tant, una dilució 1:1000 resultant en una concentració de $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) i inoculant un volum de 150 µL del cultiu bacterià previ.

6.5.3. Extracció, aïllament, purificació i obtenció de DNA plasmídic

En l'elaboració d'aquest treball van realitzar-se extraccions i aïllament de DNA plasmídic amplificat en bacteris seguint procediments de tipus **miniprep** i **midiprep**. Per a la realització d'extraccions de tipus **miniprep** va utilitzar-se el lot comercial Wizard® Plus SV *Minipreps* DNA Purification

System (referències A1270, A1330, A1340, A1460 y A1470; Promega), i per dur a terme extraccions de tipus **midiprep** va usar-se el lot comercial NucleoBond® Xtra Midi Plus DNA Plasmid Purification Kit (referència 22740412.50; Macherey-Nagel, Cultek).

6.5.3.1. Obtenció de minipreps

L'obtenció de *minipreps* segons el procediment del lot comercial Wizard® Plus SV *Minipreps DNA Purification System* es realitza segons els passos que es descriuen a continuació. En primer lloc, es duu a terme la lisi dels bacteris que contenen el plasmidi de DNA d'interès ja amplificat. Se centrifuga un volum de creixement bacterià comprès entre 1 i 10 µL a una velocitat de 3400 revolucions per minut durant 5 minuts. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el sediment en 250 µL de solució de resuspensió de cèl·lules (*Cell Resuspension Solution*). A continuació, s'afegeixen 250 µL de solució de lisi de cèl·lules (*Cell Lysis Solution*) i es barreja per inversió fins a 4 vegades. S'afegeixen 10 µL de solució de proteasa alcalina (*Alkaline Protease Solution*) i torna a barrejar-se per inversió quatre vegades. S'incuba la preparació a temperatura ambient durant 5 minuts i s'afegeixen 350 µL de solució de neutralització (*Neutralization Solution*) i es barreja per inversió fins a quatre vegades un altre cop. Seguidament, se centrifuga la preparació a 13200 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient. Una vegada portada a terme la lisi bacteriana, es procedeix a la unió de DNA plasmídic a la columna. Primer, es posiciona la columna en un tub de recol·lecció i es decanta el lisat a la columna. Se centrifuga la columna amb el lisat al seu interior a una velocitat de 13200 rpm durant 1 minut a temperatura ambient, i es descarta el líquid sobrant. Després d'unir el DNA plasmídic a la columna, es realitza un procés de rentat d'aquest. Per això, s'afegeixen 750 µL de solució de rentat (*Wash Solution*) (prèviament suplementat amb etanol), se centrifuga a 13200 rpm durant 1 minut i es descarta el líquid sobrant. S'afegeixen 250 µL més de solució de rentat i se centrifuga a 13200 rpm durant 1 minut i tornar a descartar-se el líquid sobrant. A continuació, sense afegir res més, es realitza una altra centrifugació a 13200 rpm durant 2 minuts a temperatura ambient amb la finalitat d'eliminar qualsevol residu romanent de solució de rentat. El quart i últim pas del procediment consisteix en l'elució del DNA plasmídic de la columna. Es transfereix la columna a un tub estèril de 1,5 mL de capacitat. S'afegeix un volum de 50 µL d'aigua lliure de nucleases just al centre de la columna i s'incuba a temperatura ambient durant 1 minut. A continuació, se centrifuga a 13200 rpm durant 1 minut a temperatura ambient, es descarta la columna i es conserva el DNA eluït i recol·lectat en el tub estèril de 1,5 mL a una temperatura de – 20 °C.

6.5.3.2. *Obtenció de midipreps*

Per obtenir preparacions *midí* o *midipreps* de DNA plasmídic mitjançant la utilització del lot comercial NucleoBond® Xtra *Midí Plus DNA Plasmid Purification Kit* en aquest treball va seguir-se el procediment que es detalla seguidament. En primer lloc, es realitza la centrifugació del volum de 50 mL corresponent al cultiu bacterià en un matràs de Erlenmeyer a una velocitat de 6000 revolucions per minut, a una temperatura de 4 °C i durant un període de 15 minuts; en una ultracentrífuga amb un rotor SA-600 (Sorvall Instruments). Un cop finalitzada la centrifugació, es descarta el sobrenedant i s'afegeixen 4 mL de tampó S1, que conté RNAsa A, per resuspendre el sediment resultant. A continuació, s'afegeixen 4 mL de tampó S2 per lisar els bacteris, es barreja suaument per inversió entre 6 i 8 vegades i s'incuba a temperatura ambient durant entre 2 i 3 minuts. S'afegeixen 4 mL de tampó S3 i, novament, es barreja gentilment per inversió entre 6 i 8 vegades, i s'incuba la mostra en gel durant 5 minuts. Es procedeix al muntatge del sistema format per la columna, l'embut i el filtre. Una vegada finalitzat aquest muntatge, s'afegeix al sistema un volum de 2,5 mL de tampó N2 per equilibrar la columna. Un cop la columna ja està equilibrada i deixa de caure tampó N2 a través d'ella, es transfereix la mostra al filtre a l'embut per a que passi per la columna, i es deixa caure tot el contingut per gravetat, podent tardar aquest procés aproximadament uns 20 minuts. S'afegeixen 10 mL de tampó de rentat N3 i també es deixa caure tot el contingut a través de la columna per gravetat, procés que tarda aproximadament entre 5 i 10 minuts. Seguidament, s'afegeixen 5 mL de tampó d'elució N5 i es deixa caure per gravetat. S'afegeixen 3,5 mL d'isopropanol per precipitar el DNA, que es torna visible formant un tel blanc; i es barreja suaument. Es realitza una centrifugació a 10200 revolucions per minut a 4 °C durant 30 minuts, i es descarta el sobrenedant. A continuació, s'afegeixen 2 mL d'etanol 70%, es recupera el sediment que és transferit a un tub estèril de 2 mL de capacitat. S'agita breument al vòrtex i se centrifuga a 13200 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient. Finalment, es descarta l'etanol i es deixa assecar el sediment durant aproximadament 10 minuts. Es resuspèn el sediment en un volum de l'ordre de 50 – 100 µL d'aigua lliure de nucleases i pot conservar-se a – 20 °C.

6.6. *Generació i obtenció del gen CDA contingut en el vector de treball pcDNA3*

Va rebre's el DNA corresponent al gen *CDA* contingut en el plàsmid pLenti-puro_CDA_ires_dsRED procedent del laboratori dirigit pel Dr. Skirmantas Kriaucionis. Va resuspendre's 1 µg de DNA corresponent al plàsmid amb *CDA* en 80 µL d'aigua lliure de DNases i RNases. En quantificar

la concentració de DNA resultant van obtenir-se concentracions pràcticament indetectables i per aquesta raó van transformar-se bacteris competents amb l'objectiu d'amplificar el DNA que s'havia extret. A continuació, va amplificar-se el DNA resultant de la transformació mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb *primers* específics per *CDA* (**Taula 41**). Els *primers* específics escollits per l'amplificació de *CDA* van ser els següents:

Primer Forward (diana de restricció: *HindIII*)

5' – CCCAAGCTTATGGCCAGGAAGCGTCCTGCCTGCA –3'

Primer Reverse (diana de restricció: *EcoRI*)

5' – CCGGAATTCTCACTGAGTCTTCTGCAGGTCCTCA –3'

Primer	Diana de restricció	Massa molecular (g mol ⁻¹)	T _m (°C)	% GC	Estructura secundària	Dímers d'òligos	Nombre de bases
<i>Forward</i>	<i>HindIII</i>	7322,7	74,8	58,4	Moderada	No	24
<i>Reverse</i>	<i>EcoRI</i>	8859,6	74,8	51,8	Moderada	No	29

Taula 41. Encebadors o primers per a l'amplificació de CDA. Característiques fisicoquímiques dels encebadors (*primers*) seleccionats per a la reacció d'amplificació del DNA del gen *CDA* mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

L'amplificació del DNA corresponent al gen *CDA* portada a terme mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR) va realitzar-se en un volum final de reacció de 50 µL i amb la següent proporció de components (**Taula 42**):

Component	Volum (µL)
H ₂ O	35
<i>Phusion Buffer</i> 5×	10
dNTPs 10 mM	1
DNA (<i>CDA</i>) (10 ng µL ⁻¹)	1
<i>Primer Forward</i> (20 µM)	1,25
<i>Primer Reverse</i> (20 µM)	1,25
<i>Phusion DNA</i> polimerasa	0,5

Taula 42. Preparació de la PCR per al gen CDA. Components de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per amplificar el fragment de DNA corresponent al gen *CDA*.

Pel que fa a la seqüència de cicles d'amplificació de PCR el protocol escollit fou el de dues etapes en ser pràcticament iguals les temperatures d'hibridació i d'extensió, que són de 72 °C (**Taula 43**).

Etapa	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	98 °C	30 s	1
Desnaturalització	98 °C	10 s	30
Hibridació	72 °C	30 s	
Extensió	72 °C	15 s	
Extensió final	72 °C	10 s	1
	4 °C	∞	

Taula 43. Etapes de la PCR per a l'amplificació de CDA. Esquema de les diverses etapes de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per l'amplificació del DNA del gen *CDA*. En aquesta taula es mostren cadascuna de les successives etapes de la reacció, així com la seva temperatura, la seva durada i el nombre de cicles de cadascuna d'elles.

Una vegada amplificat per PCR, va purificar-se el DNA resultant mitjançant el kit de purificació de DNA *Clean&Concentrator* (Zymo Research) en un volum de 20 µL. Per comprovar si la reacció d'amplificació havia tingut lloc correctament van carregar-se 100 ng de DNA del producte resultant en un gel d'agarosa 1,5%. Per a la càrrega de 100 ng de DNA va quantificar-se prèviament la concentració de DNA del producte resultant de la reacció de PCR que va resultar ser de 135,1 ng µL⁻¹. Per tant, 100 ng de DNA del producte corresponien a 0,74 µL que va ser el volum que va carregar-se al gel d'agarosa per a la comprovació de l'èxit de la digestió del DNA (**Figura 37**).

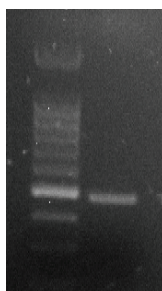


Figura 37. Amplificació i aïllament del fragment de DNA corresponent al gen CDA. Imatge del gel d'agarosa corresponent a la comprovació de l'èxit de l'amplificació del fragment de DNA corresponent al gen *CDA* (441 parells de bases). La banda que s'observa clarament justament per sota de la banda corresponent a 500 parells de bases del marcador de pes molecular correspon a *CDA* (441 parells de bases).

A continuació, va digerir-se tant el producte d'amplificació de *CDA* com el vector pcDNA3 amb els enzims de restricció *HindIII* y *EcoRI* (**Taula 44**).

	pcDNA3 (1 µg µL ⁻¹)	<i>CDA</i>
H ₂ O	15 µL	0 µL
Tampó de restricció B 10×	2 µL	2 µL
DNA (<i>CDA</i>)	1 µL	16 µL
<i>HindIII</i>	1 µL	1 µL
<i>EcoRI</i>	1 µL	1 µL

Taula 44. Reacció de digestió del fragment de DNA corresponent a CDA mitjançant enzims de restricció. Components de la reacció de digestió dels DNA per la generació dels extrems protuberants respectius corresponents al vector pcDNA3 i a l'extracte del gen *CDA* amb els enzims de restricció *HindIII* y *EcoRI*.

La digestió del DNA amb enzims de restricció va dur-se a terme a una temperatura de 37 °C durant 4 hores. Un cop realitzada la digestió del DNA, amb l'objectiu d'evitar fenòmens d'autorelligació, va desfosforilar-se l'extrem 3' del vector pcDNA3 digerit mitjançant tractament amb fosfatasa alcalina durant 1 hora a una temperatura de 37 °C. En aquest punt, és crucial realitzar el tractament amb fosfatasa alcalina únicament en el vector en què es desitja insertar el fragment de DNA corresponent al gen d'interès que es pretén clonar. Del contrari, si s'hagués tractat al seu torn l'insert amb fosfatasa alcalina, l'extrem 3' d'aquest quedaria igualment desfosforilat i la reacció de lligació no podria arribar a produir-se mai (**Taula 45**).

pcDNA3	
H ₂ O	1,5 µL
Tampó de fosfatasa alcalina 10×	3 µL
DNA (CDA)	25 µL
Fosfatasa alcalina	0,5 µL

Taula 45. Reacció de 3'-desfosforilació de fragments de DNA. Components de la reacció de desfosforilació de l'extrem 3' del vector pcDNA3 linealitzat mitjançant digestió amb enzims de restricció.

Un cop acabada la reacció, va purificar-se el DNA resultant de la reacció mitjançant el lot de purificació de DNA *Clean&Concentrator* (Zymo Research) en un volum de 20 µL novament. A continuació, va portar-se a terme la reacció de lligació dels DNA lineals corresponents al gen *CDA* i al vector pcDNA3 linealitzat amb el seu extrem 3' desfosforilat. La lligació de fragments de DNA es duu a terme utilitzant diferents combinacions de proporcions de DNA entre l'insert i el vector en funció de la tipologia dels extrems generats a partir de la reacció de digestió del DNA. Si la digestió de DNA dóna com a resultat extrems roms, les combinacions utilitzades de proporcions de DNA entre vector i insert, respectivament, són 1:1 i 1:3. En canvi, si els enzims de restricció utilitzats a la reacció de digestió generen extrems protuberants, les combinacions emprades són 1:3 i 1:5. En ambdós casos, també s'aplica la combinació 1:0, és a dir, absència d'insert, com a control d'absència d'autolligació. Donat que els enzims de restricció *EcoRI* i *HindIII* generen extrems protuberants, la combinació de proporcions insert:vector fou 1:3 i 1:5. A la reacció de lligació la quantitat de vector utilitzada, en aquest cas concret pcDNA3, fou de 100 ng de DNA. Per introduir a la reacció la quantitat equivalent de DNA corresponent a l'insert s'ha de tenir en compte la diferent mida dels dos fragments en nombre de parells de bases. Tenint en compte que la longitud del vector pcDNA3 és de 5,4 kilobases i la del gen *CDA* és de 441 parells de bases, a 100 ng de DNA del vector pcDNA3 li corresponen 8,16 ng de DNA del gen *CDA*. Pel que fa al volum de DNA de vector pcDNA3, després de quantificar la concentració del DNA purificat corresponent i en resultar aquesta de 55,5 ng µL⁻¹, 100 ng de DNA

corresponen a 1,80 μL . En el cas dels volums de DNA d'insert corresponents a les combinacions 1:3 i 1:5, en ser la concentració de DNA 52,9 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, van resultar ser de 0,46 μL i 0,77 μL , respectivament (**Taula 46**).

	1:0	1:3	1:5
H ₂ O	6,50 μL	6,04 μL	5,73 μL
Tampó de lligació 10x	1 μL	1 μL	1 μL
Vector pcDNA3	1,80 μL	1,80 μL	1,80 μL
Insert <i>CDA</i>	0 μL	0,46 μL	0,77 μL
T4 DNA ligasa	0,7 μL	0,7 μL	0,7 μL

Taula 46. Reacció de lligació de DNA de CDA. Components de la reacció de lligació entre l'insert corresponent al gen *CDA* i el vector pcDNA3 linealitzat.

En aquest cas, no va procedir-se a la purificació del DNA a partir del producte resultant de la reacció de lligació. A partir del propi producte de la reacció, va realitzar-se la transformació de 100 μL de bacteris competents amb 10 μL de producte. Posteriorment, van seleccionar-se dues colònies aïllades per cadascuna de les combinacions, 1:3 i 1:5, per fer creixements successius per a l'amplificació del DNA corresponent al vector pcDNA3 amb l'insert corresponent al gen *CDA* ja clonat al seu interior. Va procedir-se a la seqüenciació dels quatre DNA resultants per comprovar la correcta inserció de la seqüència corresponent al gen *CDA* en el vector pcDNA3 i l'absència d'errors o variacions a la seqüència del propi gen. Amb aquesta finalitat, va dur-se a terme una reacció en cadena de la polimerasa (PCR) de seqüenciació en un volum final de 15 μL i una temperatura d'hibridació de 55 °C (**Taula 47**).

Component	Quantitat
H ₂ O	q.s.p. 15 μL
Tampó <i>BigDye</i> 5x	3 μL
Primer CMV-pcDNA3 <i>Forward</i> 1,6 pmol (estoc 25 μM)	1 μL
DNA (<i>CDA</i>)	100 ng
<i>Taq</i> Mix	1 μL

Taula 47. Reacció de PCR de seqüenciació de CDA. Components de la reacció de PCR de seqüenciació dels DNA obtinguts corresponents al vector pcDNA3 ja recircularitzat amb l'insert corresponent a la seqüència del gen *CDA* clonat al seu interior.

Els productes obtinguts a partir de la reacció de PCR de seqüenciació foren enviats al servei de seqüenciació dels serveis científicotècnics i tecnològics de la Universitat de Barcelona per a l'obtenció de sengles seqüències. La seqüència CDS del gen *CDA* és la següent:

atggcccagaagecgtcctgctgcaccctgaagcctgagtggtggtccagcagctgctggt
 ttgctcccaggaggccaagcagtcagcctactgcccctacagtcactttcctgtggggg
 ctgccctgctcaccaggagggggagaatcttcaaaggggtgcaacatagaaaatgctgc
 taccgcgtgggcatctgtgctgaacggaccgctatccagaaggcgtctcagaagggtg
 caaggatttcagggaattgctatcgccagtgacatgcaagatgattttatctctccat
 gtggggcctgcaggcaagtcatgagagagtttggcaccactggcccgtgtacatgacc
 aagccggatggtacgtatattgtcatgacgggtccaggagctgctgcccctcctcctttgg
 gcctgaggacctgcagaagactcagtga

Les seqüències obtingudes per als diferents productes van ser les que es detallen successivament a continuació:

pcDNA3–CDA; combinació 1:3, mostra 1

TTTAGCGAGCTCTCTGGCTACTAGAGNACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATA
 CGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTT**ATGGCCCAGA**
AGCGTCCTGCCTGCACCCTGAAGCTGAGTGTGTCCAGCAGCTGCTGGTTTGCTCCCAG
GAGGCCAAGCAGTCAGCCTACTGCCCTACAGTCACTTTCCTGTGGGGCTGCCCTGCT
CACCCAGGAGGGGAGAATCTTCAAAGGGTGCAACATAGAAAATGCCTGCTACCCGCTGG
GCATCTGTGCTGAACGGACCGCTATCCAGAAGGCCGTCTCAGAAGGGTACAAGGATTTT
AGGGCAATTGCTATCGCCAGTGACATGCAAGATGATTTTATCTCTCCATGTGGGGCCTG
CAGGCAAGTCATGAGAGAGTTTGGCACCAACTGGCCCGTGTACATGACCAAGCCGGATG
GTACGTATATTGTATGACGGTCCAGGAGCTGCTGCCCTCCTCTTTGGGCCTGAGGAC
CTGCAGAAGACTCAGTGAGAAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTC
 TAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT
 CTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTC
 CTTTCCATAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCT
 GGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG
 CTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGG
 GGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCG
 CA

pcDNA3–CDA; combinació 1:3, mostra 2

CAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTT**ATGGCCCAGAAGCGTCCTGCCTGCACCCTG**
AAGCCTGAGTGTGTCCAGCAGCTGCTGGTTTGCTCCCAGGAGGCCAAGCAGTCAGCCTA
CTGCCCTACAGTCACTTTCCTGTGGGGCTGCCCTGCTCACCCAGGAGGGGAGAATCT
TCAAAGGGTGCAACATAGAAAATGCCTGCTACCCGCTGGGCATCTGTGCTGAACGGACC
GCTATCCAGAAGGCCGTCTCAGAAGGGTACAAGGATTTAGGGCAATTGCTATCGCCAG
TGACATGCAAGATGATTTTATCTCTCCATGTGGGGCCTGCAGGCAAGTCATGAGAGAGT
TTGGCACCAACTGGCCCGTGTACATGACCAAGCCGGATGGTACGTATATTGTCATGACG
GTCCAGGAGCTGCTGCCCTCCTCTTTGGGCCTGAGGACCTGCAGAAGACTCAGTGAG
 AATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCC
 GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCC

GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCCTAATAAAATGAGGA
 AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
 ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
 ATGGCTTCTGA

pcDNA3–CDA; combinació 1:5, mostra 1

AGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCA
 AGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTATGGCCAGAAAGCGTCTGCCTGCACCCTGAA
GCCTGAGTGTGTCCAGCAGCTGCTGGTTTGCTCCAGGAGGCCAAGCAGTCAGCCTACT
GCCCTACAGTCACTTTCCTGTGGGGCTGCCCTGCTCACCCAGGAGGGGAGAATCTTC
AAAGGGTGAACATAGAAAATGCCTGCTACCCGCTGGGCATCTGTGCTGAACGGACCGC
TATCCAGAAGGCCGTCTCAGAAGGGTACAAGGATTTACAGGGCAATTGCTATCGCCAGTG
ACATGCAAGATGATTTTATCTCTCCATGTGGGGCTGCAGGCAAGTCATGAGAGAGTTT
GGCACCAACTGGCCCGTGTACATGACCAAGCCGGATGGTACGTATATTGTCATGACGGT
CCAGGAGCTGCTGCCCTCCTCCTTTGGGGCTGAGGACCTGCAGAAGACTCAGTGAGAAT
 TCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCCGC
 TGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGT
 GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCCTAATAAAA
 TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGG
 GGCAGG

pcDNA3–CDA; combinació 1:5, mostra 2

GGGCAATAGCAGAGCTCTCTGGCTACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAAT
 TAATACGACCCCCCTTNAGGGANGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTCNT
 TGAGGCTTAAGCAGTGGGTNTCCCTAGTTAGNCAGAGAGCTCCCAGGNTCAGATCTGGT
 CTAANCAGAGAGACCCGTTTATGTATCGAGCTAGGCACNNTAAATACNATATCNCNGCA
 ATGCGGCAATTCAGTGGATCGTCCAATCCATGTCAGACCCGTNTGTTGCCNTCCAAATA
 AGGCACGATCGTGCCACCTTACNTCCANCAATCGGGATGCACGGNGCTNTTACTCNCCT
 TGTNAGGCATGNGTGCTAACTCAACNNNACCATGATGCAAGANTACAAGAGNGNGTGCA
 TNAGCACTACANTNAGGTNATGGNNCAGAAGCGTCCTGCCCTGCGTNCCTGAANCCTGA
 NNTGTNNAGNAGCNTGCTGGGTTGNTCCNAGGAGGGCAAGNNNTCTNNCCTAGNNGTC
 NCNANNGTNNNAATNATGTGTNGGNGCAGNCCTGGNTNNNNCCNGGNNNGGAGAATCT
 TTCNNANGGCGAAACNTTNGCNAATGCCTGCNTANCAAGAGGNNCCANCTGTGGCATG
 AAAAAGGANGCGNNTANCCANNNANGGCTGNCTCCATAAANGGNNANACATGANTGNAC
 GNNNAANNNNGNANNANNCCAGTNGNCCNNNNCAGAAGANCATTANNNTAACTNTTGN
 NNNGGTCCNGCNANNCAANTAATNGANNAANANNANGGANCANNNNGNACTCGAGA
 ACANNTANTNCAAGNNGGANNTGGCAANNTCATNNTGATNNTNANCNGGNNAAAGNNNT
 NGGNGCNNTNCCANACATNNGTNNTNAGAAAANCNGTGGANNNNACTCATGGGGANG
 AATNGNCNAAANNGCANNAGANANATNNNAGATNNNNNTNNANGNNNAAGGNNNTTGN
 NAAAACCNCNNNGGAANNANNANNAGAGANNNCATTNANCTTGCTCCTGCCACNNGTN
 GAAACNGTCNCCNCNGNCANNTCGTNANTNCCTNAGGANGGTNGNANNANNNAACNNT
 CNNTTCTGANANNAANTGGNNAGCTNNNTANCCNNTANNNNAAANAGGGNTNTTNNANTT
 TGGGANANNNGANGNNNNNAAGANGNNNGNNGNANNTTGNNTNNNTATNACTANANT
 NNTNNNTTNAATTGTGCGNNTNCNNNCAAANCTNNNNNTGNTGATNTNNNATGNGNNGGT
 NTTANNCCNCTNANGANAGAGNGNCNCAGNGTNGGTATNNGATGTCCAGNGCAAGAT
 ACAGCACANTNANGTGGGTNTNNNGTANCNTNGNAATAGNNTTTNTNNTACTTGACANN
 AGNNTACTNNGANNAANTANAAAAGTNGCGNCGTANTGNCNNTGNGATAGTTCATACTN
 GGAANCTNNCTNTNGANCANTANNNGTGANNCNGTAANNANANNNGNAGANNGTANNAN

GCAAANTTANTCNNGNGNGATGTGCAATAGNNNNGTGNNGNCCNACTNNCNNNCGTCNN
CNAGGNCNTNNGN

D'aquestes quatre seqüències, les tres primeres van resultar ser correctes i llestes per al seu ús en procediments de transfecció transitòria, mentre que la quarta no va resultar ser apta per al seu posterior ús en no haver-se realitzat el clonatge del gen *CDA* de forma exitosa en aquest últim cas.

7. Modelatge per acoblament molecular (*molecular docking*)

7.1. Obtenció de lligands

Es van obtenir els diversos lligands utilitzats per a la realització de modelatge mitjançant acoblament molecular o *molecular docking* a partir del repositori d'estructures químiques ChemSpider (www.chemspider.com). Les diverses estructures utilitzades foren 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC; CSID:389065), 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5hmdC; ZINC71749131), 5-formil-2'-desoxicitidina (5fdC; CSID:10291642); 5-carboxil-2'-desoxicitidina (5cadC; CSID:59051502); i 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5hmdU; ZINC91541). L'estructura de ruxolitinib es va obtenir a partir de l'estructura **4U5J** del repositori Protein Data Bank (www.rcsb.org) en què ruxolitinib es troba complexat amb la proteïna c-Src. Les estructures foren descarregades com a fitxers *.mol i foren convertides a fitxers *.mol2 mitjançant processament i exportació amb PyMOL 2.0.7 (Schrödinger®).

7.2. Obtenció de proteïnes

Les estructures cristal·litzades de les proteïnes corresponents al transportador concentratiu de nucleòsids de *Vibrio cholerae* (vcCNT) (**Johnson et al.**, 2012) i al transportador equilibratiu de nucleòsids 1 humà (hENT1) (**Wright i Lee**, 2019) foren obtingudes a partir de les estructures **4PDA** i **6OB7**, respectivament, contingudes al repositori Protein Data Bank. En el cas de l'estructura **4PDA** la proteïna vcCNT es presenta amb citidina com a lligand, i en el de l'estructura **6OB7** hENT1 es troba amb dilazep com a lligand.

7.3. Processament de proteïnes

Les proteïnes vcCNT i hENT1 foren processades per d'eliminar-ne els diversos lligands i obtenir els models corresponents a únicament la proteïna aïllada en cadascun dels casos. Les proteïnes aïllades foren exportades a fitxers *.pdb.

7.4. Acoblament molecular entre lligands i proteïnes

L'acoblament molecular entre cadascun dels lligands i cadascuna de les proteïnes fou realitzat mitjançant SwissDock (www.swissdock.ch/docking). Es van carregar els lligands en format *.mol2 i les proteïnes en format *.pdb, i, a continuació, es van portar a terme les simulacions d'acoblament molecular corresponents. Un cop obtinguts els resultats del procés d'acoblament, es va seleccionar l'estat conformacional de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0_{\min}), és a dir, la forma termodinàmicament més estable i més afavorida. Finalment, es va procedir a la visualització i anàlisi de les diverses estructures obtingudes.

8. Representació de dades i anàlisi estadística

Tant la representació de dades com les anàlisis estadístiques portades a terme en aquest treball van realitzar-se mitjançant GraphPad Prism 8.4.0 (GraphPad Software, LLC.).

8.1. Representació de dades

Tots els valors numèrics representats gràficament en aquest treball corresponen als valors de mitjana aritmètica \pm error estàndard. Les representacions gràfiques de dades numèriques d'aquest treball es mostren o bé en forma d'histogrames o de corbes sigmoides per mostrar relacions concentració-resposta. En el cas dels histogrames corresponents a experiments de transport de substrat en què el valor de referència relatiu correspon al 100%, es detalla en cada cas particular el valor absolut corresponent a què es relativitzen els resultats en les seves unitats respectives a cada peu de figura. Les representacions gràfiques corresponents a corbes sigmoides de concentració-resposta van obtenir-se mitjançant transformació logarítmica dels valors corresponents a concentracions a l'eix d'abscisses, en primer lloc, i mitjançant anàlisi no lineal de la corba sigmoide, en segon lloc. L'anàlisi no lineal de la corba sigmoide va permetre l'obtenció dels valors de concentració inhibidora 50% o IC_{50} mostrats en aquest treball. Els valors de

constants d'inhibició (K_i) van obtenir-se mitjançant l'aplicació de l'equació de Cheng-Prusoff a partir dels valors de IC_{50} , K_M i la concentració de substrat.

8.2. Anàlisi estadística

El nombre de rèpliques experimentals a cada experiment independent es detalla a cada cas particular al peu de figura. El nombre d'experiments independents (n) també s'especifica al peu de figura corresponent a cada cas concret. Totes les anàlisis estadístiques portades a terme en aquest treball amb la finalitat de trobar diferències estadísticament significatives entre diversos grups o condicions experimentals van realitzar-se mitjançant la prova ANOVA (de l'anglès, ***Analysis Of Variance***) unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. Les diferències estadísticament significatives es troben representades de la següent forma: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; i **** $P \leq 0,0001$.



Resultats

1. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids

1.1. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors concentratius de nucleòsids

Per a l'estudi de la possible interacció dels nucleòsids naturals modificats epigenèticament 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC), 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5hmdC), 5-formil-2'-desoxicitidina (5fdC) i 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5hmdU) amb els transportadors de nucleòsids van portar-se a terme experiments de transport de *cis*-inhibició utilitzant un substrat natural model translocat pels transportadors de nucleòsids. Va escollir-se uridina com a nucleòsid model en tant que és l'únic dels cinc nucleòsids naturals canònics (citidina, uridina, timidina, adenosina i guanosina) que és transportat pels tres transportadors concentratius de nucleòsids (hCNT1, hCNT2 i hCNT3). Aquests assaigs de transport de *cis*-inhibició van realitzar-se en condicions de velocitat inicial i de no acumulació de nucleòsid. El temps d'exposició a uridina i a cadascun dels nucleòsids epigenètics va ser de 30 segons. En els diferents medis de transport la concentració d'uridina fou 1 μM i l'activitat radioactiva d'uridina tritiada fou 1 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$. Es van utilitzar dues concentracions d'inhibidor, és a dir, de cadascun dels nucleòsids epigenètics: 100 μM i 500 μM (Figures 38–42 i 44–45).

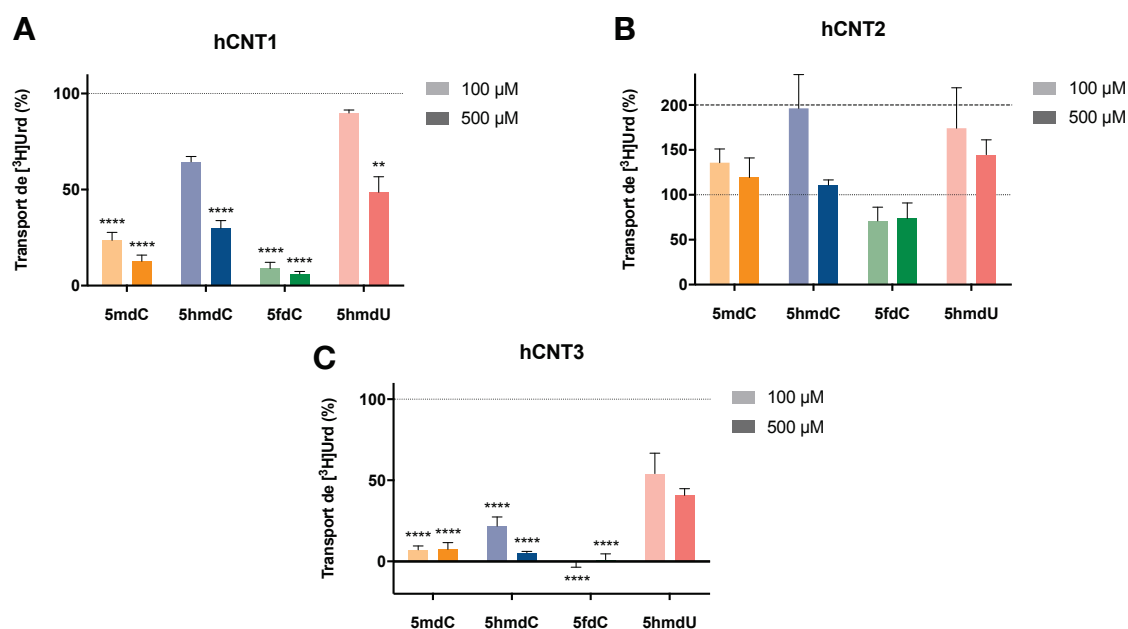


Figura 38. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors concentratius de nucleòsids. Inhibició del transport d'uridina en presència de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) a concentracions de 100 μM i 500 μM en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. Els valors mostrats corresponen exclusivament a la mesura del transport concentratiu resultant de la subtracció a la mesura del transport en medi amb presència de sodi (Na^+), necessari per possibilitar el transport concentratiu, de la mesura del transport equilibratiu i l'eventual unió inespecífica de substrat en medi en absència de sodi i amb colina com a contraió per a mantenir l'osmolaritat del medi. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en

termes de pmol [³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ correspon a 97,04 ± 8,71 per hCNT1 – 5mdC; 97,52 ± 9,33 per hCNT1 – 5hmdC; 111,84 ± 10,09 per hCNT1 – 5fdC; 84,35 ± 2,15 per hCNT1 – 5hmdU; 27,96 ± 6,86 per hCNT2 – 5mdC; 38,56 ± 5,12 per hCNT2 – 5hmdC; 31,83 ± 7,08 per hCNT2 – 5fdC; 31,66 ± 6,26 per hCNT2 – 5hmdU; 149,57 ± 22,40 per hCNT3 – 5mdC; 138,78 ± 15,82 per hCNT3 – 5hmdC; 115,38 ± 10,02 per hCNT3 – 5fdC i 98,14 ± 12,87 per hCNT3 – 5hmdU. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve expressada com ** P ≤ 0,01; i **** P ≤ 0,0001.

Tal i com es podria esperar, aquests nucleòsids pirimidínics interaccionen amb els transportadors que són capaços de reconèixer i transportar nucleòsids constituïts per una pirimidina com a nucleobase: hCNT1 i hCNT3. En canvi, aquests nucleòsids no inhibeixen la captació d'uridina per part de hCNT2 tret de la sorprenent excepció de 5fdC. hCNT2 és, entre els transportadors concentratius de nucleòsids, el que, a més d'uridina, presenta selectivitat per nucleòsids de purina. Per aquesta raó, resulta com a mínim sorprenent que 5fdC, en tant que nucleòsid de citidina, sigui l'únic dels nucleòsids epigenètics avaluats que tingui una certa capacitat d'inhibició de l'entrada de substrat per hCNT2 de la mateixa manera que succeeix amb hCNT1 i hCNT3, encara que també és cert que en bastant menor mesura en el cas de hCNT2. En canvi, pel contrari, l'únic nucleòsid d'uridina avaluat, 5hmdU, no es mostra ni tan sols com un bon competidor d'uridina en quant a desplaçar-la de la seva unió a hCNT2. A la vista d'aquests resultats, és possible extreure unes primeres conclusions sobre com aquests nucleòsids epigenètics interaccionen o són reconeguts pels transportadors concentratius de nucleòsids. En primer lloc, de la mateixa manera que succeeix amb els nucleòsids naturals canònics, els nucleòsids epigenètics derivats de citidina i d'uridina presenten, *a priori*, major afinitat per hCNT3 que per hCNT1. Els tres nucleòsids epigenètics de citosina (5mdC, 5hmdC i 5fdC) inhibeixen el transport d'uridina en major mesura que el nucleòsid epigenètic d'uracil (5hmdU), fet que suggereix que els nucleòsids epigenètics de citosina presenten major afinitat per als transportadors concentratius de nucleòsids amb què interaccionen que els derivats d'uridina (**Figura 38**).

1.2. *Interacció dels nucleòsids epigenètics amb el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1*

A més d'avaluar la interacció dels transportadors concentratius de nucleòsids amb els diferents nucleòsids epigenètics, es va estudiar de forma anàloga el reconeixement d'aquests nucleòsids per part del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1. En aquest cas, els assaigs de transport de *cis*-inhibició es van portar a terme en les mateixes condicions que en els casos que s'han explicat prèviament però amb la diferència que en el cas de hENT1 es va treballar únicament amb la proteïna expressada de manera endògena per la línia cel·lular HEK293, a diferència de com es van dur a terme els estudis amb

els transportadors concentratius sobreexpressats de forma estable per enginyeria genètica a la línia cel·lular HEK293, en no expressar aquesta nivells basals de cap dels tres transportadors concentratius de nucleòsids. Per aquesta raó, els resultats d'inhibició del transport d'uridina no són del tot comparables entre els assaigs realitzats per als transportadors concentratius i els realitzats per a hENT1 en termes de valors absoluts de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$. En canvi, sí que, d'alguna manera, és possible fer-se una idea de les diferències d'afinitat dels diferents nucleòsids epigenètics entre els transportadors concentratius i hENT1 en termes de percentatge d'inhibició (%). A més, en tractar-se d'un transportador equilibratiu que s'expressa en nivells basals sense necessitat de sobreexpressió prèvia, el rerefons corresponent a la unió inespecífica del substrat a la superfície de cultiu es converteix en un factor molt més significatiu a tenir en compte en el moment de valorar els resultats i extreure'n conclusions. Per aquesta raó, es mostren tant els resultats de captació d'uridina en cèl·lules HEK293-pcDNA5 sense tenir en compte les eventuais unions inespecífiques que puguin estar tenint lloc, així com els resultats obtinguts a partir de la inhibició de l'entrada d'uridina a través de hENT1 considerant les unions inespecífiques. La unió inespecífica total es va mesurar mitjançant la inhibició de hENT1 amb dipiridamol a una concentració de $10 \mu\text{M}$. Els valors d'uridina marcada radioisotòpicament obtinguts en aquesta condició es van atribuir exclusivament a la unió inespecífica del nucleòsid a la superfície de la placa, donat que el transport mitjançat per hENT1 és bloquejat per dipiridamol i no existeix cap altre sistema de transport alternatiu disponible. Per tant, en aquest cas, es van obtenir valors nets d'inhibició de la captació d'uridina per part de hENT1 a través de la subtracció dels valors d'uridina tritiada atribuïbles únicament a fenòmens d'unio inespecífica als valors obtinguts a partir dels assaigs de *cis*-inhibició amb els diferents nucleòsids epigenètics (**Figura 39**).

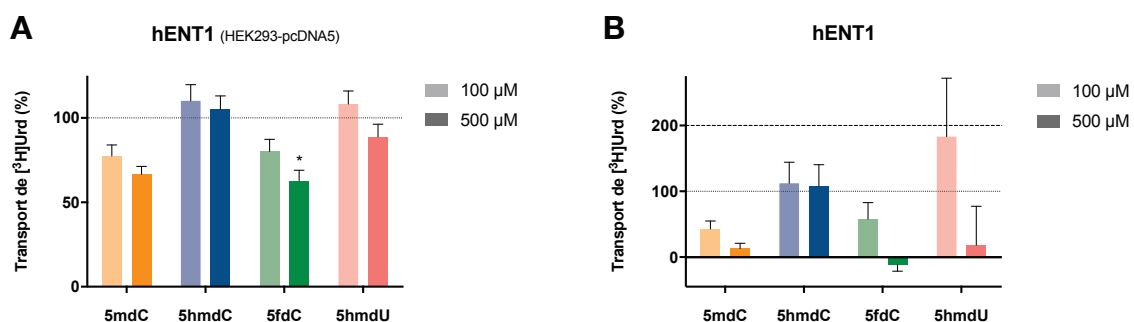


Figura 39. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1. Inhibició del transport d'uridina en presència de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) a concentracions de $100 \mu\text{M}$ i $500 \mu\text{M}$ en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. A l'histograma **A**, els valors mostrats corresponen al transport equilibratiu sense sostreure possibles unions inespecífiques. Al gràfic **B**, els valors de percentatge d'inhibició del transport d'uridina corresponen únicament al transport equilibratiu mitjançat per hENT1 un cop sostret el valor d'uridina tritiada romanent resultant d'unions inespecífiques. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ correspon a $24,16 \pm 1,96$ per 5mdC; $21,90$

$\pm 1,99$ per 5hmdC; $24,99 \pm 1,97$ per 5fdC i $21,96 \pm 1,18$ per 5hmdU a la gràfica de la dreta; i correspon a $8,78 \pm 1,08$ per 5mdC; $6,17 \pm 1,05$ per 5hmdC; $8,08 \pm 1,32$ per 5fdC i $6,19 \pm 2,63$ per 5hmdU a la gràfica de l'esquerra. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 6$ a la gràfica **B** i $n = 3$ a la gràfica **A**. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$.

A la vista dels resultats obtinguts en el cas de hENT1 es posa de manifest que, en el cas de realitzar assaigs de transport d'algun nucleòsid substrat d'un transportador expressat en nivells basals sense sobreexpressió prèvia, especialment en el cas dels transportadors equilibratius, la importància de les unions inespecífiques del substrat és un factor rellevant a ser tingut en compte. Els resultats presentats en ambdós gràfics són congruents entre si. A l'histograma **B** les diferències es tornen molt més notòries en mostrar canvis en els percentatges de captació d'uridina únicament atribuïbles a l'activitat de hENT1, mostrant d'aquesta manera l'activitat inhibidora neta resultant de la presència de cada nucleòsid epigenètic sobre la translocació d'uridina per part de hENT1. En canvi, a la primera gràfica, la de l'esquerra, aquests canvis també es poden observar, encara que d'una forma més atenuada que en el cas anterior degut a l'emascament resultant de la unió inespecífica del substrat. En aquest cas, tot i no existir diferències significatives, els nucleòsids 5mdC i 5fdC provoquen una disminució en el transport d'uridina per part de hENT1. Pel contrari, els nucleòsids 5-hidroximetilats no semblen afectar l'activitat transportadora de hENT1, especialment en el cas de 5hmdC. En el cas de 5hmdU, a diferència de 5hmdC, no pot afirmar-se que aquest no doni lloc a canvis en la captació d'uridina a través de hENT1, però sí que aquests canvis tenen lloc en un sentit o en el contrari segons la seva concentració (**Figura 39**).

1.3. *Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1 en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable de cadascun dels transportadors concentratius de nucleòsids*

Es va determinar la inhibició de l'entrada d'uridina a través del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1 en les diferents línies cel·lulars HEK293 però ara amb expressió estable de cadascun dels transportadors concentratius de nucleòsids individualment (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) continguts en el vector pcDNA5 en comparació amb tots els resultats obtinguts en la línia cel·lular HEK293 amb el vector pcDNA5 buit (HEK293-pcDNA5) mostrats a l'apartat anterior. Aquests resultats es deriven d'unes dades que són necessàries per a l'obtenció dels resultats inicials de transport concentratiu. Per conèixer els valors nets de transport concentratiu en un sistema en què hi ha un rerefons de transport equilibratiu (en el cas de cèl·lules HEK293, majoritàriament hENT1) es resten els valors de transport resultants únicament de l'entrada en funcionament del transport equilibratiu als valors de transport obtinguts per a la

suma de transports concentratiu i equilibratiu. Per tant, la hipòtesi de treball objecte d'aquest subapartat es basa en la suposició que, encara que els transportadors concentratius de nucleòsids requereixen la unió d'ió sodi per completar el cicle de translocació que permet desplaçar el nucleòsid del medi extracel·lular al medi intracel·lular, això pot no implicar necessàriament que requereixin ió sodi per al reconeixement i/o unió del nucleòsid al transportador concentratiu sense que arribin a iniciar-se i/o completar-se totes les etapes del cicle de translocació. Aquesta hipòtesi adquireix major fonament en considerar el paper de transceptor descrit per a almenys un dels transportadors concentratius de nucleòsids, hCNT1. D'aquesta manera, almenys en el cas de hCNT1, es coneix que els transportadors concentratius de nucleòsids no tenen per què actuar exclusivament com translocadors de nucleòsids, sinó que a més poden unir substrats sense arribar a transportar-los desencadenant una resposta de senyalització intracel·lular precisament com a resposta a la unió extracel·lular d'aquest substrat al transportador de la mateixa manera que ho fa un receptor. A més, els models experimentals utilitzats en aquest treball en què els transportadors concentratius de nucleòsids són sobreexpressats abundantment de forma artificial a partir de l'expressió estable resultant d'un procés de *Flp-In*TM en línies cel·lulars HEK293 generades a partir de clons estables, i en què per una altra banda el transport equilibratiu (majoritàriament hENT1) és avaluat únicament en base als nivells basals de transportador que les cèl·lules HEK293 expressen de forma endògena; obren la possibilitat d'obtenir algunes conclusions sobre l'afinitat de cadascun dels nucleòsids epigenètics estudiats per a cadascun dels tres transportadors concentratius de nucleòsids sense necessitat que tingui lloc translocació ni del substrat model utilitzat, uridina, ni tampoc del propi nucleòsid epigenètic a través del transportador concentratiu analitzat en cada cas (**Figura 40**).

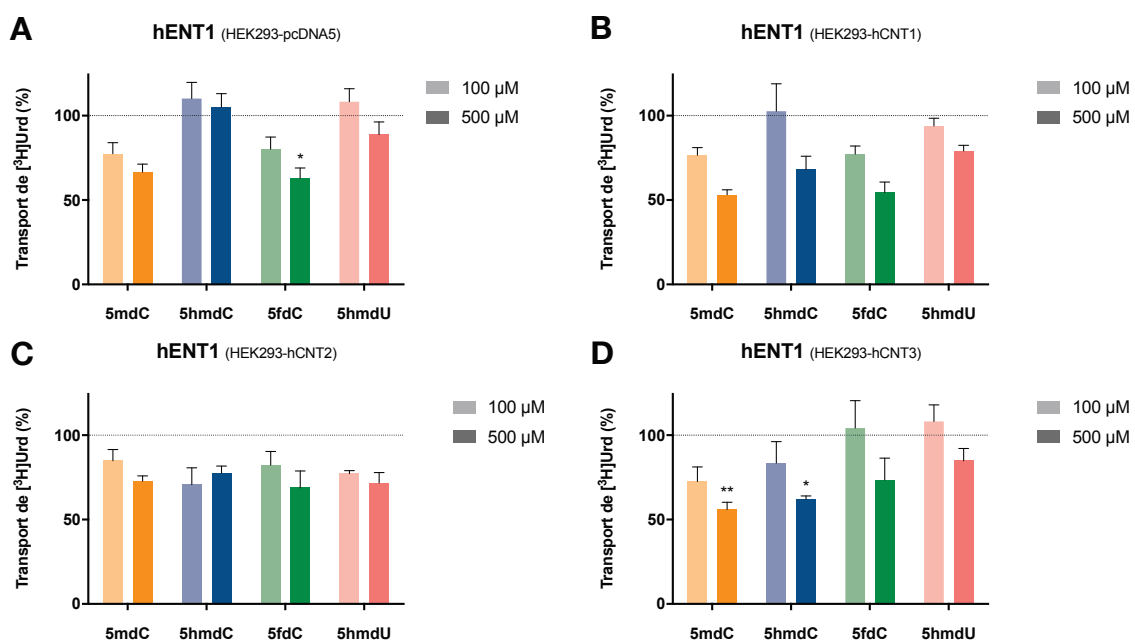


Figura 40. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1 i els transportadors concentratius de nucleòsids. Inhibició del transport d'uridina a través d'hENT1 en presència de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) a concentracions de 100 μ M i 500 μ M en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. Els valors mostrats corresponen al transport equilibratiu sense sostreure possibles unions inespecífiques. Cadascuna de les quatre gràfiques corresponen a cadascuna de les quatre línies cel·lulars genèticament modificades per a l'expressió estable de cadascun dels tres transportadors concentratius de nucleòsids (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) a més de la línia control amb el vector buit (HEK293-pcDNA5). En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ correspon a $24,16 \pm 1,96$ per 5mdC; $21,90 \pm 1,99$ per 5hmdC; $24,99 \pm 1,97$ per 5fdC i $21,96 \pm 1,18$ per 5hmdU en cèl·lules HEK293-pcDNA5; correspon a $34,53 \pm 4,52$ per 5mdC; $36,98 \pm 3,60$ per 5hmdC; $35,02 \pm 1,26$ per 5fdC i $33,76 \pm 1,97$ per 5hmdU en cèl·lules HEK293-hCNT1; correspon a $42,93 \pm 4,74$ per 5mdC; $37,99 \pm 4,77$ per 5hmdC; $41,13 \pm 6,49$ per 5fdC i $38,17 \pm 8,38$ per 5hmdU en cèl·lules HEK293-hCNT2; i correspon a $39,25 \pm 4,08$ per 5mdC; $39,92 \pm 5,12$ per 5hmdC; $38,40 \pm 4,18$ per 5fdC i $31,63 \pm 3,86$ per 5hmdU en cèl·lules HEK293-hCNT3. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$ i ** $P \leq 0,01$.

En un principi, en el cas del transport d'uridina mitjançat per hENT1 en cèl·lules HEK293-hCNT2 es podria esperar una inhibició de la translocació d'uridina. En cas de donar-se, aquesta inhibició seria deguda a la capacitat de hCNT2 de reconeixement d'uridina, en tant que és l'únic nucleòsid de pirimidina que hCNT2 és capaç de transportar. En canvi, hCNT2 no reconeix la resta de nucleòsids de pirimidina, ni citidina ni timidina. D'aquesta manera, els nucleòsids epigenètics de citidina (5mdC, 5hmdC i 5fdC) no haurien de ser reconeguts per hCNT2 *a priori* i, per tant, no haurien d'unir-se a aquest transportador; no hauria de ser així per a l'únic nucleòsid epigenètic d'uridina amb el que s'ha treballat (5hmdU), del què sí en seria esperable la seva unió a hCNT2. En canvi, a la vista dels resultats obtinguts, només existeix inhibició amb dos dels quatre nucleòsids epigenètics (5hmdC i 5hmdU) i, a més, només un d'aquests dos és un dels tres hauria pogut esperar-se. Tant per 5mdC com per 5fdC els nivells de translocació d'uridina són lleugerament superiors en presència de hCNT2 que en cèl·lules HEK293-pcDNA5 (**Figura 40**).

En tercer i últim lloc, en presència del transportador hCNT3 s'observen diferències amb 5hmdC i 5fdC. Quan s'utilitza 5hmdC com inhibidor, l'entrada d'uridina a través d'hENT1 es veu reduïda en cèl·lules HEK293-hCNT3 respecte la seva entrada en cèl·lules control HEK293-pcDNA5. Com ja s'ha comentat prèviament, aquest fet probablement es degui a un possible fenomen d'inhibició competitiva de la unió de citidina a hCNT3 per part del respectiu anàleg modificat químicament a la posició 5. De la mateixa manera que succeeix en el cas d'hCNT1, l'augment en els nivells extracel·lulars de citidina disponible seria el responsable de la inhibició de la captació d'uridina per part d'hENT1. En canvi, en cas de 5fdC les diferències en captació d'uridina a través d'hENT1 en cèl·lules HEK293-hCNT3 respecte cèl·lules HEK293-pcDNA5 tenen lloc en sentit contrari al que succeeix amb 5hmdC. En aquest cas, la inhibició del transport d'uridina per hENT1 observada en cèl·lules HEK293-pcDNA5 es veu

revertida en cèl·lules HEK293–hCNT3. Aquest fet probablement sigui atribuïble a la unió de 5fdC a hCNT3 i a la possibilitat que 5fdC inhibeixi el transport d'uridina per si mateixa. Per tant, en unir hCNT3 el nucleòsid epigenètic 5fdC amb relativament alta afinitat, el retiraria del medi extracel·lular disminuint la disponibilitat i l'accessibilitat de hENT1 al nucleòsid en qüestió (**Figura 40**).

1.4. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb el transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2

El transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2 presenta selectivitat per al reconeixement de nucleòsids purínics (adenosina i guanosina) i uridina, essent aquest l'únic nucleòsid pirimidínic reconegut per hCNT2. De fet, uridina és l'únic nucleòsid reconegut pels tres transportadors concentratius de nucleòsids. D'aquesta manera, a excepció d'uridina, hCNT2 no té capacitat de translocació de nucleòsids de pirimidina (citidina i timidina). Per tant, inicialment no s'esperaria que tingués lloc la interacció dels nucleòsids epigenètics de citidina (5mdC, 5hmdC i 5fdC) amb hCNT2. En canvi, sí que es podia preveure la possible interacció de 5hmdU amb hCNT2. Per això, va estudiar-se mitjançant assaigs de transport de *cis*-inhibició la possible interacció o manca d'interacció de cadascun dels nucleòsids epigenètics amb hCNT2 utilitzant, per un costat, uridina (veure apartat 1.1), i per l'altre, un nucleòsid purínic substrat de hCNT2, en aquest cas adenosina, com a substrat model. En funció dels resultats obtinguts es podrien treure conclusions sobre la diferent incidència dels nucleòsids epigenètics sobre el transport de nucleòsid substrat en funció del tipus estructural de la nucleobase d'aquest últim, és a dir, en funció de si es tracta d'una pirimidina (uracil) o una purina (adenina) (**Figures 41 i 42**).

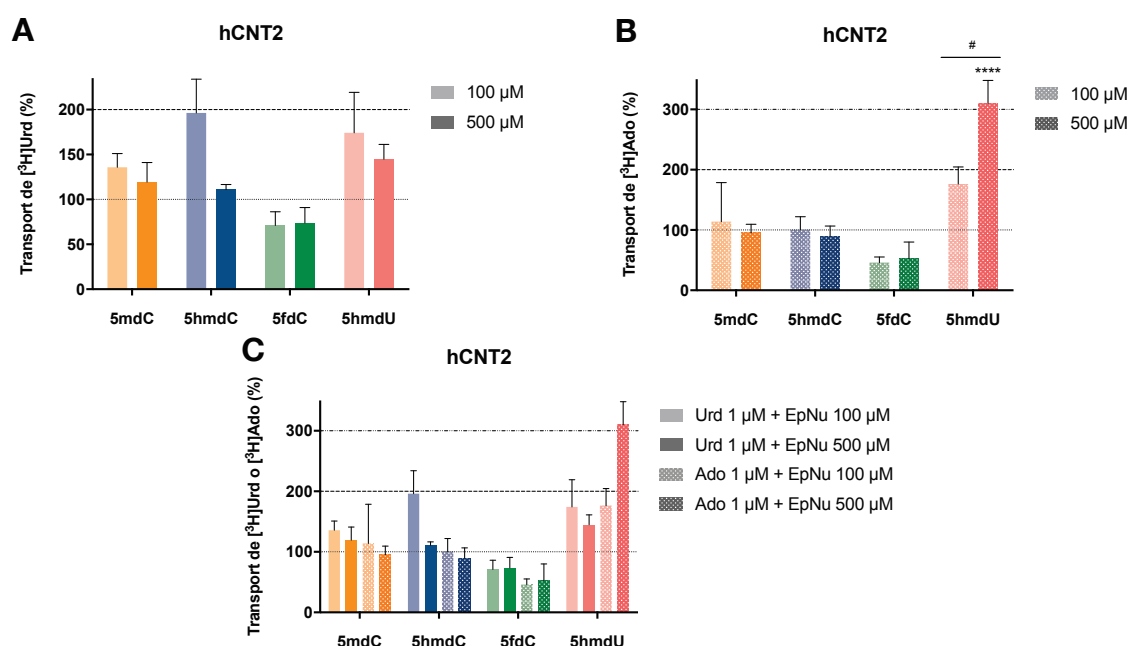


Figura 41. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hCNT2. Inhibició del transport d'uridina o adenosina a través d'hCNT2 en presència de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) a concentracions de 100 μM i 500 μM en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina o adenosina tritiades corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina/adenosina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. En valors absoluts el 100% de transport de substrat en termes de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{substrat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ correspon a $27,96 \pm 6,86$ per 5mdC; $38,56 \pm 5,12$ per 5hmdC; $31,83 \pm 7,08$ per 5fdC i $31,66 \pm 6,26$ per 5hmdU amb uridina com a substrat; i correspon a $34,33 \pm 10,72$ per 5mdC; $48,62 \pm 13,77$ per 5hmdC; $68,42 \pm 7,52$ per 5fdC i $30,82 \pm 12,89$ per 5hmdU amb adenosina com a substrat. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$ en el cas dels assaigs amb uridina i $n = 1$ en el cas dels assaigs amb adenosina. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve representada mitjançant el símbol * per diferències entre una o altra concentració de nucleòsid epigenètic (100 μM o 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM) i el símbol # per diferències entre les concentracions de 100 μM i 500 μM per cada nucleòsid epigenètic. Els nivells de significació estadística venen expressats com # $P \leq 0,05$ i **** $P \leq 0,0001$.

En base a aquests resultats s'observen diferents comportaments en quant a translocació de substrat per part del transportador hCNT2 en funció de les tres variables experimentals presents: l'estructura química de la nucleobase del substrat, el nucleòsid epigenètic utilitzat com inhibidor i la concentració d'aquest últim. Dels quatre nucleòsids epigenètics, el que presenta una menor incidència en la funció transportadora de hCNT2 és 5mdC. En el cas de 5hmdC, la captació de nucleòsid per part de hCNT2 només es veu afectada si aquest és uridina i únicament a una concentració d'inhibidor de 100 μM . En aquest cas, la internalització d'uridina per part del transportador es duplica. L'augment en la captació d'uridina per part de hCNT2 en presència d'una concentració 100 μM de 5hmdC probablement es degui a que 5hmdC 100 μM no sigui un bon competidor d'uridina a una concentració de 1 μM pel lloc d'unió a substrat de hCNT2. D'altra banda, la presència de 5hmdC 100 μM es podria traduir en un increment de la concentració extracel·lular total de nucleòsids pirimidínics que al seu torn comportaria una major entrada d'uridina a través de hCNT2. Per aquesta raó, quan el substrat utilitzat és un nucleòsid purínic, en aquest cas adenosina, la captació d'aquest no es veu afectada en cap cas per la presència de 5hmdC en el medi. 5hmdC 100 μM no produeix cap canvi en la captació d'adenosina en no haver-hi canvis en el balanç de concentracions extracel·lular i intracel·lular de nucleòsids de purina. Per un altre costat, en augmentar la concentració d'inhibidor (5hmdC 500 μM), la translocació d'uridina, contràriament al que succeeix amb una concentració cinc vegades menor, no es veu alterada i és equivalent a la que té lloc en absència d'inhibidor (**Figura 41**).

De la mateixa manera que es va realitzar a l'apartat 1.3, es va estudiar el transport equilibratiu de substrat mitjançant per hCNT2 en cèl·lules HEK293 amb expressió estable del transportador hCNT2 en absència de transport concentratiu per la falta de sodi en el medi de transport. Els resultats derivats d'aquesta aproximació podrien donar alguna idea de la possible interacció dels

diferents nucleòsids epigenètics amb hCNT2 amb independència de que siguin translocats o no (Figura 42).

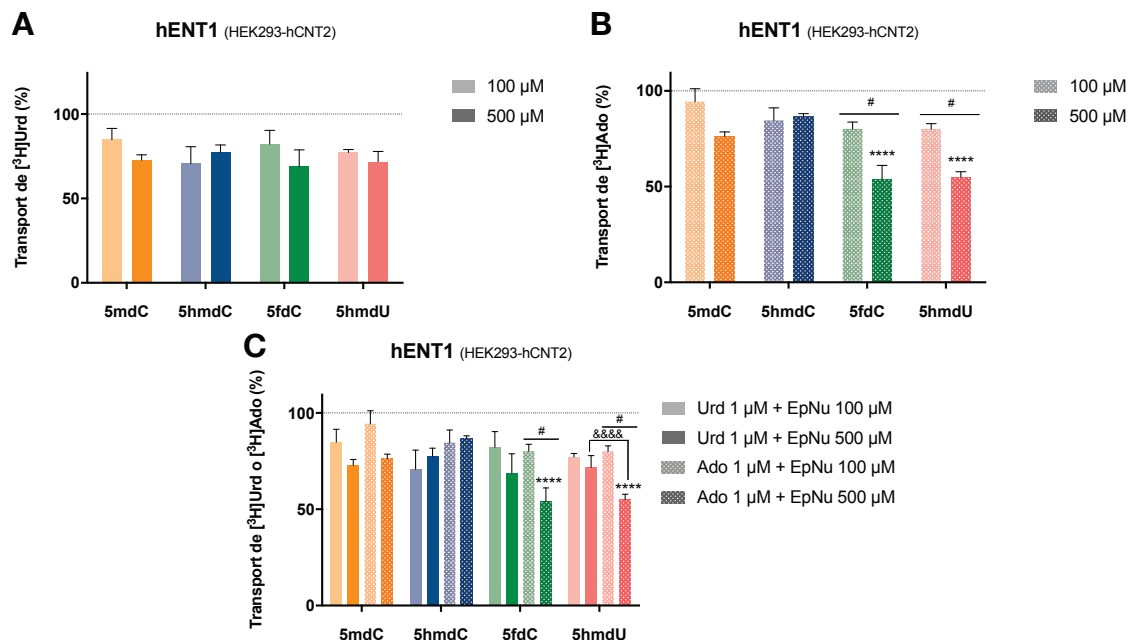


Figura 42. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1 i hCNT2. Inhibició del transport d'uridina o adenosina a través d'hENT1 en cèl·lules HEK293 amb expressió estable del transportador hCNT2 en presència de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) a concentracions de 100 µM i 500 µM en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina o adenosina tritades corresponen als valors de pmol [3H]uridina/adenosina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. Els valors mostrats corresponen al transport equilibratiu sense sostreure possibles unions inespecífiques. En valors absoluts el 100% de transport de substrat en termes de pmol [3H]substrat · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ correspon a 42,93 ± 4,74 per 5mdC; 41,13 ± 6,49 per 5hmdC; 37,99 ± 4,77 per 5fdC i 38,17 ± 8,38 per 5hmdU amb uridina com a substrat; i correspon a 95,54 ± 3,24 per 5mdC; 111,59 ± 4,79 per 5hmdC; 101,26 ± 4,32 per 5fdC i 105,15 ± 6,24 per 5hmdU amb adenosina com a substrat. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3 en el cas dels assaigs amb uridina i n = 1 en el cas dels assaigs amb adenosina. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve representada mitjançant el símbol * per diferències entre una o altra concentració de nucleòsid epigenètic (100 µM o 500 µM) i el seu control respectiu (0 µM), el símbol # per diferències entre les concentracions de 100 µM i 500 µM per cada nucleòsid epigenètic, i el símbol & per diferències entre uridina i adenosina com a substrats. La significació estadística ve representada de la següent manera: # P ≤ 0,05; **** P ≤ 0,0001 i &&&& P ≤ 0,0001.

Quan el substrat utilitzat és uridina, no s'observen diferències clares en el transport de substrat a través d'hENT1 en presència de cap dels quatre nucleòsids epigenètics ni a 100 µM ni a 500 µM. No obstant, això canvia quan el substrat utilitzat és adenosina. En aquest últim cas, hi ha inhibició significativa de la translocació d'adenosina amb els nucleòsids epigenètics 5fdC i 5hmdU que a més és dependent de la concentració. Tractant-se d'adenosina en lloc d'uridina com a substrat, aquest fenomen d'inhibició de la captació de substrat a través de hENT1 dependent de la concentració i específic de dos nucleòsids epigenètics en particular podria portar a pensar que l'eventual unió d'aquests nucleòsids epigenètics a hCNT2 moduli el reconeixement d'adenosina per part d'aquest mateix transportador, afectant així els nivells extracel·lulars

d'adenosina donant lloc a variacions en el transport equilibratiu d'aquesta. Tal i com s'ha comentat a la figura 41, tant 5fdC com 5hmdU podrien ser reconeguts per hCNT2 i modular la unió al substrat. Com ja s'ha vist prèviament, mentre 5fdC inhibeix la translocació de substrat probablement degut a que sigui transportada ella mateixa, 5hmdU podria estar activant la unió i el transport d'adenosina al·lostèricament (**Figura 42**).

1.5. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb el transportador de cations orgànics hOCT1

Donada la interacció d'alguns fàrmacs anàlegs de nucleòsids (p.e., lamivudina) i d'antimetabòlits del metabolisme d'àcids nucleics (p.e., bendamustina) amb el transportador de cations orgànics hOCT1, també van estudiar-se les possibles interaccions dels diferents nucleòsids epigenètics amb aquest transportador. Van dur-se a terme assaigs de *cis*-inhibició del transport de substrat per a hOCT1. En el cas de hOCT1 van utilitzar-se 1-metil-4-fenilpiridini (MPP⁺) com a substrat i medi amb *N*-metil-*D*-glucamina (NMDG) com a medi de transport. El temps d'exposició a substrat amb o sense inhibidor fou de 30 segons (**Figura 43**).

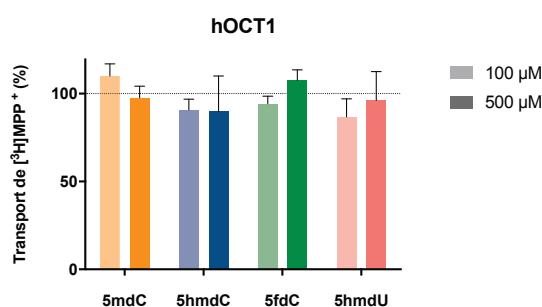


Figura 43. Interacció dels nucleòsids epigenètics amb hOCT1. Inhibició del transport de 1-metil-4-fenilpiridini (MPP⁺) a través d'hOCT1 en cèl·lules HEK293 amb expressió estable del transportador hOCT1 en presència de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) a concentracions de 100 μM i 500 μM en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport de MPP⁺ tritiat corresponen als valors de pmol [3H]MPP⁺ · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. En valors absoluts el 100% de transport de 1-metil-4-fenilpiridini (MPP⁺) en termes de pmol [3H]MPP⁺ · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ correspon a 19,64 ± 1,47 per 5mdC i 5hmdC; i 22,07 ± 6,91 per 5fdC i 5hmdU. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3 en tots els casos. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No existeixen diferències estadísticament significatives.

A la vista dels resultats obtinguts, cap dels quatre nucleòsids epigenètics sembla interaccionar amb el transportador hOCT1 en no presentar cap d'ells una disminució en la captació de MPP⁺ per part de hOCT1. Tots els valors de translocació de MPP⁺ a través de hOCT1 obtinguts ronden el 100% per 5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU tant a 100 μM com a 500 μM (**Figura 43**).

1.6. *Interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids segons nucleòsid epigenètic*

Amb la finalitat d'elucidar les preferències d'interacció de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) amb els diferents transportadors de nucleòsids (hCNT1, hCNT2, hCNT3 i hENT1) en base a la diferent especificitat estructural de cadascun d'aquests pels diferents nucleòsids, van analitzar-se els resultats d'interacció presentats i explicats prèviament en funció dels valors d'inhibició de translocació de substrat a través de cada transportador per cada nucleòsid considerat individualment (**Figures 44 i 45**).

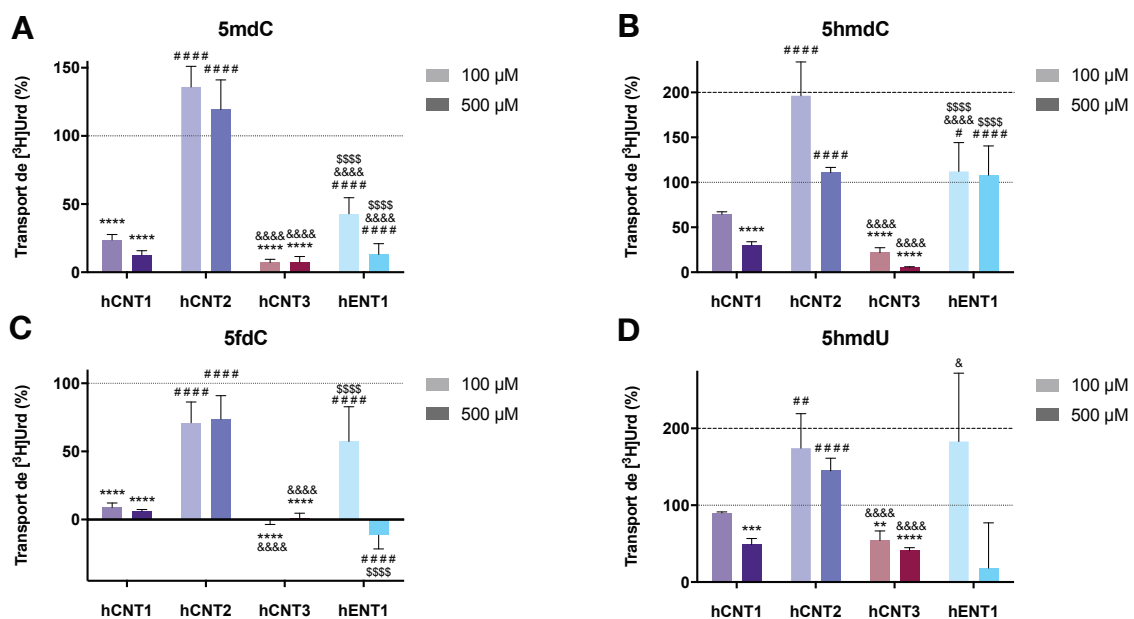


Figura 44. Perfils d'interacció dels transportadors de nucleòsids amb els nucleòsids epigenètics. Inhibició del transport d'uridina en presència de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) a concentracions de 100 μ M i 500 μ M en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de pmol $[^3\text{H}]$ uridina \cdot mg $^{-1}$ proteïna \cdot 30 s $^{-1}$ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. Els valors mostrats corresponen a cada nucleòsid epigenètic avaluat en cadascuna de les quatre línies cel·lulars genèticament modificades per a l'expressió estable de cadascun dels tres transportadors concentratius de nucleòsids (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) a més de la línia control amb el vector buit (HEK293-pcDNA5), totes elles amb expressió endògena d'hENT1. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de pmol $[^3\text{H}]$ uridina \cdot mg $^{-1}$ proteïna \cdot 30 s $^{-1}$ correspon a 97,04 \pm 8,71 per 5mdC – hCNT1; 27,96 \pm 6,86 per 5mdC – hCNT2; 149,57 \pm 22,40 per 5mdC – hCNT3; 8,78 \pm 1,08 per 5mdC – hENT1; 97,54 \pm 9,33 per 5hmdC – hCNT1; 38,56 \pm 5,12 per 5hmdC – hCNT2; 138,78 \pm 15,82 per 5hmdC – hCNT3; 6,17 \pm 1,05 per 5hmdC – hENT1; 111,84 \pm 10,09 per 5fdC – hCNT1; 31,83 \pm 7,08 per 5fdC – hCNT2; 115,38 \pm 10,02 per 5fdC – hCNT3; 8,08 \pm 1,32 per 5fdC – hENT1; 84,35 \pm 2,15 per 5hmdU – hCNT1; 31,66 \pm 6,26 per 5hmdU – hCNT2; 98,14 \pm 12,87 per 5hmdU – hCNT3 i 6,19 \pm 2,63 per 5hmdU – hENT1. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada amb el símbol * per diferències entre una o altra concentració de nucleòsid epigenètic (100 μ M o 500 μ M) i el seu control respectiu (0 μ M), el símbol # per diferències referides a hCNT1 (hCNT1 front a hCNT2, hCNT3 i hENT1), el símbol & per diferències referides a hCNT2 (hCNT2 front a hCNT3 i hENT1) i el símbol \$ per diferències referides a hCNT3 (hCNT3 front a hENT1). La significació estadística ve expressada com # $P \leq 0,05$; & $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ## $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$; ##### $P \leq 0,0001$; &&&& $P \leq 0,0001$ i \$\$\$\$ $P \leq 0,0001$.

Simplement comparant a quina altura queda el valor del 100% de transport d'uridina a les quatre gràfiques, es pot observar un ordre clar de preferència d'interacció dels diferents nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids en el seu conjunt. Aquestes dades són consistents amb el que es proposa al començament d'aquest bloc de resultats en què l'ordre proposat d'afinitat pels transportadors és 5fdC, 5mdC, 5hmdC i 5hmdU successivament, essent 5fdC el compost que presenta una major afinitat i 5hmdU el que menys. Pel que fa als transportadors concentratius, tal i com es podia preveure, els nucleòsids epigenètics interaccionen bé amb els transportadors que presenten especificitat per nucleòsids de pirimidina: hCNT1 i hCNT3. A més, en tots els casos, la interacció amb hCNT3 és més potent que la interacció amb hCNT1. En el cas de 5fdC no només s'inhibeix la captació d'uridina a través d'hCNT1, hCNT3 i hENT1; sinó que també s'inhibeix en hCNT2. L'existència d'indicis que suggereixin una possible interacció de hCNT2 amb 5fdC implicaria que hCNT2 tindria capacitat de reconeixement per almenys algun tipus de nucleòsid de citidina; un fet que, pel moment, resultaria totalment nou. Clarament, 5fdC és el nucleòsid que millor interacciona amb els diferents transportadors de nucleòsids, essent a més l'únic dels quatre que és capaç d'inhibir la translocació de substrat a través dels quatre transportadors avaluats (**Figura 44**).

També es va analitzar la captació d'uridina per part de hENT1 en les diferents línies cel·lulars HEK293 genèticament modificades per a l'expressió estable dels diferents transportadors de nucleòsids en funció de cada línia cel·lular utilitzada, o el que és el mateix, en funció del transportador concentratiu (hCNT1, hCNT2 o hCNT3) que expressa cadascuna d'elles o la seva absència (pcDNA5) per cada nucleòsid epigenètic de forma individualitzada. Aquesta anàlisi és especialment rellevant si es busquen diferències en el transport de substrat mitjançat per hENT1 en presència dels diferents rerefons de transportadors concentratius sense necessitat de completar els cicles de translocació per cada nucleòsid epigenètic considerat per separat. D'aquesta manera, en el cas en què existissin diferències degudes únicament a la interacció de cada nucleòsid amb cada transportador concentratiu, en aquest tipus d'anàlisi haurien de ser manifestes o bé quedar clarament descartades en el cas de no haver-hi aquestes diferències (**Figura 45**).

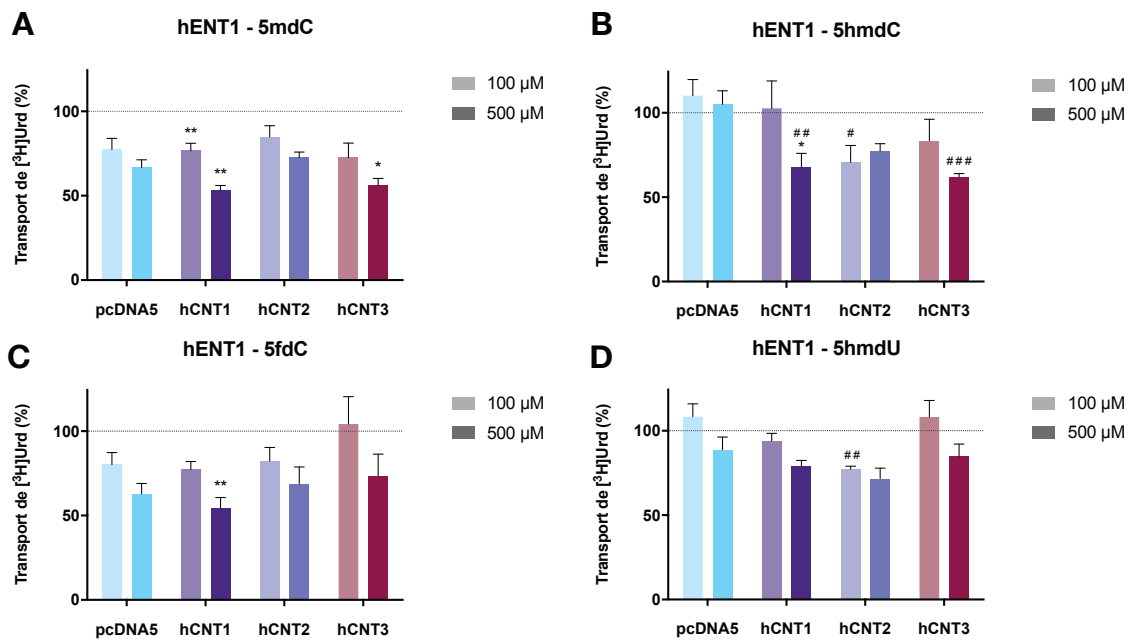


Figura 45. Perfils d'interacció d'hENT1 amb els nucleòsids epigenètics. Inhibició del transport d'uridina mitjançat per hENT1 en presència de cadascun dels nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) a concentracions de 100 μM i 500 μM en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de pmol [³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. Els valors mostrats corresponen al transport equilibratiu sense sostreure possibles unions inespecífiques. Cadascuna de les quatre gràfiques representa cada nucleòsid epigenètic avaluat en cadascuna de les quatre línies cel·lulars genèticament modificades per a l'expressió estable de cadascun dels tres transportadors concentratius de nucleòsids (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) a més de la línia control amb el vector buit (HEK293-pcDNA5), totes elles amb expressió endògena d'hENT1. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de pmol [³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ correspon a 24,16 ± 1,96 per 5mdC – HEK293-pcDNA5; 34,53 ± 4,52 per 5mdC – HEK293-hCNT1; 42,93 ± 4,74 per 5mdC – HEK293-hCNT2; 39,25 ± 4,08 per 5mdC – HEK293-hCNT3; 21,90 ± 1,99 per 5hmdC – HEK293-pcDNA5; 36,98 ± 3,60 per 5hmdC – HEK293-hCNT1; 37,99 ± 4,77 per 5hmdC – HEK293-hCNT2; 39,92 ± 5,12 per 5hmdC – HEK293-hCNT3; 24,99 ± 1,97 per 5fdC – HEK293-pcDNA5; 35,20 ± 1,26 per 5fdC – HEK293-hCNT1; 41,13 ± 6,49 per 5fdC – HEK293-hCNT2; 38,40 ± 4,18 per 5fdC – HEK293-hCNT3; 21,96 ± 1,18 per 5hmdU – HEK293-pcDNA5; 33,76 ± 1,97 per 5hmdU – HEK293-hCNT1; 38,17 ± 8,38 per 5hmdU – HEK293-hCNT2 i 31,63 ± 3,86 per 5hmdU – HEK293-hCNT3. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre una o altra concentració de nucleòsid epigenètic (100 μM o 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM) i el símbol # per diferències referides a HEK293-pcDNA5 (HEK293-pcDNA5 front a HEK293-hCNT1, HEK293-hCNT2 i HEK293-hCNT3). La significació estadística ve expressada com * P ≤ 0,05; # P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; ### P ≤ 0,01 i ### P ≤ 0,001.

5mdC no presenta diferències en la seva capacitat inhibidora del transport d'uridina mitjançat per hENT1 en funció del perfil d'expressió de transportadors concentratius. Quelcom semblant s'observa per 5fdC. 5fdC tampoc presenta diferències en la seva influència sobre el transport d'uridina a través de hENT1 excepte en cèl·lules amb hCNT3. Si es tinguessin en compte únicament les condicions en què no hi ha canvis, es podria inferir que senzillament és degut a que 5fdC seria transportat tant per hCNT1 com per hCNT3 i que, en absència del seu transport per la falta de sodi en el medi, 5fdC no interaccionaria amb aquests transportadors concentratius quedant disponible en la seva totalitat per a la seva interacció amb hENT1 (**Figura 45**).

1.7. *Determinació de constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids*

Amb la finalitat de determinar els valors de les constants d'afinitat dels diferents nucleòsids epigenètics pels transportadors amb els quals, *a priori*, principalment interaccionen es van obtenir sengles corbes d'afinitat a partir dels percentatges d'inhibició del transport d'uridina en resposta a concentracions creixents de cadascun dels nucleòsids epigenètics. Els transportadors per als quals es van realitzar corbes d'inhibició foren hCNT1, hCNT3 i hENT1 (**Figures 46–48**). Els valors de concentració inhibidora 50% (IC_{50}) es van determinar a partir de l'elaboració de corbes concentració-resposta sigmoïdals mitjançant regressió no lineal. El rang de concentracions per cada nucleòsid epigenètic, per cada transportador o per cada combinació d'ambdós es va escollir de tal manera que l'anàlisi no lineal de la corba obtinguda a partir dels valors d'inhibició del transport d'uridina possibilités l'obtenció del valor de IC_{50} . Encara que es va utilitzar el mateix substrat, uridina, per als tres transportadors, cada transportador presenta diferent afinitat pel substrat. Per tant, els valors de IC_{50} permeten comparar les diferències d'afinitat d'un mateix transportador en particular pels diversos nucleòsids epigenètics, però, en canvi, no són un paràmetre cinètic adient per comparar diferències d'afinitat entre transportadors diferents en presentar cadascun d'ells diferent afinitat pel substrat utilitzat. Per aquesta raó, a més dels valors de IC_{50} també es van determinar les constants d'inhibició (K_I) a partir de l'equació de Cheng-Prusoff. Aquesta equació proporciona el valor de la constant d'inhibició (K_I) a partir del valor de IC_{50} i de la constant d'afinitat del substrat pel transportador (K_M). D'aquesta manera, s'afegeix al valor del paràmetre cinètic d'inhibició la contribució de l'afinitat del substrat utilitzat a la inhibició del transport d'aquest per part del nucleòsid epigenètic. En definitiva, a diferència del valor de IC_{50} , el valor de K_I sí que permet comparar afinitats entre diferents transportadors tant per un mateix nucleòsid epigenètic com per diferents nucleòsids epigenètics. En resum, el valor de IC_{50} és un paràmetre relatiu i un indicador indirecte de l'afinitat d'un inhibidor, i, pel contrari, la constant d'inhibició (K_I) és un paràmetre absolut i un indicador directe de l'afinitat (**Taula 48**). L'equació de Cheng-Prusoff per l'obtenció del valor de K_I a partir del valor de IC_{50} de l'inhibidor i tant la concentració com la K_M del substrat és la següent:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

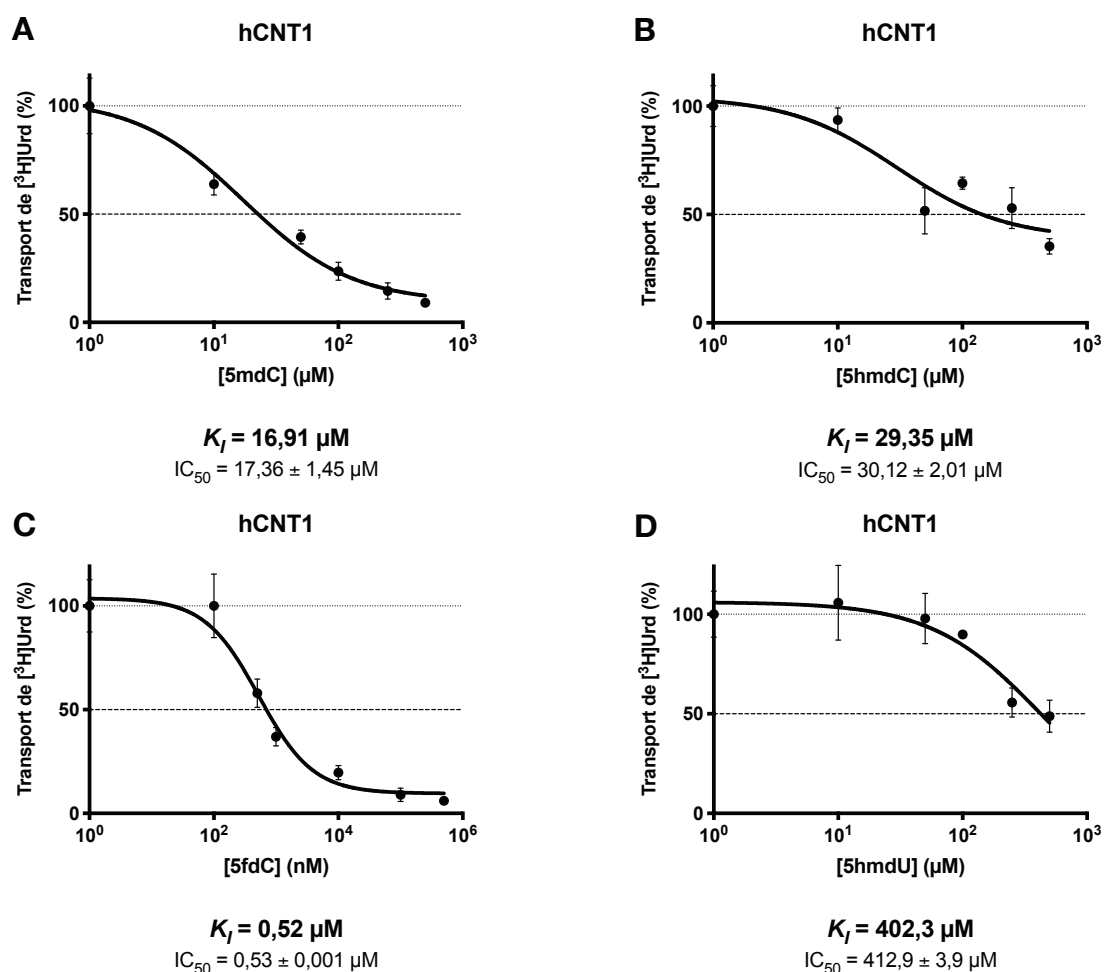


Figura 46. Constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb hCNT1. Corbes d'afinitat dels diversos nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) pel transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 i les seves respectives constants d'interacció cinètica i d'inhibició, IC_{50} i K_i . Les concentracions utilitzades per l'elaboració d'aquestes corbes foren 10, 50, 100, 250 i 500 μM per als nucleòsids 5mdC, 5hmdC i 5hmdU. Per al nucleòsid 5fdC les concentracions utilitzades van ser 0,1; 0,5; 1, 10, 100 i 500 μM . Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de nucleòsid epigenètic. Cadascuna de les quatre gràfiques correspon a cada nucleòsid epigenètic avaluat en cèl·lules HEK293 amb expressió estable del transportador hCNT1. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ correspon a $97,04 \pm 8,71$ per 5mdC; $97,54 \pm 9,33$ per 5hmdC; $111,84 \pm 10,09$ per 5fdC i $84,35 \pm 2,15$ per 5hmdU. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. Els valors de IC_{50} mostrats es van obtenir mitjançant anàlisi no lineal de la corba sigmoïdal prèvia transformació logarítmica de les concentracions a l'eix d'abscisses. Els valors de IC_{50} es mostren juntament amb la desviació estàndard. Els valors de K_i es van obtenir a partir dels valors de IC_{50} corresponents tenint en compte la concentració de substrat (uridina 1 μM) i la constant d'afinitat (K_M) de hCNT1 per uridina (38 μM) mitjançant l'aplicació de l'equació de Cheng-Prusoff.

La comparació entre les constants d'inhibició dels quatre nucleòsids epigenètics és coherent amb els resultats d'interacció d'aquests nucleòsids a concentracions de 100 i 500 μM presentats a l'apartat 1.1. En base als valors de IC_{50} i K_i obtinguts per hCNT1 amb els quatre nucleòsids, el nucleòsid que presenta una major afinitat per hCNT1 és 5fdC, que és el que presenta un valor més baix de K_i , trobant-se aquest fins i tot per sota del rang micromolar (0,52 μM). Per contra, el nucleòsid pitjor reconegut per hCNT1 és l'únic derivat

d'uridina, 5hmdU, que presenta una K_i de 402,3 μM . Els altres dos compostos derivats de citidina, 5mdC i 5hmdC, presenten una afinitat per hCNT1 en el rang micromolar baix (16,91 μM i 29,35 μM , respectivament). Tal i com es podia anticipar, pel que s'observa a l'apartat 1.1, tot i tenir afinitats similars, 5mdC presenta lleugerament major afinitat per hCNT1 que 5hmdC. L'ordre d'afinitats dels quatre nucleòsids obtingut a partir de l'anàlisi de les corbes d'inhibició i de l'obtenció de les seves respectives constants cinètiques d'interacció és el mateix que l'ordre obtingut a partir de les inhibicions realitzades a 100 μM i 500 μM . Per tant, les consideracions de tipus estructural d'aquestes molècules en relació a la seva interacció amb hCNT1 són les mateixes que les prèviament proposades a l'apartat 1.1 (**Figura 46**).

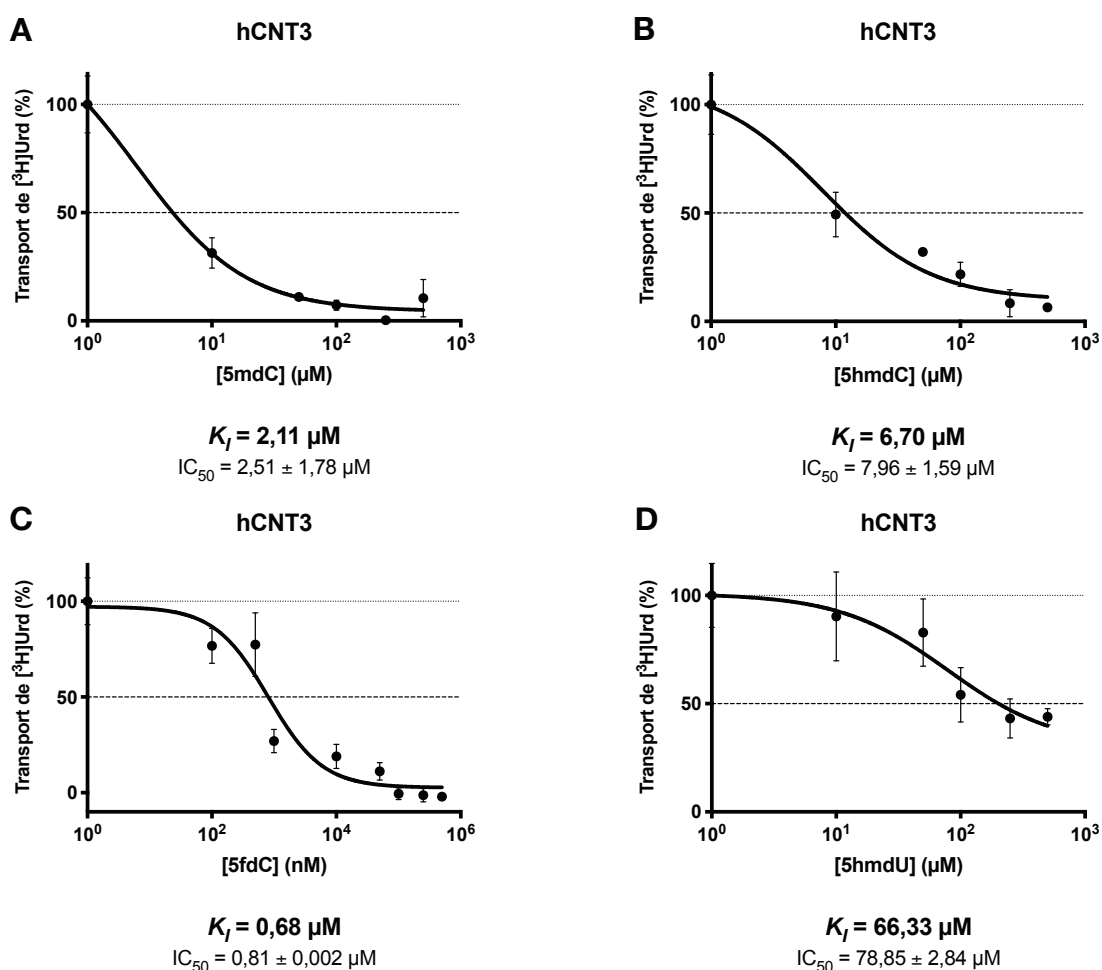


Figura 47. Constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb hCNT3. Corbes d'afinitat dels diversos nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) amb el transportador concentratiu de nucleòsids hCNT3 i les seves respectives constants d'interacció cinètica i d'inhibició, IC_{50} i K_i . Les concentracions utilitzades per l'elaboració d'aquestes corbes foren 10, 50, 100, 250 i 500 μM pels nucleòsids 5mdC, 5hmdC i 5hmdU. Per al nucleòsíd 5fdC les concentracions utilitzades foren 0,1; 0,5; 1, 10, 50, 100, 250 i 500 μM . Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de nucleòsíd epigenètic. Cadascuna de les quatre gràfiques correspon a cada nucleòsíd epigenètic avaluat en cèl·lules HEK293 amb expressió estable del transportador hCNT3. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ correspon a $97,43 \pm 4,91$ per 5mdC; $122,13 \pm 19,58$ per 5hmdC; $104,56 \pm 12,36$ per 5fdC i $93,09 \pm 16,74$ per 5hmdU. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els

valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. Els valors de IC_{50} mostrats es van obtenir mitjançant anàlisi no lineal de la corba sigmoïdal prèvia transformació logarítmica de les concentracions a l'eix d'abscisses. Els valors de IC_{50} es mostren juntament amb la desviació estàndard. Els valors de K_I es van obtenir a partir dels valors de IC_{50} corresponents tenint en compte la concentració de substrat (uridina 1 μM) i la constant d'afinitat (K_M) de hCNT3 per uridina (5,3 μM) mitjançant l'aplicació de l'equació de Cheng-Prusoff.

En el cas de hCNT3, igual que succeeix amb hCNT1, les consideracions relatives a la seva afinitat pels nucleòsids epigenètics que es deriven de les corbes d'inhibició i de les constants cinètiques d'interacció també concorden amb l'aproximació inicial realitzada a l'apartat 1.1. L'ordre d'afinitats és el mateix que l'observat en aquell apartat i el mateix que el que també s'obté per hCNT1, essent 5fdC el compost que presenta una afinitat major i 5hmdU el que pitjor interacciona amb hCNT3. A més, la comparació de les constants d'inhibició obtingudes per a hCNT3 amb les obtingudes per a hCNT1 també confirma que hCNT3 presenta major afinitat per aquests nucleòsids que hCNT1; excepte en el cas de 5fdC. Curiosament, hCNT3 presenta una constant d'afinitat per 5fdC lleugerament major que hCNT1. Aquesta informació extreta a partir de les corbes d'afinitat contradiu el que s'ha observat anteriorment en què la inhibició del transport d'uridina per part de 5fdC 100 μM i 500 μM és major per hCNT3 (Figura 47).

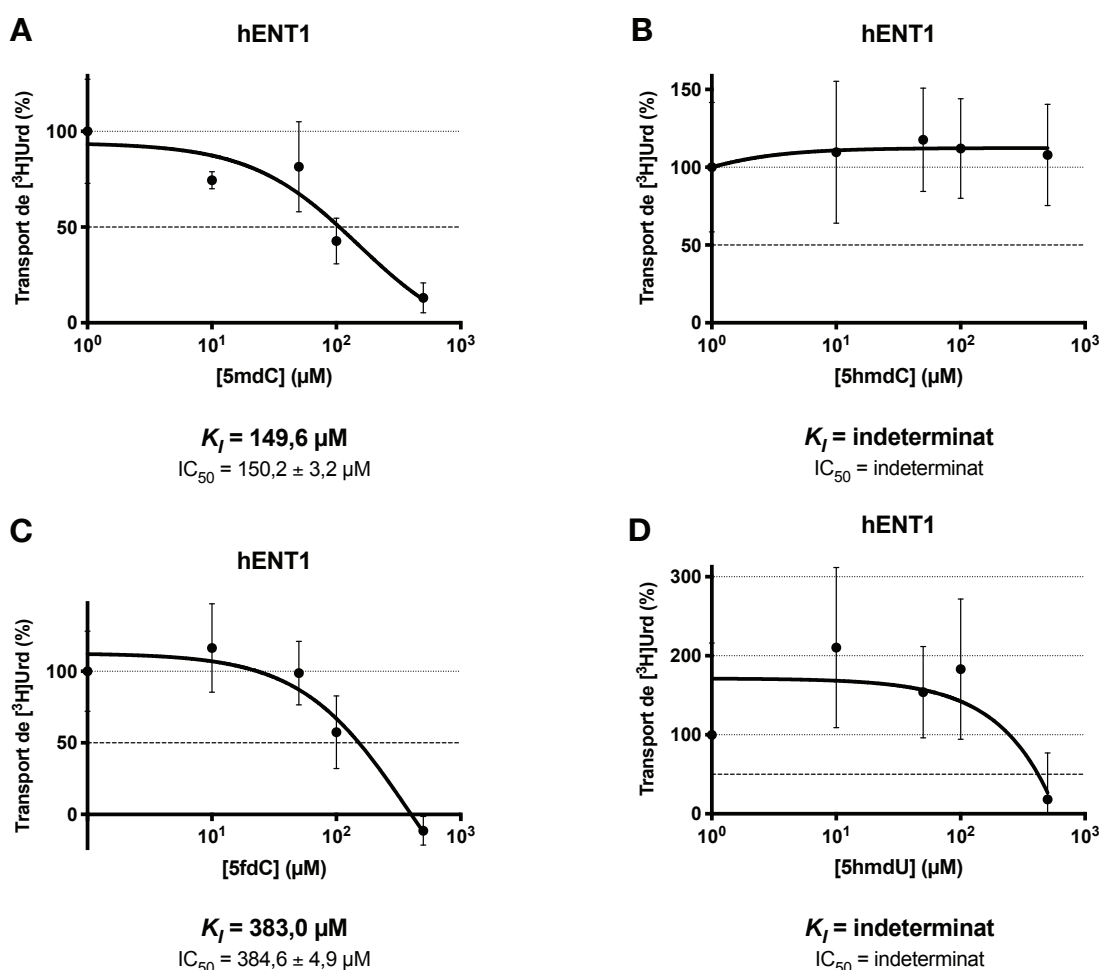


Figura 48. Constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb hENT1. Corbes d'afinitat dels diversos nucleòsids epigenètics (5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU) amb el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1 i les seves respectives constants d'interacció cinètica i d'inhibició, IC_{50} i K_i . Les concentracions utilitzades per l'elaboració d'aquestes corbes foren 10, 50, 100 i 500 μM per als quatre nucleòsids. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control absència de nucleòsid epigenètic. La contribució de les unions inespecífiques fou mesurada mitjançant la utilització de dipiridamol 10 μM i posteriorment sostreta. Cadascuna de les quatre gràfiques correspon a cada nucleòsid epigenètic avaluat en cèl·lules HEK293 control transfectades establement amb el vector pcDNA5 buit. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ correspon a $8,78 \pm 1,08$ per 5mdC; $6,17 \pm 1,05$ per 5hmdC; $8,08 \pm 1,32$ per 5fdC i $6,19 \pm 2,63$ per 5hmdU. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. Els valors de IC_{50} mostrats es van obtenir mitjançant anàlisi no lineal de la corba sigmoïdal prèvia transformació logarítmica de les concentracions a l'eix d'abscisses. Els valors de IC_{50} es mostren juntament amb la desviació estàndard. Els valors de K_i es van obtenir a partir dels valors de IC_{50} corresponents tenint en compte la concentració de substrat (uridina 1 μM) i la constant d'afinitat (K_M) de hENT1 per uridina (240 μM) mitjançant l'aplicació de l'equació de Cheng-Prusoff.

L'obtenció de les corbes d'afinitat del transportador equilibratiu hENT1 per als nucleòsids epigenètics proporciona una imatge molt il·lustrativa sobre la interacció d'aquests nucleòsids amb hENT1. Tal i com s'avança a l'aproximació inicial, cap dels dos compostos hidroximetilats interacciona amb hENT1 fins el punt que ni tan sols se'n poden obtenir corbes d'inhibició i, conseqüentment, tampoc constants d'inhibició. Els nucleòsids epigenètics 5mdC i 5fdC, per contra, són reconeguts pel transportador hENT1. En aquest cas, hENT1 presenta major afinitat per 5mdC ($K_i = 149,6 \mu\text{M}$) que per 5fdC ($K_i = 383,0 \mu\text{M}$). Igual que succeeix amb els nucleòsids naturals canònics, les constants d'afinitat són de major ordre de magnitud per al transportador equilibratiu hENT1 que per als transportadors concentratius hCNT1 i hCNT3 (**Figura 48**).

K_i ($IC_{50} \pm SD$) (μM)	hCNT1	hCNT3	hENT1
5mdC	16,91 ($17,36 \pm 1,45$)	2,11 ($2,51 \pm 1,78$)	149,6 ($150,2 \pm 3,2$)
5hmdC	29,35 ($30,12 \pm 2,01$)	6,70 ($7,96 \pm 1,59$)	Indeterminat
5fdC	0,52 ($0,53 \pm 0,001$)	0,68 ($0,81 \pm 0,002$)	383,0 ($384,6 \pm 4,9$)
5hmdU	402,3 ($412,9 \pm 3,9$)	66,33 ($78,85 \pm 2,84$)	Indeterminat

Taula 48. Constants cinètiques d'interacció dels nucleòsids epigenètics amb hCNT1, hCNT3 i hENT1. Valors de les constants d'interacció cinètica (constants d'inhibició, K_i ; i concentracions de 50% d'inhibició, IC_{50}) dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1 i hCNT3 i el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1 pels nucleòsids epigenètics 5mdC, 5hmdC, 5fdC i 5hmdU. Tots els valors estan expressats en escala micromolar (μM). L'error associat als valors de IC_{50} es mostren en forma de desviació estàndard.

2. Paper dels transportadors de nucleòsids en la biodisponibilitat i els mecanismes d'acció dels nucleòsids epigenètics

Tal i com va descriure's en *Zauri et al., 2015*; els nucleòsids epigenètics 5hmdC i 5fdC presenten capacitat citotòxica en ser convertits als seus derivats d'uridina, 5hmdU i 5fdU respectivament, per part de l'activitat enzimàtica citidina desaminasa (CDA). L'objectiu d'aquest bloc de resultats consisteix en l'estudi de la contribució dels transportadors de nucleòsids a l'entrada i la sortida d'aquests nucleòsids epigenètics a la cèl·lula i, en definitiva, el seu paper en la biodisponibilitat i el mecanisme d'acció farmacològica d'aquests nucleòsids epigenètics, més enllà del rol que exerceix l'enzim citidina desaminasa. En primer lloc, van realitzar-se assaigs preliminars de citotoxicitat per als nucleòsids la citotoxicitat dependent de CDA dels quals és coneguda, 5hmdC i 5fdC, en absència de CDA en els models cel·lulars HEK293 amb expressió estable individual de cadascun dels transportadors concentratius de nucleòsids, a més del model HEK293 control transfectat establement amb el vector pcDNA5 i majoritàriament hENT1 expressat a nivells basals com únic mecanisme de transport de nucleòsids (**Figures 49 i 50**).

2.1. Implicació dels transportadors de nucleòsids en l'efecte dels nucleòsids epigenètics 5hmdC i 5fdC en absència de CDA

Per estudiar l'efecte del 5hmdC en cèl·lules HEK293 en absència de CDA i en funció de la presència dels diversos transportadors de nucleòsids, es van realitzar assaigs de viabilitat cel·lular amb 5hmdC en plaques de 96 pous amb 8×10^3 cèl·lules HEK293 per pou en el moment de la sembra. El tractament amb 5hmdC es va aplicar 24 hores després de la sembra i les diferents concentracions de 5hmdC es van obtenir mitjançant dilucions seriades. L'exposició al tractament es va mantenir durant 72 hores. Una vegada transcorregudes aquestes 72 hores, es va portar a terme l'assaig de viabilitat cel·lular amb sals de tetrazoli (MTT) (**Figura 49**).

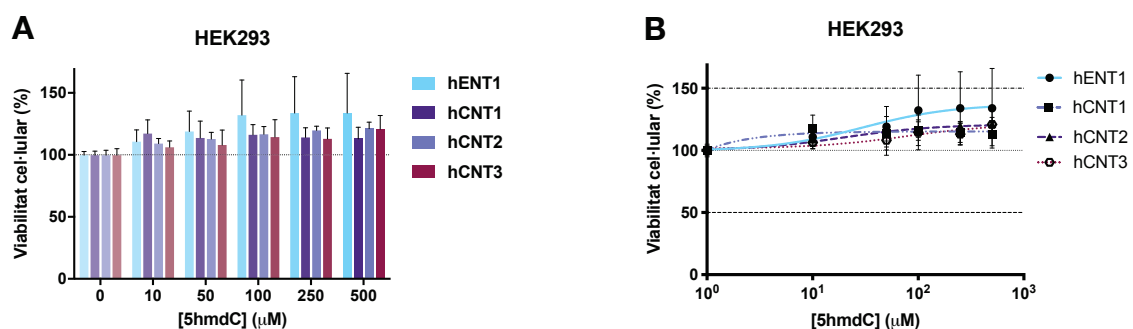


Figura 49. Efecte de 5hmdC sobre la viabilitat cel·lular segons transportador de nucleòsids i en absència de CDA. Viabilitat cel·lular de cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hCNT3 i en cèl·lules HEK293 control amb el vector pcDNA5 buit (hENT1 a la llegenda de les gràfiques) després de l'exposició a 5hmdC. Els valors de viabilitat cel·lular

venen representats en forma de percentatge en relació al control (0 μM). A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 2$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va portar a terme mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No existeixen diferències estadísticament significatives en cap dels casos.

El nucleòsid epigenètic 5hmdC no és citotòxic en absència de l'enzim citidina desaminasa. Al contrari, l'exposició a concentracions creixents de 5hmdC dona lloc a un increment del creixement cel·lular. A més, aquest efecte de 5hmdC sobre el creixement cel·lular no sembla estar influenciat ni mitjançant per la presència de cap transportador concentratiu. Per tant, l'efecte citotòxic causat per 5hmdC en presència de CDA seria atribuïble únicament al seu producte 5hmdU. Més enllà d'aquest fet, 5hmdC no només no exerceix un efecte citocida, sinó que a més promou el creixement cel·lular (**Figura 49**).

Per la seva part, per estudiar l'efecte del 5fdC en les mateixes condicions, es van portar-se a terme assaigs de viabilitat cel·lular amb 5fdC en plaques de 96 pous amb 8×10^3 cèl·lules HEK293 per pou en el moment de la sembra. El tractament amb 5fdC va aplicar-se 24 hores després de la sembra i les diferents concentracions de 5fdC van obtenir-se mitjançant dilucions seriades. L'exposició al tractament va mantenir-se durant 72 hores. Després de 72 hores, va realitzar-se l'assaig de viabilitat cel·lular amb sals de tetrazoli (MTT) (**Figura 50**).

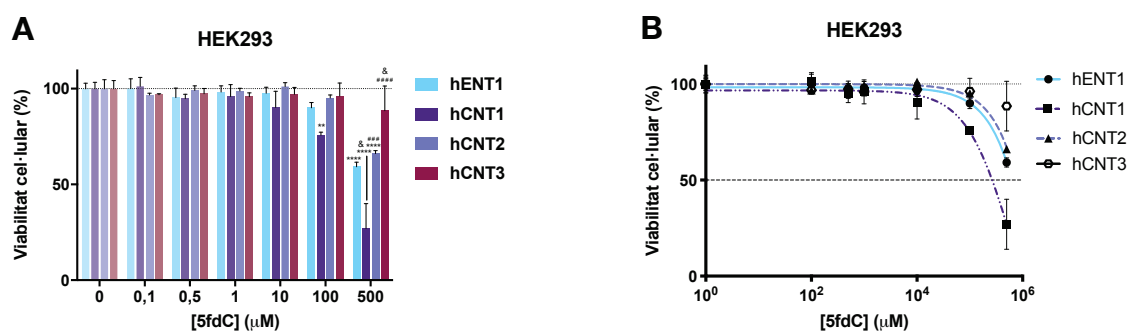


Figura 50. Efecte de 5fdC sobre la viabilitat cel·lular segons transportador de nucleòsids i en absència de CDA. Viabilitat cel·lular de cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hCNT3 i en cèl·lules HEK293 control amb el vector pcDNA5 buit (hENT1 a la llegenda de les gràfiques) després de l'exposició a 5fdC. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control (0 μM). A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 4$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (0,1 – 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM), el símbol # per diferències referides a hCNT1 (hCNT1 front a hCNT2 i hCNT3) i el símbol & per diferències referides a hENT1 (hENT1 front a hCNT1 i hCNT3). La significació estadística ve expressada com & $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ### $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ i #### $P \leq 0,0001$.

Aquests resultats obtinguts en resposta al tractament amb 5fdC resulten sorprenents a diferents nivells. En primer lloc, a diferència del que s'observa amb 5hmdC, 5fdC dona lloc a una disminució del creixement cel·lular que s'intueix a 100 µM i és molt clara a 500 µM. Per tant, sembla ser que l'efecte citotòxic de 5fdC, tot i ser dependent de CDA, no requeriria necessàriament aquesta activitat enzimàtica per tenir lloc i que, a diferència de 5hmdC, l'efecte citotòxic de 5fdC, o almenys l'efecte d'inhibició del creixement cel·lular, podria no ser exclusivament atribuïble al seu derivat d'uridina, 5fdU, sinó que també el propi nucleòsid de citidina exerciria la seva pròpia acció farmacològica de forma independent de CDA. En segon lloc, en aquest cas sí que els transportadors de nucleòsids semblarien estar implicats en la captació de 5fdC modulant així la seva biodisponibilitat i la seva acció farmacològica sobre el creixement cel·lular. D'aquests resultats, es desprèn la idea de que els transportadors responsables de la translocació de 5fdC serien hCNT1, hCNT2 i hENT1; i, en menor mesura, hCNT3 (**Figura 50**).

2.2. *Determinació dels nivells de proteïna citidina desaminasa (CDA) en una bateria de línies cel·lulars de tumors hepàtics i gastrointestinals*

Es va determinar l'expressió de l'enzim citidina desaminasa en extractes proteics obtinguts a partir de cultius cel·lulars de diverses línies cel·lulars de tumors hepàtics i gastrointestinals amb l'objectiu d'identificar i seleccionar un model cel·lular més proper a una aproximació més fisiopatològica; a diferència del model cel·lular HEK293 que, tot i ser molt útil com a model en tant que és una bona eina per a l'estudi individual de cada transportador de nucleòsids gràcies a les diferents línies cel·lulars genèticament modificades per a la sobreexpressió estable de cadascun dels transportadors, és un model més artificiós i més allunyat de qualsevol realitat fisiopatològica que es pretengui reproduir experimentalment. Es van portar a terme diversos *Western Blot* amb una càrrega de 20 µg de proteïna (**Figura 51**).

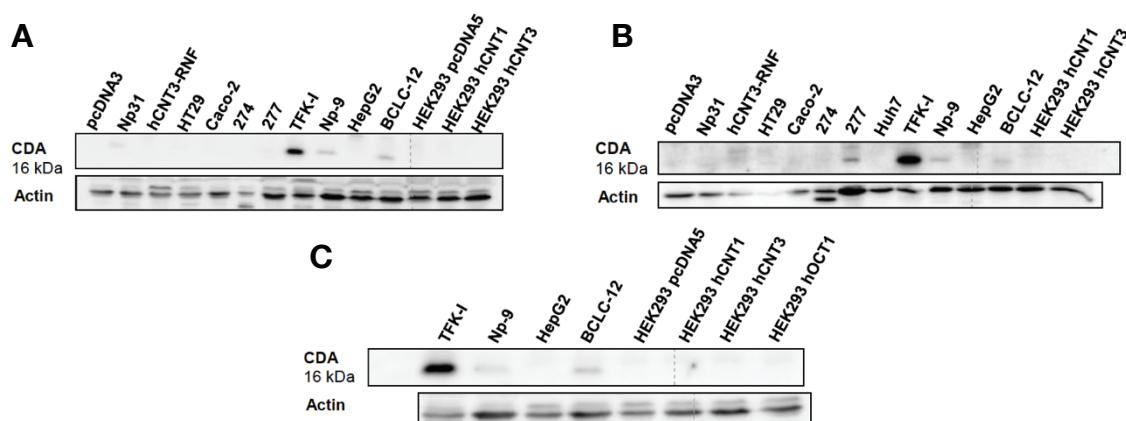


Figura 51. Expressió de CDA a nivell de proteïna en una bateria de línies cel·lulars. *Western Blot* d'extractes de proteïna de línies cel·lulars derivades de tumors hepàtics (274, 277, TFK-1, HepG2, BCLC-

12 i Huh7), pancreàtics (NP-31, HT-29 i NP-9) i gastrointestinals (Caco-2) i de cèl·lules HEK293 (pcDNA3, hCNT3-RNF, -pcDNA5, -hCNT1, -hCNT3 i -hOCT1).

La línia cel·lular derivada de colangiocarcinoma TFK-1 és la que presenta majors nivells de CDA amb molta diferència per sobre de les demás línies cel·lulars. També s'han detectat nivells més baixos de CDA a les línies d'adenocarcinoma ductal pancreàtic (NP-9 i NP-31) i de carcinoma hepatocel·lular (BCLC-12 i 277). Per aquesta raó, es va seleccionar la línia cel·lular de colangiocarcinoma TFK-1 com aproximació més fisiopatològica per elucidar la possible implicació dels transportadors de nucleòsids en la internalització dels nucleòsids epigenètics i, per tant, en el seu efecte citotòxic dependent de CDA (**Figura 51**).

2.3. Determinació dels nivells de proteïna citidina desaminasa (CDA) a les línies cel·lulars HEK293 genèticament modificades per a la sobreexpressió estable de transportadors concentratius de nucleòsids

Van determinar-se els nivells de proteïna citidina desaminasa mitjançant *Western Blot* a la línia cel·lular HEK293 genèticament modificada establement amb el vector pcDNA5 buit, a mode de control de transfecció, i a les línies cel·lulars HEK293 modificades i generades de manera anàloga per a l'expressió de cadascun dels transportadors concentratius de nucleòsids (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) continguts en el vector pcDNA5. En aquests mateixos *Western Blot* va afegir-se mostra d'extracte de proteïna de cèl·lules TFK-1 per comparar la seva expressió de CDA amb els nivells endògens de CDA en cèl·lules HEK293, en cas que n'hi hagi, i com a control positiu. A més, al primer *Western Blot* també va utilitzar-se extracte proteic de cèl·lules derivades de càncer de mama MDA-MB-231 com a control positiu d'expressió de CDA, tal i com està descrit a **zauri et al., 2015 (Figura 52)**.

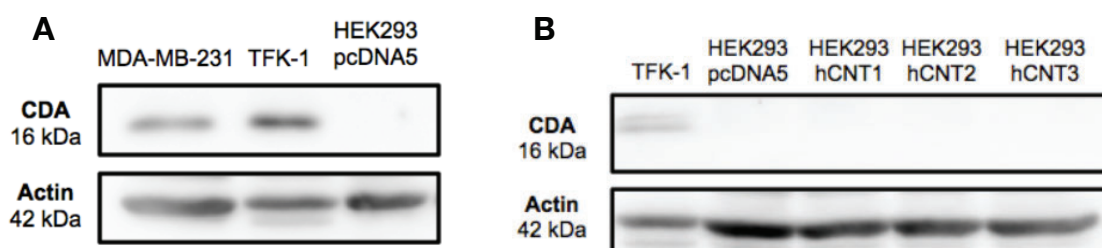


Figura 52. Expressió de CDA a nivell de proteïna en cèl·lules TFK-1 i HEK293. *Western Blot* d'extractes de proteïna (20 µg de proteïna) de cèl·lules derivades de càncer de mama MDA-MB-231, cèl·lules derivades de colangiocarcinoma TFK-1 i cèl·lules HEK293 modificades genèticament de forma estable amb el vector pcDNA5 buit (panell **A**). *Western Blot* d'extractes proteics de cèl·lules TFK-1 (20 µg de proteïna) i cèl·lules HEK293 (40 µg de proteïna) amb sobreexpressió estable dels transportadors concentratius hCNT1, hCNT2 i hCNT3 a més del control de transfecció pcDNA5 (panell **B**).

Tant a la imatge **A** com a la imatge **B**, s'observa una absència absoluta de banda corresponent a CDA per totes les línies cel·lulars HEK293. A la imatge **B** es confirma l'expressió abundant de CDA en cèl·lules TFK-1. També es confirma expressió de CDA al control positiu (cèl·lules MDA-MB-231). A la imatge **A** es mostra una banda tènue corresponent a l'expressió detectada de CDA en extractes proteics obtinguts a partir de cèl·lules TFK-1 (20 µg de proteïna). En canvi, pel que fa a l'expressió de CDA en cèl·lules HEK293-pcDNA5, HEK293-hCNT1, HEK293-hCNT2 i HEK293-hCNT3 s'observa una absència total de banda en tots els casos tot i forçar el sistema carregant el doble de quantitat de proteïna (40 µg de proteïna en cada cas) (**Figura 52**). En definitiva, a l'hora d'avaluar canvis en els efectes derivats del tractament amb els nucleòsids epigenètics deguts a l'activitat dels transportadors de nucleòsids a les línies HEK293 estables amb la necessitat d'activitat citidina desaminasa, aquesta ha de ser transfectada transitòriament en no tenir cap de les línies HEK293 nivells basals de CDA mínimament detectables. Per això, va resultar necessari generar el gen *CDA* contingut en el vector pcDNA3 que és el vector de treball en transfecció transitòria utilitzat en aquest treball.

2.4. Validació funcional del paper de l'enzim citidina desaminasa (CDA) en la citotoxicitat causada pels nucleòsids epigenètics en els models experimentals utilitzats

Abans de la realització de qualsevol estudi sobre el paper dels diversos transportadors de nucleòsids en la biodisponibilitat i l'acció farmacològica dels nucleòsids epigenètics, es va validar la citotoxicitat dependent de CDA dels nucleòsids epigenètics a través d'assaigs de viabilitat cel·lular en les línies cel·lulars HEK293-pcDNA5 i TFK-1. En el cas de la línia cel·lular HEK293-pcDNA5, aquesta fou transfectada transitòriament amb CDA en no tenir-ne de forma endògena. Es va comparar la citotoxicitat observada en cèl·lules amb expressió de CDA (HEK293-pcDNA5 + CDA i TFK-1) amb l'observada en cèl·lules sense activitat CDA (HEK293-pcDNA5) (**Figures 63–66**).

Es va utilitzar el nucleòsid epigenètic 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC) com a control d'absència de citotoxicitat en presència de CDA. 5mdC és considerada la quinta base del genoma en tractar-se de la marca epigenètica més habitual en la regulació de l'expressió gènica. A més, la desaminació de 5mdC dona com a resultat 2'-desoxitimidina (dT). Un excés de timidina a la cèl·lula condueix a una aturada del cycle cel·lular donant lloc a un bloqueig de la divisió cel·lular que al seu torn causa una inhibició del creixement cel·lular per disminució de la proliferació, però en cap cas per inducció de mecanismes de citotoxicitat. En tractar les cèl·lules amb 5mdC s'observa un lleuger efecte inhibitori del creixement cel·lular en cèl·lules amb CDA (HEK293-pcDNA5 + CDA

i TFK-1). En canvi, aquesta activitat inhibidòria no s'observa en cèl·lules HEK293-pcDNA5 sense CDA. Aparentment, no es podria atribuir aquest efecte a una activitat citotòxica del producte de desaminació de 5mdC en observar-se un efecte poc important comparativament en relació al control (aproximadament de l'ordre de fins un màxim d'un 20–25% d'inhibició del creixement cel·lular) i donant-se a més a concentracions més aviat elevades. Mentre que en cèl·lules TFK-1 la disminució en el creixement cel·lular per part de la desoxitimidina resultant de 5mdC ja és palpable a més baixes concentracions (de fet, ja és apreciable a la concentració més baixa utilitzada, 10 μ M), l'efecte en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA es nota a partir d'una concentració més elevada, concretament, 100 μ M (**Figura 53**).

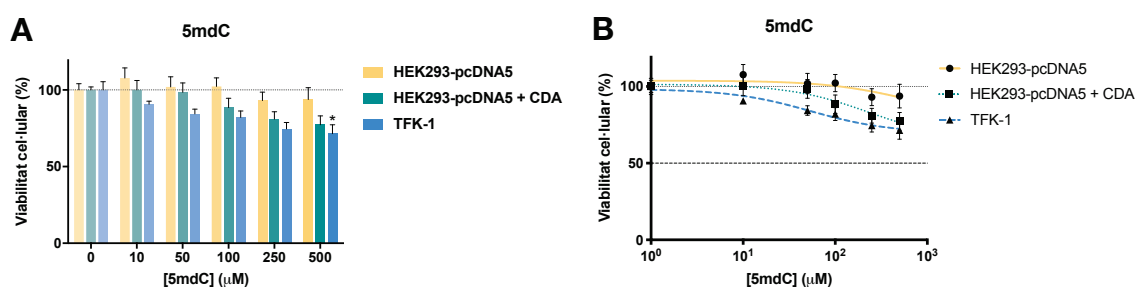


Figura 53. Efecte de 5mdC sobre la viabilitat cel·lular. Viabilitat cel·lular de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb expressió transitòria de CDA i cèl·lules TFK-1 amb expressió endògena elevada de CDA després de l'exposició a 5mdC. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges estan representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de 5mdC (10 – 500 μ M) i el seu control respectiu (0 μ M). La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$.

Quan es tracten les cèl·lules amb 5hmdC, curiosament s'observa un efecte bastant similar a aquell prèviament observat en tractar les cèl·lules amb 5mdC. En aquest cas, la desaminació de 5hmdC no dona lloc a un nucleòsid canònic i present a la seqüència del DNA com és el cas de la desoxitimidina, sinó que dona lloc al seu derivat d'uridina hidroximetilat respectiu, 5hmdU. 5hmdU és altament citotòxic per a la cèl·lula (*Zauri et al., 2015*). En cèl·lules sense activitat CDA el tractament amb 5hmdC no té cap efecte citotòxic ni inhibitori del creixement cel·lular, ni tan sols a la concentració més alta utilitzada (500 μ M). Per altra banda, si l'enzim citidina desaminasa és present a la cèl·lula i 5hmdC pot ser desaminada a 5hmdU, aquesta comporta una reducció del creixement cel·lular d'una forma semblant al que succeeix amb 5mdC. Els diferents comportaments observats en la disminució en el creixement cel·lular en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA i TFK-1 segueixen un patró similar als que tenen lloc amb 5mdC. En cèl·lules TFK-1 el menor creixement cel·lular, tot i no ser molt important, s'intueix ja des de la concentració més petita utilitzada (10 μ M) i es fa evident des de la següent concentració utilitzada (50

μM) i així successivament fins $500 \mu\text{M}$. No obstant, existeix un increment clar de l'efecte entre 10 i $50 \mu\text{M}$, encara que a partir d'aquesta última es manté més o menys constant, en aproximadament un 25% d'inhibició del creixement cel·lular, tot i els increments successius en la concentració de 5hmdC. Tot i tenir un efecte similar al de 5mdC en funció tant de la concentració com de la línia cel·lular utilitzada, és cert que l'efecte produït per 5hmdC és lleugerament major. Aquesta qüestió en particular és abordada en el següent apartat d'aquest treball (Figura 54).

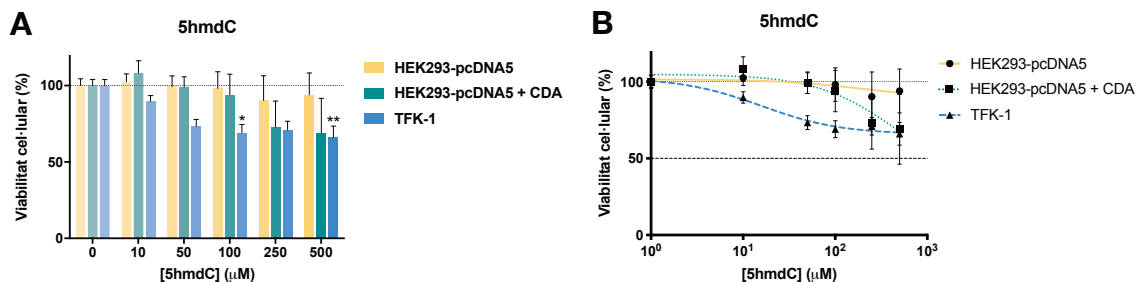


Figura 54. Efecte de 5hmdC sobre la viabilitat cel·lular. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb expressió transitoria de CDA i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està expressada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de 5hmdC ($10 - 500 \mu\text{M}$) i el seu control respectiu ($0 \mu\text{M}$). La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$ i ** $P \leq 0,01$.

Quan les cèl·lules amb activitat CDA són tractades amb 5fdC s'observa un clar efecte de mort cel·lular de forma molt evident. A més, en aquest cas, degut a la potència de l'efecte citotòxic observat, per poder establir un rang de concentracions que permetés elucidar un comportament en què la resposta depengués de la concentració, es va treballar amb concentracions d'entre un i dos ordres de magnitud menors que en els casos anteriors. A diferència de 5hmdC, amb 5fdC sí que té lloc un efecte citotòxic molt potent que demana com a requisit indispensable la desaminació del nucleòsid per part de CDA, essent així mateix el seu derivat desaminat, 5fdU, el compost actiu responsable de desencadenar una resposta de mort cel·lular massiva. El tractament amb 5fdC en cèl·lules HEK293-pcDNA5 sense activitat CDA no dona lloc a citotoxicitat a cap de les concentracions aplicades, ni tan sols a la concentració més alta ($10 \mu\text{M}$). En canvi, en cèl·lules amb CDA, tant HEK293-pcDNA5 transfectades com TFK-1, el tractament amb 5fdC resulta clarament letal. En cèl·lules HEK293-pcDNA5 transfectades transitòriament amb CDA s'observa una lleugera reducció en el creixement cel·lular a $1 \mu\text{M}$ i té lloc un efecte citotòxic pràcticament letal a $5 \mu\text{M}$ i completament letal a $10 \mu\text{M}$ amb un 100% de mort cel·lular. En cèl·lules TFK-1 l'efecte degut a l'exposició a 5fdC comença a

observar-se a concentracions més baixes (0,1 i 0,5 μM) que en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA, però a mesura que s'incrementa la concentració de 5fdC l'augment de l'efecte resulta més progressiu i gradual en cèl·lules TFK-1. De fet, la letalitat de 5fdC a concentracions de 5 i 10 μM observada en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA no és tal en cèl·lules TFK-1, encara que l'efecte citotòxic segueix sent d'una intensitat com a mínim destacable, tractant-se d'un efecte del voltant del 50% a 5 μM i d'aproximadament el 70–75% a 10 μM . Els valors de IC_{50} van resultar ser $5,42 \pm 0,001 \mu\text{M}$ en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb expressió transitòria de CDA i $4,63 \pm 0,001 \mu\text{M}$ en cèl·lules TFK-1 (**Figura 55**).

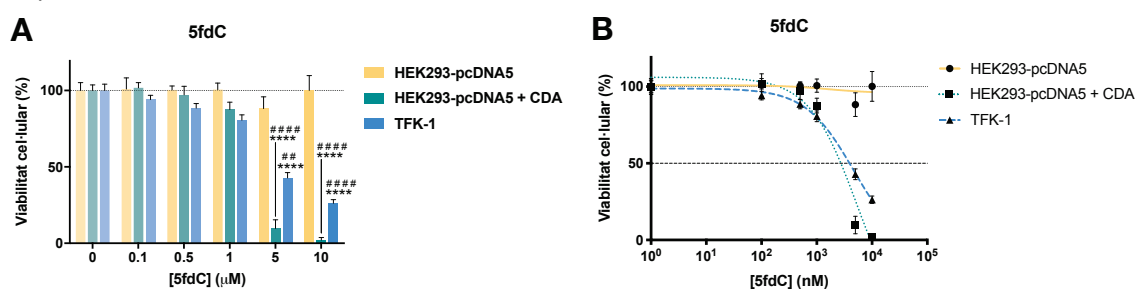


Figura 55. Efecte de 5fdC sobre la viabilitat cel·lular. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC en cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb expressió transitòria de CDA i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística es mostra mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (0,1 – 10 μM) i el seu control respectiu (0 μM) i el símbol # per diferències referides a l'activitat CDA (HEK293-pcDNA5 + CDA i TFK-1 front a HEK293-pcDNA5). La significació estadística ve expressada com ## $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$; ##### $P \leq 0,0001$.

Es va utilitzar 5hmdU com únic nucleòsid epigenètic d'uridina dels quatre nucleòsids epigenètics estudiats en les diferents línies cel·lulars. Aquest nucleòsid, a diferència dels anteriors, no requereix activitat enzimàtica citidina desaminasa per exercir la seva activitat citotòxica. Per aquest motiu, es va realitzar el mateix assaig de viabilitat cel·lular que es va dur a terme amb els diversos nucleòsids epigenètics de citidina amb 5hmdU amb l'objectiu de validar la dependència dels anteriors respecte CDA. Per tant, per aquesta raó s'observa el mateix efecte degut a l'exposició a 5hmdU en cèl·lules sense CDA (HEK293-pcDNA5) i en cèl·lules amb CDA (HEK293-pcDNA5 + CDA i TFK-1); a diferència dels tres casos anteriors (5mdC, 5hmdC i 5fdC) en què la mort cel·lular o la inhibició del creixement degudes a l'exposició al nucleòsid epigenètic s'observen únicament en presència d'activitat citidina desaminasa. Pot dir-se que es va utilitzar 5hmdU com a control positiu en quant a dependència de CDA es refereix. Efectivament, en les tres condicions té lloc un efecte de mort cel·lular molt pronunciat en tots els casos, essent aquest més intens en cèl·lules HEK293-pcDNA5, amb i sense CDA, i més atenuat en cèl·lules TFK-1. De fet, l'efecte observat en cèl·lules HEK293-pcDNA5 sense

CDA i HEK293–pcDNA5 amb CDA és el mateix. Les diferències en relació a la potència de l'efecte citotòxic observades entre les línies cel·lulars HEK293–pcDNA5 i TFK-1 probablement siguin atribuïbles als diferents comportaments en termes de creixement cel·lular propis de cada línia cel·lular en particular. Els valors de IC₅₀ van resultar ser 70,21 ± 1,51 µM i 68,18 ± 1,61 µM en cèl·lules HEK293–pcDNA5 i HEK293–pcDNA5 + CDA, respectivament; i 24,68 ± 1,77 µM respecte l'efecte màxim observat d'aproximadament un 55% d'inhibició del creixement observat en cèl·lules TFK-1 (**Figura 56**).

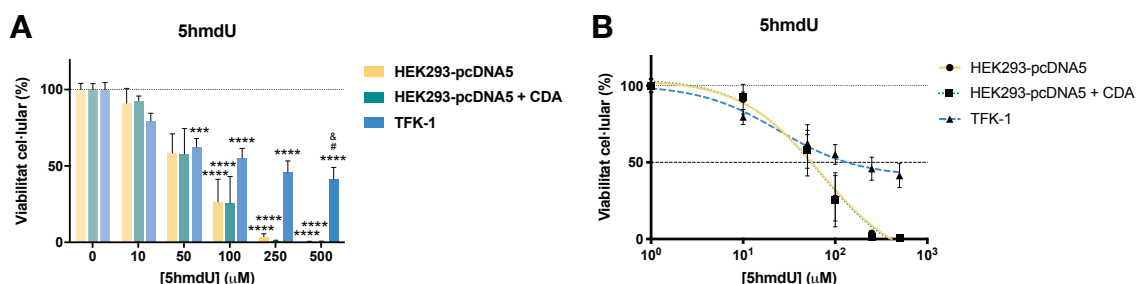


Figura 56. Efecte de 5hmdU sobre la viabilitat cel·lular. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdU de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb expressió transitoria de CDA i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 µM) i el seu control respectiu (0 µM); el símbol # per diferències referides a l'activitat CDA (HEK293-pcDNA5 + CDA i TFK-1 front a HEK293-pcDNA5) i el símbol & per diferències entre els dos models cel·lulars amb expressió de CDA (TFK-1 front a HEK293-pcDNA5 + CDA). La significació estadística ve expressada com # $P \leq 0,05$; & $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$ i **** $P \leq 0,0001$.

2.5. Estudi del paper dels transportadors de nucleòsids en la biodisponibilitat i el mecanisme d'acció dels nucleòsids epigenètics

De manera anàloga a l'apartat anterior, es va avaluar l'efecte citotòxic causat per cadascun dels nucleòsids epigenètics en funció de la presència de cadascun dels transportadors de nucleòsids. En tots els casos van dur-se a terme assaigs de viabilitat cel·lular en plaques de 96 pous amb una densitat cel·lular de 8×10^3 cèl·lules en el moment de la sembra. Es va treballar amb ambdós models cel·lulars, HEK293 i TFK-1. Transcorregudes 24 hores després de la sembra, es van transfectar les cèl·lules HEK293 i TFK-1 amb CDA o cadascun dels diferents transportadors concentratius de nucleòsids (*SLC28A1*, *SLC28A2* i *SLC28A3*), respectivament (**Figures 68–83**).

El transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 presenta selectivitat pel transport de nucleòsids de pirimidina, és a dir, citidina, timidina i uridina. A més, hCNT1 també presenta capacitat de reconeixement d'adenosina, encara que sense que tingui lloc la seva translocació mitjançada per aquest

transportador. Per tant, en el cas d'hCNT1 podria esperar-se que transloqués algun o diversos nucleòsids epigenètics utilitzats en aquest treball en tractar-se de nucleòsids de citidina i d'uridina. El fet que el fenomen de translocació mitjançat pel transportador tingui lloc o no, pot ser extrapolat a partir de l'activitat citotòxica del nucleòsid epigenètic en presència d'activitat CDA i del propi transportador. Es va analitzar l'efecte sobre la viabilitat cel·lular dels nucleòsids epigenètics en presència de hCNT1 tant en cèl·lules HEK293-hCNT1 en comparació amb cèl·lules HEK293-pcDNA5 transfectades amb CDA com en cèl·lules TFK-1 transfectades amb hCNT1 (**Figures 57–60**).

En cèl·lules HEK293-hCNT1 s'observa una disminució de la viabilitat cel·lular deguda a la presència d'hCNT1 d'aproximadament un 50% a una concentració de 5mM de 500 µM. Aquesta reducció en el creixement cel·lular s'observa únicament en presència de CDA i no es dona en cèl·lules HEK293-pcDNA5 sense el transportador hCNT1. Aquest efecte de hCNT1 en l'accés de 5mM a l'interior cel·lular també s'observa en cèl·lules TFK-1. Tot i no presentar diferències estadísticament significatives, és cert que existeix una tendència a un menor creixement cel·lular en cèl·lules TFK-1 transfectades amb hCNT1 respecte el seu control pcDNA3. En no tractar-se d'un dels dos nucleòsids epigenètics de citotoxicitat coneguda (5hmdC i 5fdC), 5mM produeix una inhibició del creixement cel·lular probablement degut a la seva conversió en desoxitimidina per part de l'activitat CDA. És conegut que la timidina actua com un agent bloquejant de l'avenç del cicle cel·lular essent aquesta una explicació plausible del 50% de disminució del creixement cel·lular en presència de CDA a la concentració més alta de 5mM (**Figura 57**).

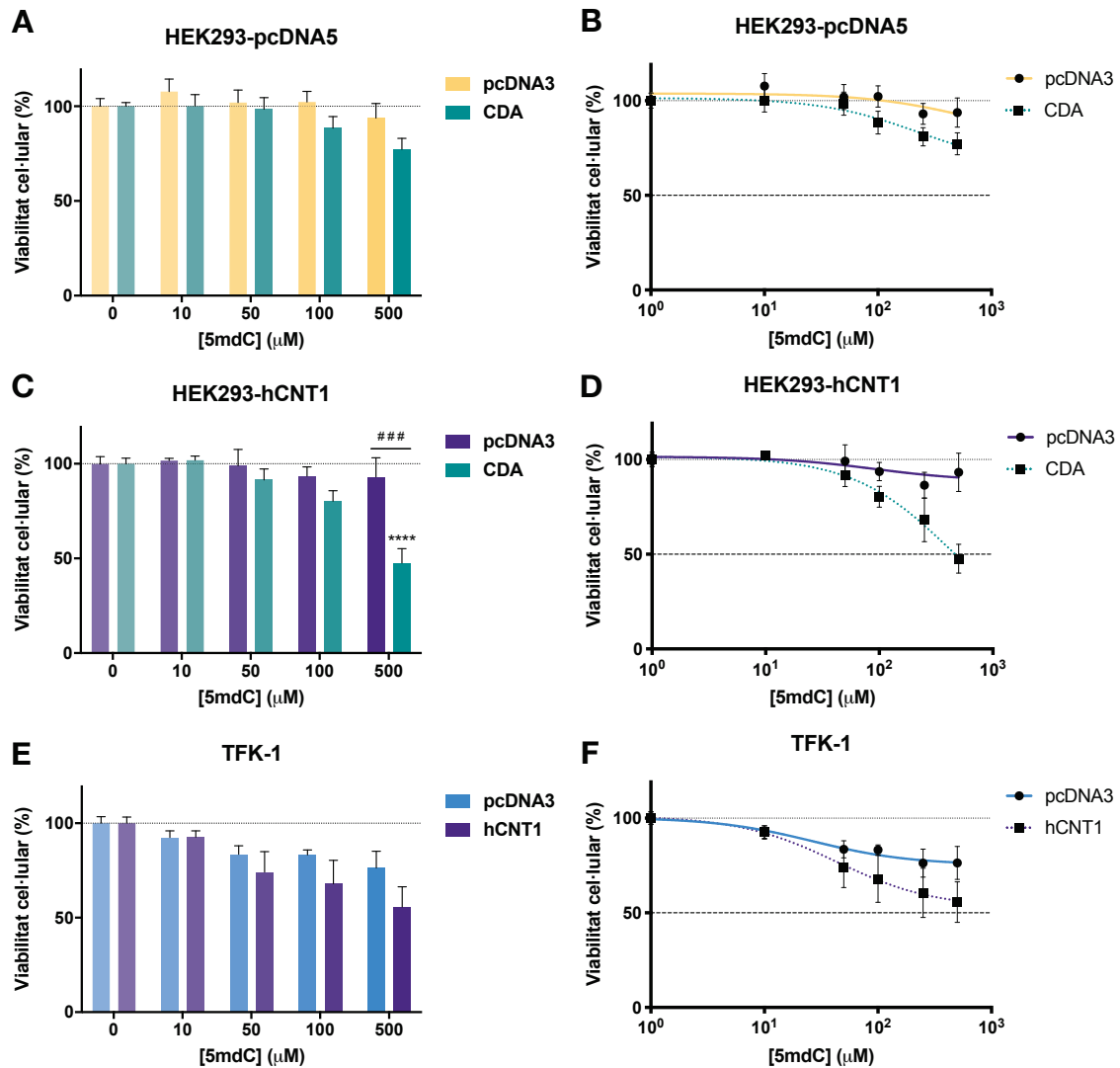


Figura 57. Transport de 5mdC per hcCNT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5mdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hcCNT1 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM) i el símbol # per diferències derivades de l'activitat CDA. La significació estadística ve expressada com ### $P \leq 0,001$ i **** $P \leq 0,0001$.

El nucleòsid epigenètic 5hmdC és internalitzat pel transportador hcCNT1 sense cap mena de dubte. Mentre que en cèl·lules HEK293-pcDNA5 no s'observa cap efecte sobre la viabilitat cel·lular a ninguna de les concentracions, en cèl·lules HEK293-hcCNT1 es dona una clara correlació concentració-resposta a les concentracions de 50, 100 i 500 μM. El valor de IC_{50} per 5hmdC en presència de CDA i hcCNT1 en cèl·lules HEK293 va resultar ser $91,05 \pm 1,36 \mu M$. En canvi, en cèl·lules TFK-1 no s'observa cap canvi en l'activitat del nucleòsid 5hmdC degut a la presència de hcCNT1, probablement degut als menors nivells de proteïna hcCNT1 en tractar-se d'expressió transitòria (**Figura 58**).

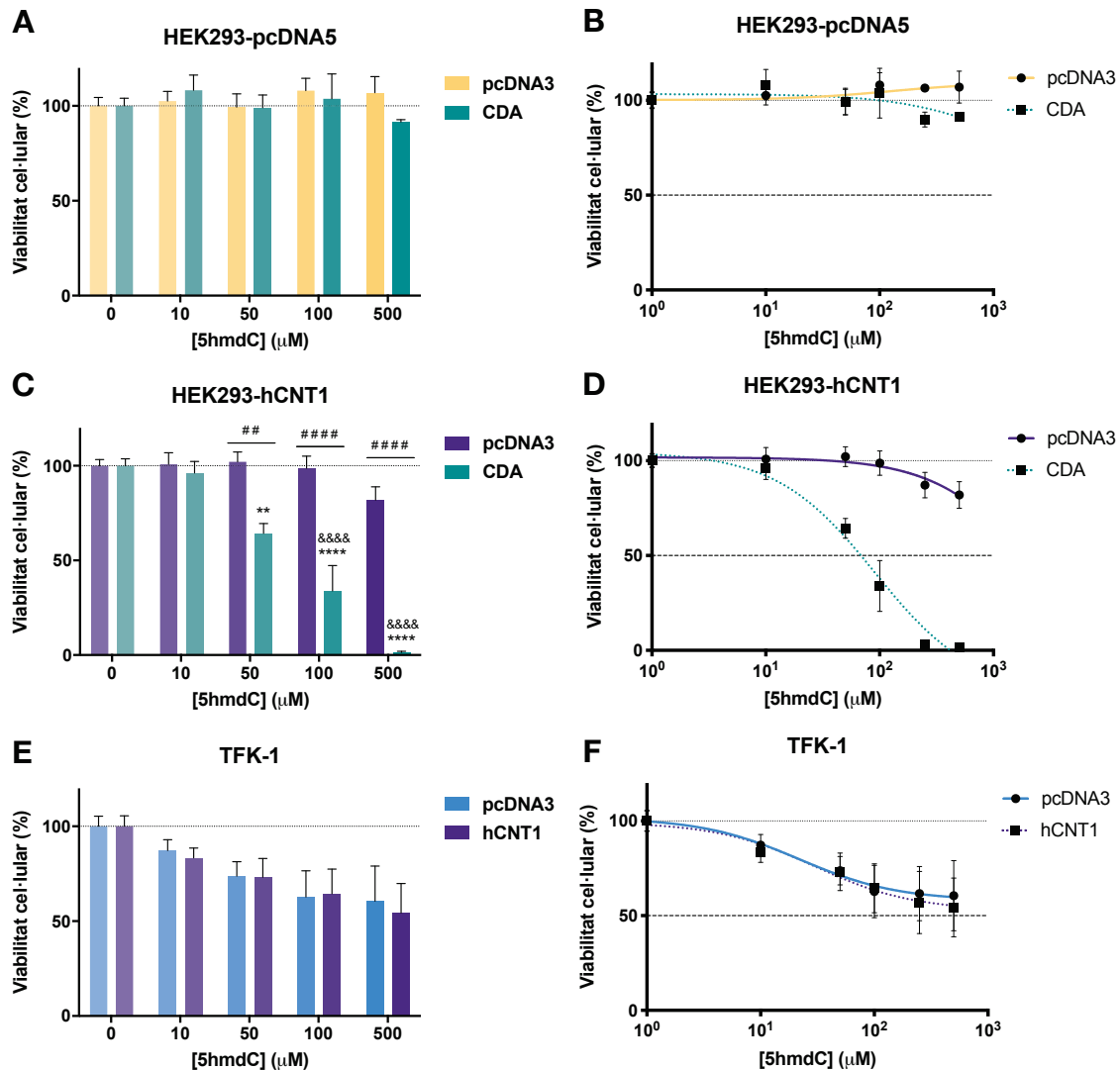


Figura 58. Transport de 5hm dC per hCNT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hm dC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT1 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μ M) i el seu control respectiu (0 μ M); el símbol # per diferències derivades de l'activitat CDA; i el símbol & per diferències atribuïbles a hCNT1. La significació estadística ve expressada com ** $P \leq 0,01$; ## $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$; ##### $P \leq 0,0001$; &&&& $P \leq 0,0001$.

El nucleòsid epigenètic 5fdC produeix una inhibició pràcticament completa del creixement cel·lular a una concentració de 5 μ M i una inhibició total a una concentració de 10 μ M en presència d'activitat CDA en cèl·lules HEK293-pcDNA5. D'aquesta manera, aquestes dades semblen indicar que el transportador hENT1, present de forma endògena en cèl·lules HEK293, seria responsable de la translocació de 5fdC. En canvi, resulta sorprenent com en cèl·lules HEK293-hCNT1 que a més de tenir hCNT1 sobreexpressat té igualment hENT1 a nivells basals, l'efecte de 5fdC en presència de CDA no té

res a veure amb el que s'observa en cèl·lules HEK293-pcDNA5. En cèl·lules HEK293-hCNT1 amb CDA, a una concentració 5 μM de 5fdC no hi ha pràcticament cap efecte sobre la viabilitat cel·lular, i a una concentració de 10 μM l'efecte sobre la viabilitat cel·lular és important, però ni molt menys comparable al que s'observa en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA a la mateixa concentració. Mentre que en cèl·lules HEK293-pcDNA5 una concentració 10 μM de 5fdC en presència de CDA cursa amb pràcticament un 100% d'inhibició del creixement, en cèl·lules HEK293-hCNT1 la inhibició és del voltant d'un 75%. L'efecte d'hCNT1 en la biodisponibilitat de 5fdC es confirma en cèl·lules TFK-1. Tant en absència com en presència d'hCNT1, l'efecte de 5fdC en cèl·lules TFK-1 és semblant. Per tant, en aquest cas la internalització de 5fdC a les cèl·lules també seria atribuïble als nivells basals d'hCNT1 expressats per la línia cel·lular TFK-1. Els valors de IC_{50} obtinguts foren $5,42 \pm 1,48 \mu\text{M}$ per 5fdC en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA; $6,16 \pm 0,002 \mu\text{M}$ per 5fdC en cèl·lules TFK-1 i $2,36 \pm 0,001 \mu\text{M}$ per 5fdC en cèl·lules TFK-1 amb hCNT1 (**Figura 59**).

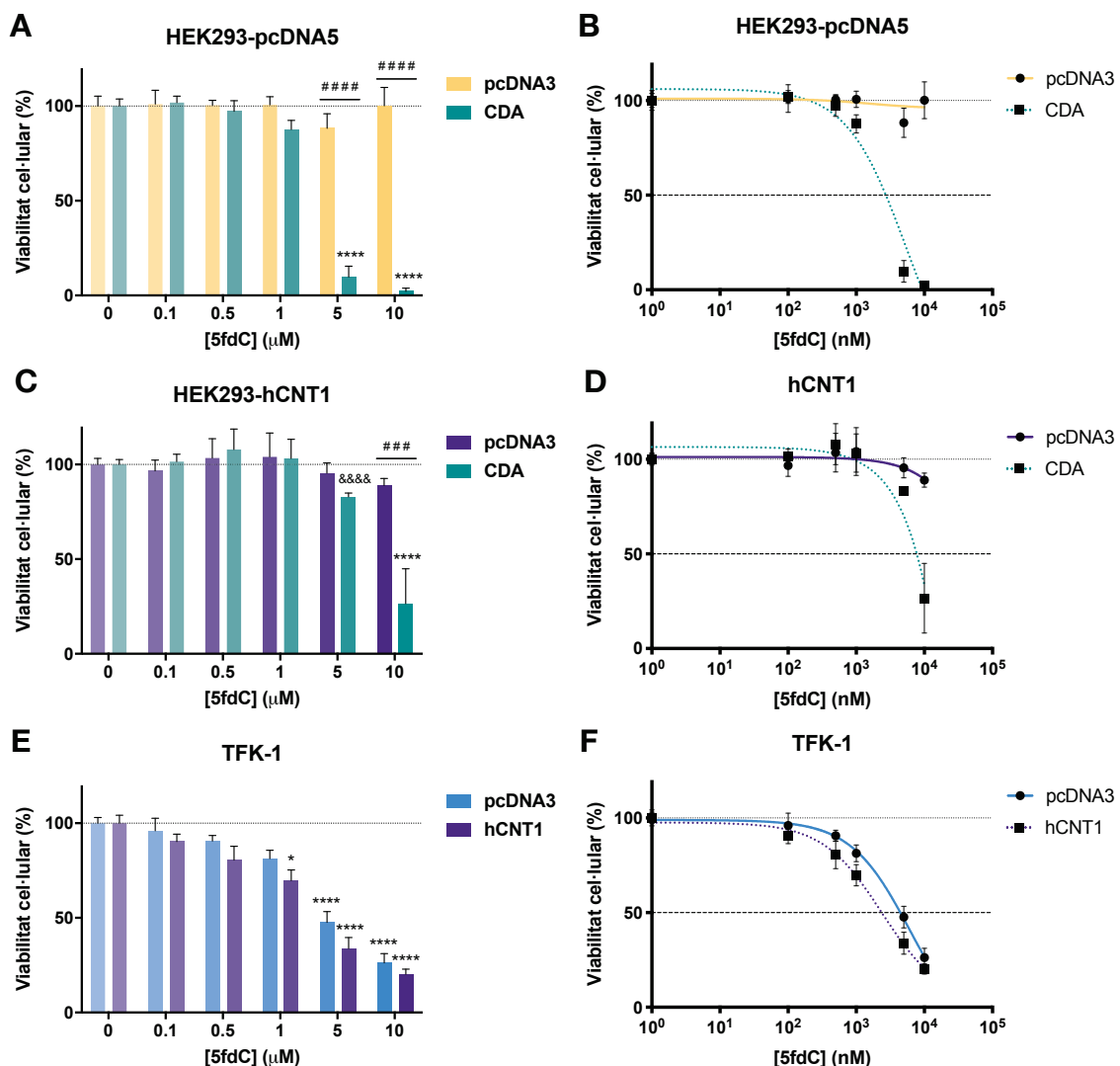
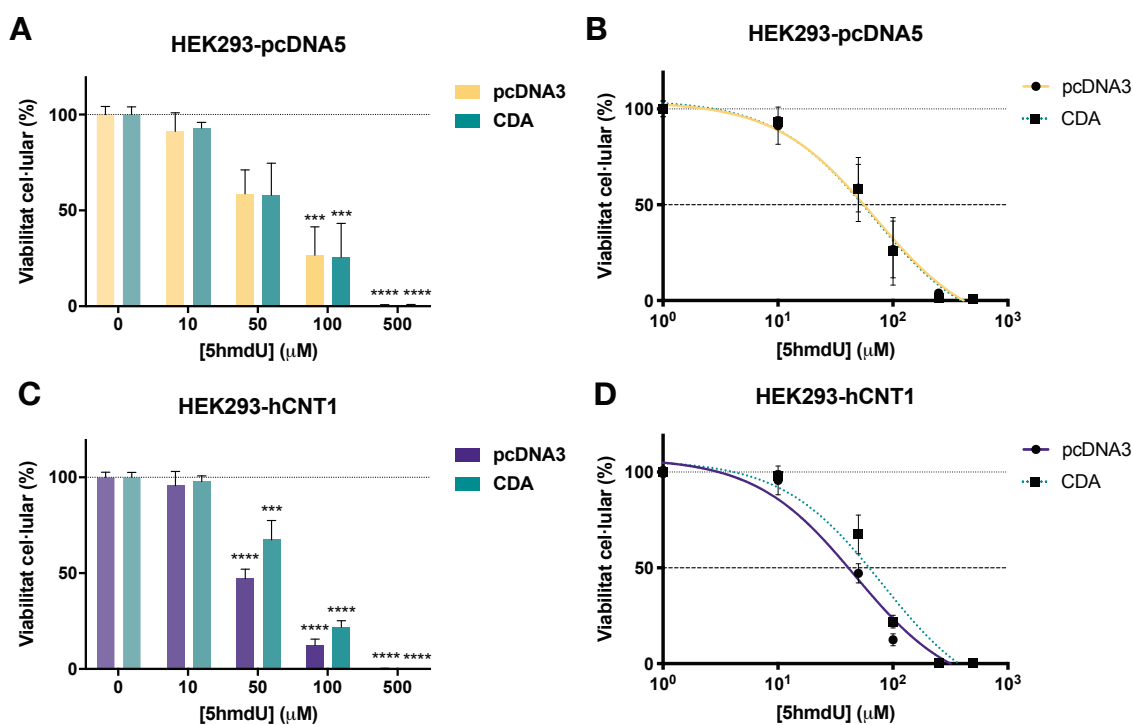


Figura 59. Transport de 5fdC per hCNT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT1 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μ M) i el seu control respectiu (0 μ M); el símbol # per diferències derivades de l'activitat CDA; i el símbol & per diferències atribuïbles a hCNT1. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; ### $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$; #### $P \leq 0,0001$ i &&&& $P \leq 0,0001$.

En tractar les cèl·lules amb el nucleòsid 5hmdU, aquestes moren indistintament de si tenen activitat CDA o no, donat que es tracta directament del nucleòsid d'uridina. No s'observen diferències significatives en la mortalitat cel·lular atribuïbles a la presència del transportador hCNT1. En tot cas, podria inferir-se en certa manera que la presència d'hCNT1 sensibilitza les cèl·lules en absència de CDA. En cèl·lules HEK293-pcDNA5, les dues corbes, pcDNA3 i CDA, són totalment coincidents; però en presència d'hCNT1 la corba amb CDA es manté igual i la corba amb pcDNA3 es veu lleugerament desplaçada cap a l'esquerra. En cèl·lules TFK-1 tampoc s'observen diferències significatives entre el control i les cèl·lules transfectades amb hCNT1, tot i que s'intueix un lleuger fenomen de sensibilització en presència d'hCNT1. Els valors de IC_{50} obtinguts per 5hmdU foren $70,21 \pm 1,51 \mu$ M en cèl·lules HEK293-pcDNA5; $68,18 \pm 1,61 \mu$ M en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA; $46,96 \pm 1,30 \mu$ M en cèl·lules HEK293-hCNT1; i $80,37 \pm 1,35 \mu$ M en cèl·lules HEK293-hCNT1 amb CDA (Figura 60).



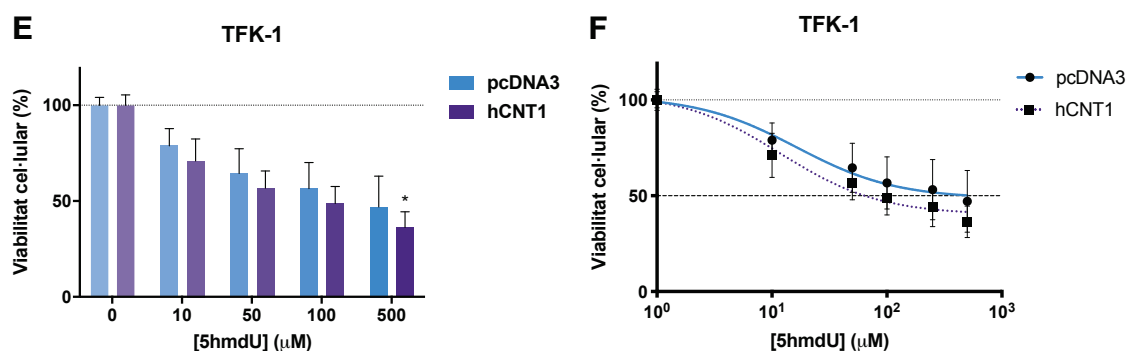
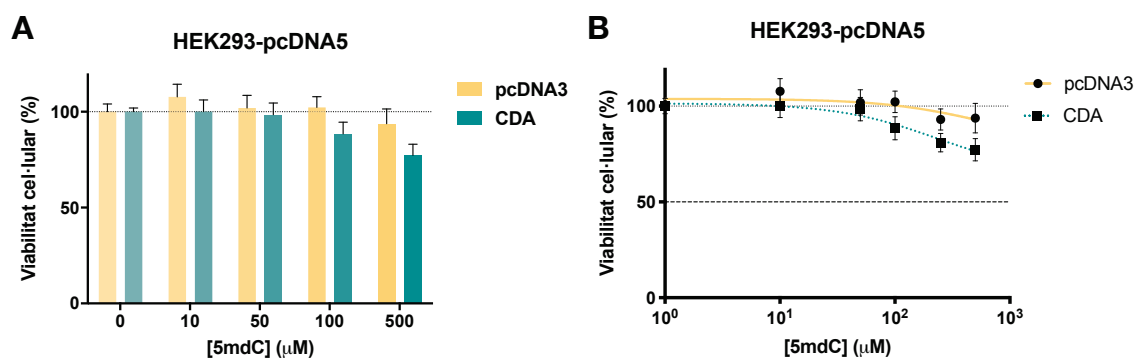


Figura 60. Transport de 5hmdU per hCNT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdU de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT1 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μ M) i el seu control respectiu (0 μ M). La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$ i **** $P \leq 0,0001$.

El transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2 presenta capacitat de translocació de nucleòsids de purina, adenosina i guanosina, a més d'uridina. En base a aquesta característica, no s'esperaria que hCNT2 contribuís a augmentar la biodisponibilitat dels nucleòsids epigenètics de citidina, encara que sí la del nucleòsid 5hmdU (**Figures 62–66**).

Com podria esperar-se en tractar-se d'un nucleòsid de pirimidina, el nucleòsid 5mdC no és captat pel transportador hCNT2. En cèl·lules HEK293-pcDNA5, com ja s'ha mostrat amb anterioritat, existeix un petit percentatge d'inhibició del creixement cel·lular dependent de CDA que probablement podria deure's a la captació d'una petita quantitat de 5mdC per part d'hENT1. Aquest fet és corroborat en observar el mateix percentatge d'inhibició de creixement en cèl·lules TFK-1 que a més és independent de la presència d'hCNT2 (**Figura 61**).



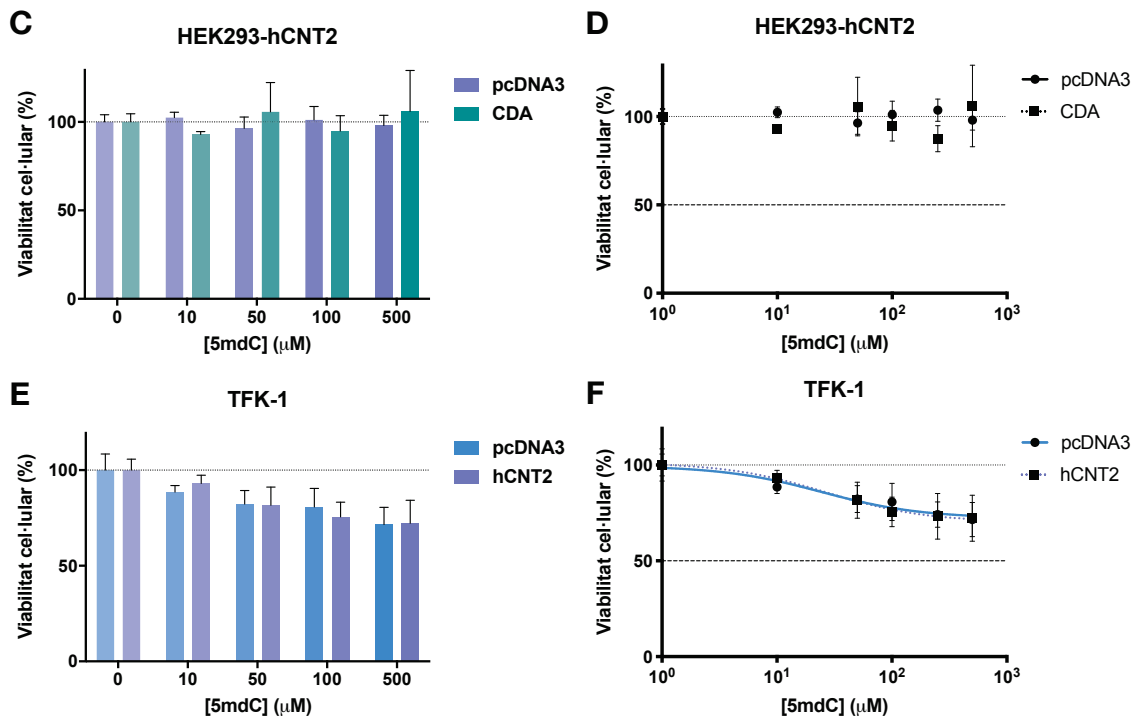
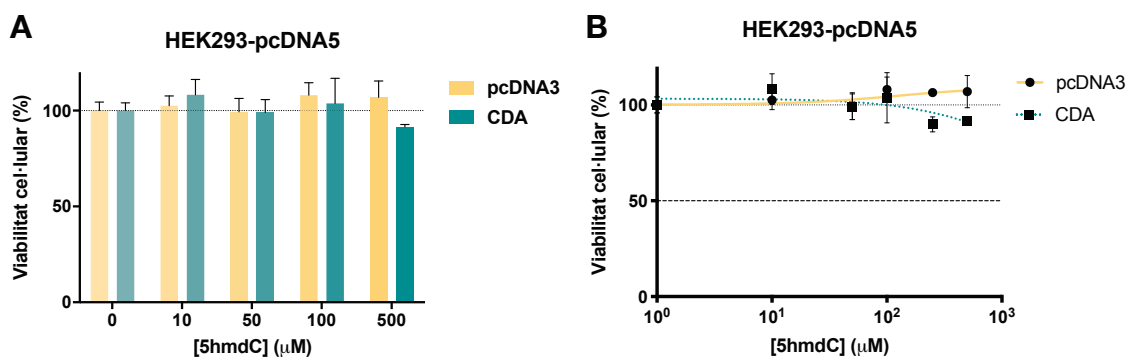


Figura 61. Transport de 5mdC per hCNT2. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5mdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT2 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No es van observar diferències estadísticament significatives en ningun dels casos.

A la vista d'aquests resultats, es pot afirmar que el nucleòsid epigenètic 5hmdC no és translocat per hCNT2. A més, també es pot dir que hENT1 tampoc participa en la internalització de 5hmdC. Aquest fet pot veure's clarament en els resultats obtinguts en cèl·lules HEK293-pcDNA5. No obstant, és cert que en cèl·lules TFK-1 es dona una certa disminució del creixement cel·lular que, si no fos degut a l'activitat de hENT1, es podria atribuir a que, en certa mesura, estigués tenint lloc un fenomen de difusió (**Figura 62**).



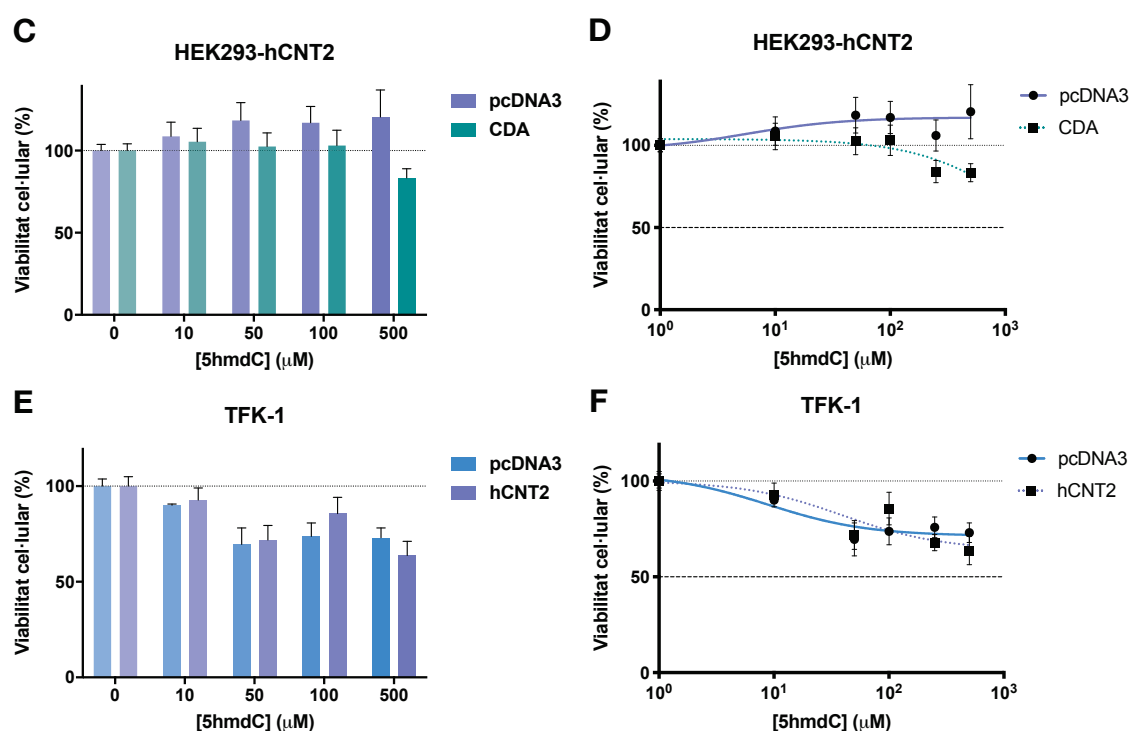


Figura 62. Transport de 5hmdC per hCNT2. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT2 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No es van observar diferències estadísticament significatives en cap dels casos.

Com s'ha comentat prèviament en el cas d'hCNT1, l'entrada de 5fdC a l'interior de la cèl·lula semblaria estar mitjançada majoritàriament per hENT1. Les dades obtingudes en cèl·lules HEK293-pcDNA5 apuntarien a hENT1 com a principal candidat a translocar 5fdC. En cèl·lules TFK-1, s'observa una inhibició del creixement en funció de la concentració de 5fdC que és independent de la presència d'hCNT2. En cèl·lules HEK293-hCNT2, d'una forma similar al que s'observa prèviament en cèl·lules HEK293-hCNT1, més enllà de ser hCNT2 un factor que afavoriria l'entrada de 5fdC, es tractaria més aviat del contrari. Més especialment a una concentració de 5 μM , hCNT2 atenua l'efecte de 5fdC mitjançat per hENT1 i CDA. Aquesta diferència s'observa també a una concentració de 10 μM , tot i que en molt menor mesura. Els valors de IC_{50} per 5fdC obtinguts en cèl·lules TFK-1 foren $4,50 \pm 0,002 \mu\text{M}$ sense hCNT2; i $3,01 \pm 0,001 \mu\text{M}$ amb hCNT2 (**Figura 63**).

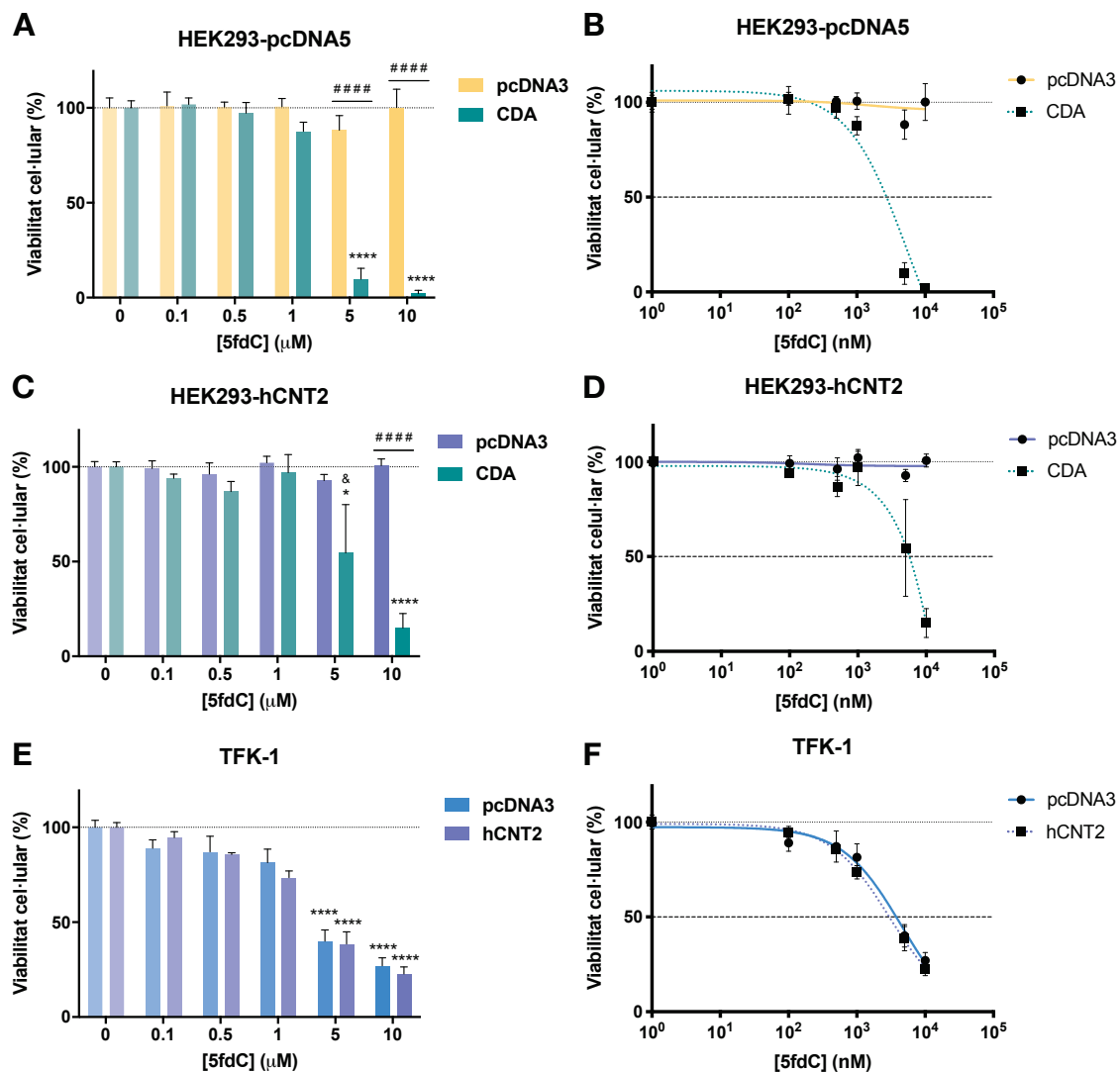


Figura 63. Transport de 5fdC per hCNT2. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT2 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μ M) i el seu control respectiu (0 μ M); el símbol # per diferències derivades de l'activitat CDA; i el símbol & per diferències atribuïbles a hCNT2. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; & $P \leq 0,05$; **** $P \leq 0,0001$ i #### $P \leq 0,0001$.

Encara que en el cas de 5hmdU, en tractar-se de l'únic nucleòsid epigenètic derivat d'uridina d'entre els quatre que es van utilitzar en aquest treball, aquest és l'únic dels nucleòsids epigenètics per al que sí que hauria pogut esperar-se translocació per part d'hCNT2, contràriament no s'observa cap aportació a l'efecte de 5hmdU per part del transportador hCNT2. Els valors de viabilitat cel·lular obtinguts en cèl·lules HEK293-pcDNA5 i en cèl·lules HEK293-hCNT2 són pràcticament iguals. A més, aquests resultats són coherents amb les dades obtingudes en cèl·lules TFK-1 en què la viabilitat

cel·lular en absència i en presència d'hCNT2 és la mateixa. Els valors de IC_{50} obtinguts per 5hmdU en cèl·lules HEK293-hCNT2 foren $84,79 \pm 1,95 \mu\text{M}$ sense CDA; i $113 \pm 2 \mu\text{M}$ amb CDA (**Figura 64**).

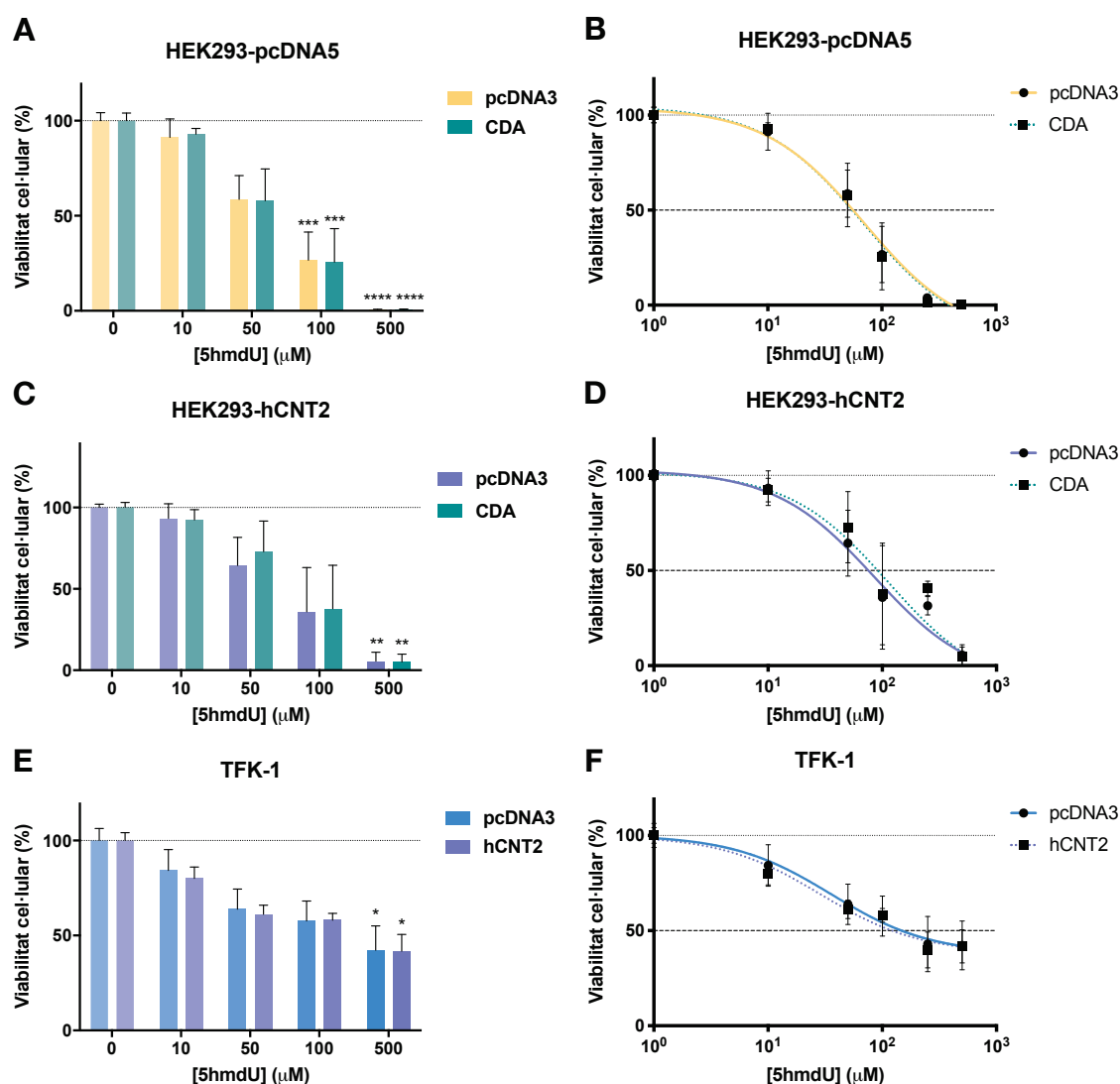


Figura 64. Transport de 5hmdU per hCNT2. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdU de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT2 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 - 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM). La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ i **** $P \leq 0,0001$.

El transportador de nucleòsids hCNT3 és el de major espectre en quant a selectivitat estructural dels seus substrats. hCNT3 té capacitat de reconeixement i de translocació tant de nucleòsids de pirimidina (citidina, timidina i uridina) com de nucleòsids de purina (guanosina i adenosina). Per tant, en el cas de hCNT3 sí que es podria esperar translocació de tots els nucleòsids

epigenètics utilitzats en aquest treball, així com una potenciació del seu efecte citotòxic o de la inhibició del creixement cel·lular (**Figures 66–69**).

En cèl·lules HEK293–hCNT3 no s’aprecia un efecte sensibilitzador del transportador respecte l’efecte de 5mdC. Més aviat al contrari, mentre que en cèl·lules HEK293–pcDNA5 s’observa un petit efecte d’inhibició del creixement en presència de CDA a concentracions més elevades de 5mdC, 100 μ M i sobretot 500 μ M, en cèl·lules HEK293–hCNT3 tots els valors de viabilitat cel·lular es troben al voltant del 100% independentment de la presència d’activitat CDA i de la concentració de 5mdC. No obstant, és cert també que, tot i no ser estadísticament significatiu, s’observa un cert efecte sensibilitzador al tractament amb 5mdC en cèl·lules TFK-1 derivat de la presència de hCNT3 (**Figura 65**).

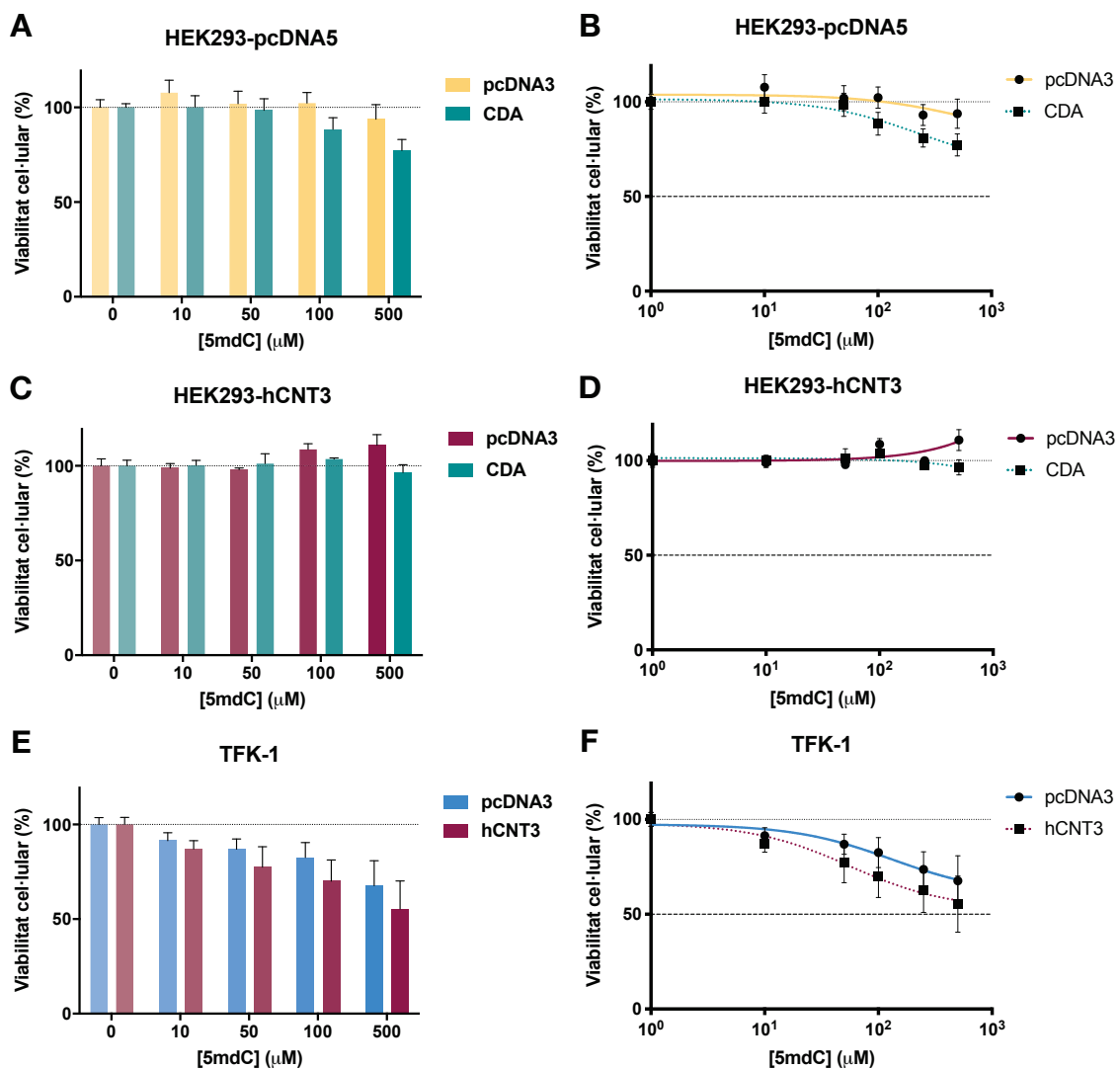


Figura 65. Transport de 5mdC per hCNT3. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5mdC de cèl·lules HEK293–pcDNA5, cèl·lules HEK293–hCNT3 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d’histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l’eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques

experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No es van observar diferències estadísticament significatives en cap dels casos.

En cèl·lules HEK293 no es van apreciar diferències en l'efecte de 5hmdC pel fet de tenir hCNT3. Tant en cèl·lules HEK293-pcDNA5 com en cèl·lules HEK293-hCNT3 es van obtenir valors de viabilitat cel·lular del 100% a totes les concentracions de 5hmdC i amb independència de l'activitat CDA. En canvi, en cèl·lules TFK-1, d'una forma semblant al que s'observa amb 5mdC, s'intueix una certa tendència sensibilitzadora a l'efecte de 5hmdC per part de hCNT3, encara que no és estadísticament significativa (**Figura 66**).

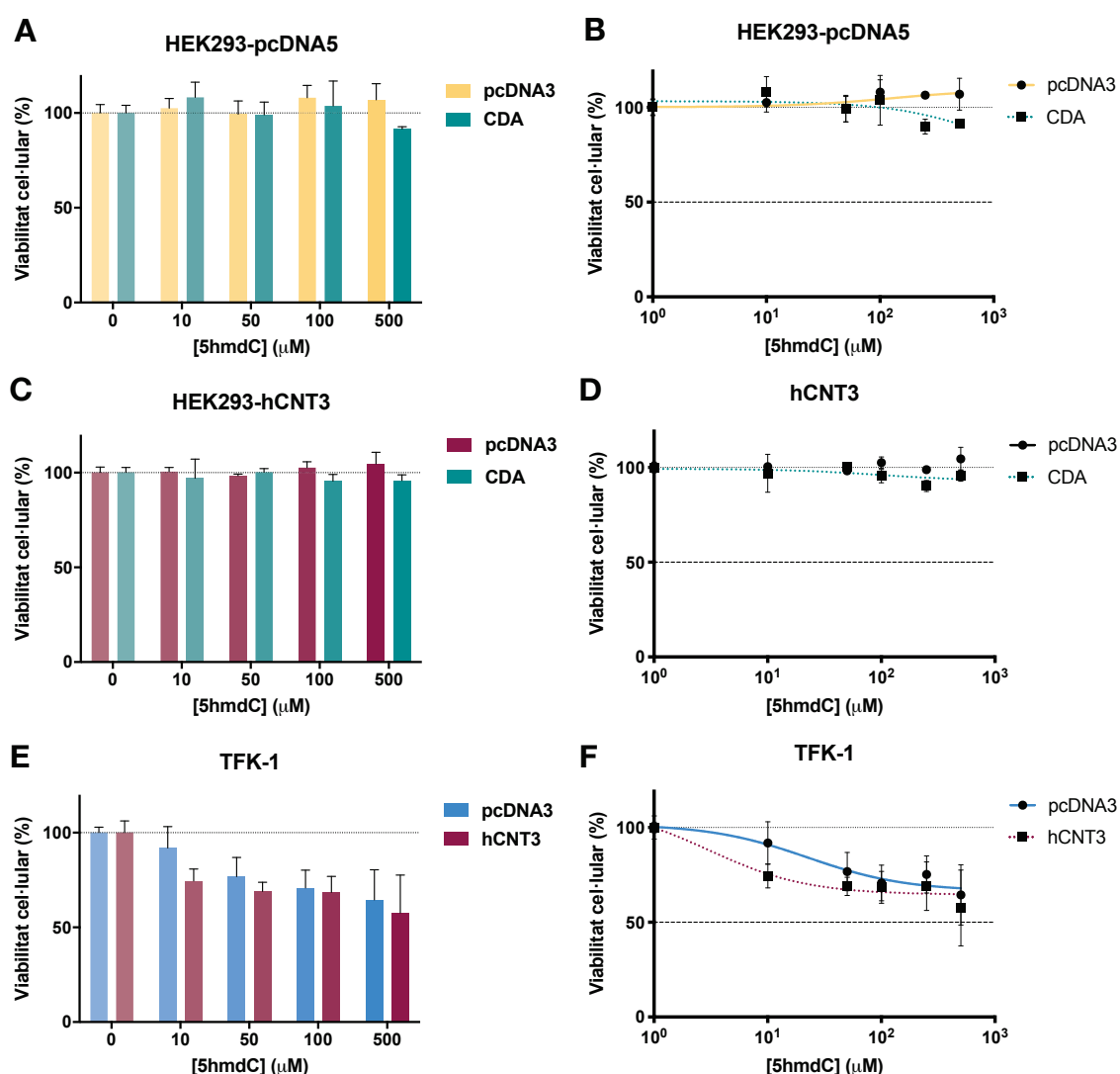


Figura 66. Transport de 5hmdC per hCNT3. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT3 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No es van observar diferències estadísticament significatives en ningun dels casos.

Igual que succeeix tant amb hCNT1 com amb hCNT2, la contribució d'hCNT3 a l'efecte de 5fdC segueix un patró similar. Partint de que les dades obtingudes semblen indicar que el transportador responsable de la captació de 5fdC és el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1, en cèl·lules HEK293 s'observa un efecte clarament atenuador per part d'hCNT3 en l'efecte citotòxic de 5fdC mitjançat per CDA i hENT1. La concentració de 5fdC a la que aquesta reversió del seu efecte es fa més evident és 5 µM. En cèl·lules TFK-1 s'observa un petit desplaçament de la corba concentració-resposta en presència d'hCNT3, tot i que no sembla ser significatiu. No obstant, aquest fet podria portar a pensar en una certa contribució del transportador hCNT3 a la translocació de 5fdC, encara que de forma totalment secundària i subordinada al fenomen principal de captació de 5fdC que presumiblement sembla ser realitzat essencialment per hENT1 (**Figura 67**).

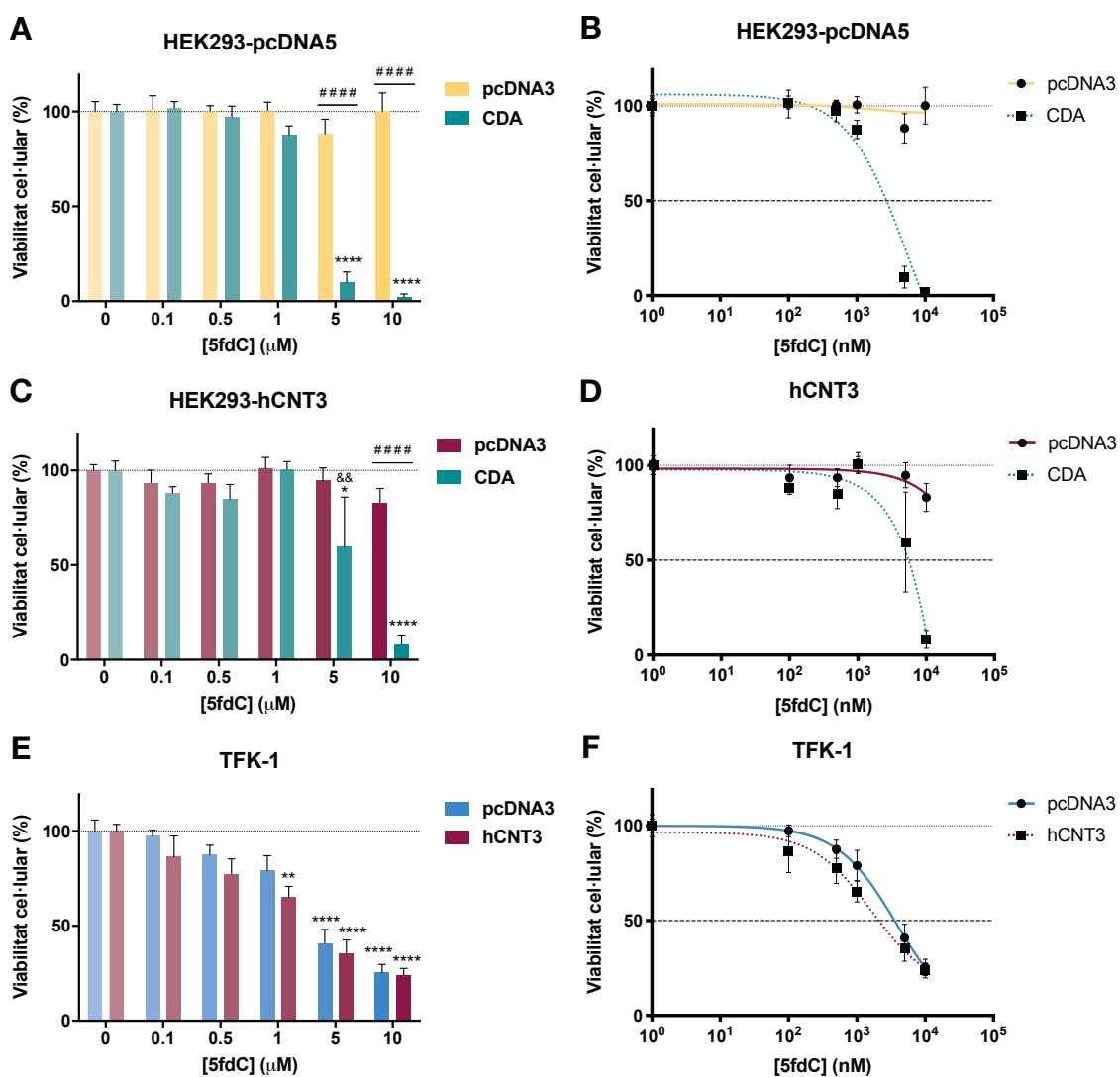
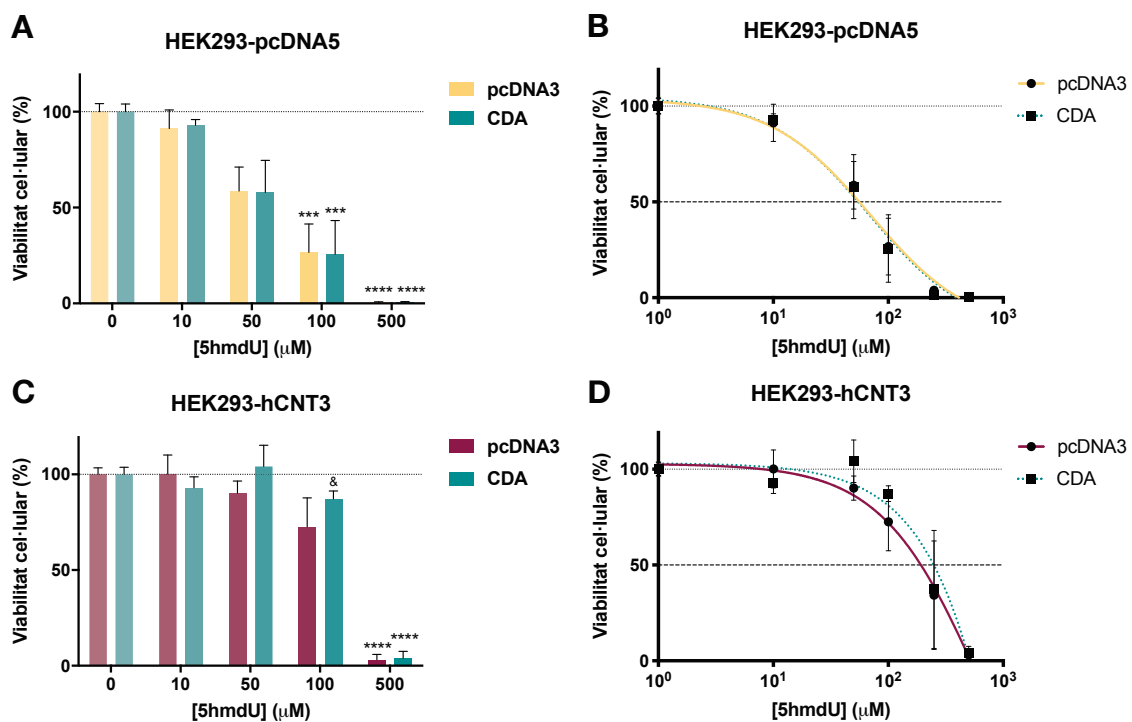


Figura 67. Transport de 5fdC per hCNT3. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT3 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques

experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM); el símbol # per diferències degudes a l'activitat CDA i el símbol & per diferències degudes a hCNT3. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; && $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$ i ##### $P \leq 0,0001$.

En tractar cèl·lules HEK293 amb 5hmdU la presència d'hCNT3 els confereix resistència al tractament a concentracions de 5hmdU de 50 i 100 μM . En cèl·lules HEK293-hCNT3 tractades amb 5hmdU a concentracions de 50 i 100 μM la viabilitat cel·lular es manté intacta o pràcticament intacta, respectivament, a aquestes dues concentracions; mentre que en cèl·lules HEK293-pcDNA5 els valors de viabilitat cel·lular, amb independència de l'activitat CDA, ronden el 50–60% i el 25–30% per les concentracions de 50 i 100 μM , respectivament. En cèl·lules TFK-1 l'efecte de 5hmdU resulta ser pràcticament el mateix independentment de la presència del transportador hCNT3. Tot i així, s'aprecia un mínim efecte atenuador de l'efecte de 5hmdU per la presència d'hCNT3, a la vista de les dues corbes obtingudes en cèl·lules TFK-1, encara que es tracti d'una diferència que és mínima (**Figura 68**).



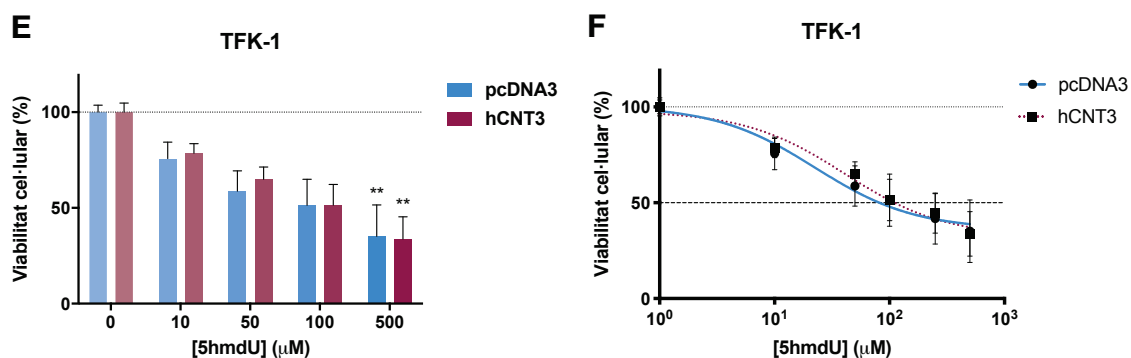
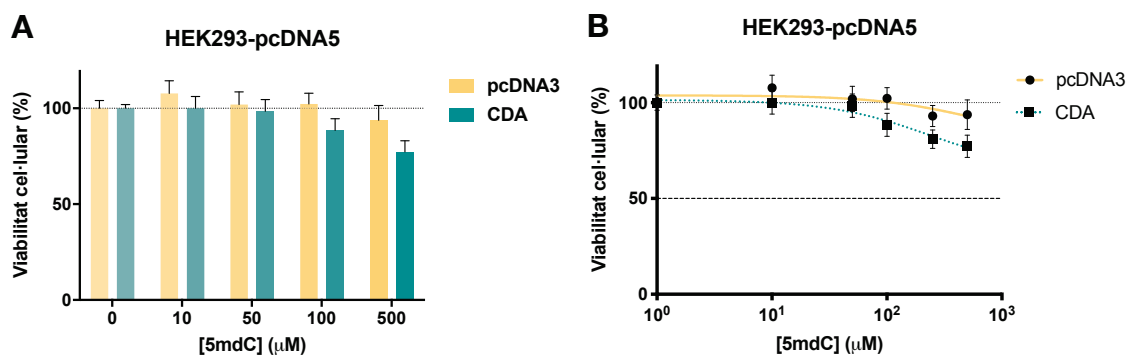


Figura 68. Transport de 5hmdU per hCNT3. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdU de cèl·lules HEK293-pcDNA5, cèl·lules HEK293-hCNT3 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van realitzar $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μ M) i el seu control respectiu (0 μ M); i el símbol & per diferències degudes a hCNT3. La significació estadística ve expressada com & $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ i **** $P \leq 0,0001$.

Per l'estudi del paper del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1 en el transport i la biodisponibilitat dels nucleòsids epigenètics es va treballar amb cèl·lules HEK293-pcDNA5 i TFK-1, donat que ambdues línies cel·lulars presenten nivells basals del transportador hENT1. Les dades d'internalització dels nucleòsids epigenètics a través d'hENT1, tant en cèl·lules HEK293-pcDNA5 com en cèl·lules TFK-1 transfectades amb el control de transfecció pcDNA3, ja s'han anat mostrant de forma parcial en els apartats anteriors precedents a aquest per, en aquest cas, treure conclusions sobre el transportador concentratiu de nucleòsids analitzat en cada cas. En aquest apartat es presenten i s'analitzen les dades únicament en relació amb el transport equilibratiu mitjançant hENT1. Per això, es mostren únicament les dades de viabilitat cel·lular en cèl·lules HEK293-pcDNA5 i en cèl·lules TFK-1 sense cap transportador concentratiu (pcDNA3) en comparació amb aquestes mateixes cèl·lules transfectades amb cadascun dels transportadors concentratius de nucleòsids (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) per elucidar la contribució neta d'hENT1 al transport en aquestes cèl·lules (**Figures 69–72**).



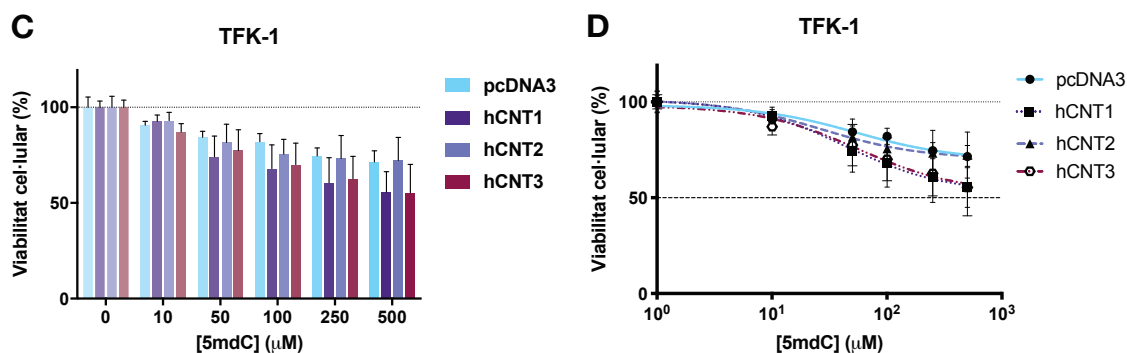


Figura 69. Transport de 5mdC per hENT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5mdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A** i **C** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B** i **D** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No es van observar diferències estadísticament significatives en cap dels casos.

En el cas de 5hmdC les dades obtingudes de viabilitat cel·lular amb hENT1 són coherents amb les dades obtingudes d'interacció de 5hmdC amb el transportador hENT1. Aquestes dades mostren que 5hmdC no interacciona amb hENT1. De la mateixa manera, en cèl·lules HEK293-pcDNA5 no s'observa cap variació en la viabilitat cel·lular a cap concentració de 5hmdC tant en absència com en presència d'activitat CDA. Pel contrari, en cèl·lules TFK-1 sí que s'observa una certa tendència a la disminució del creixement cel·lular en resposta al tractament amb 5hmdC. En aquest últim cas, és possible que existeixi un cert fenomen de difusió de 5hmdC a través de la membrana de les cèl·lules TFK-1 (**Figura 70**).

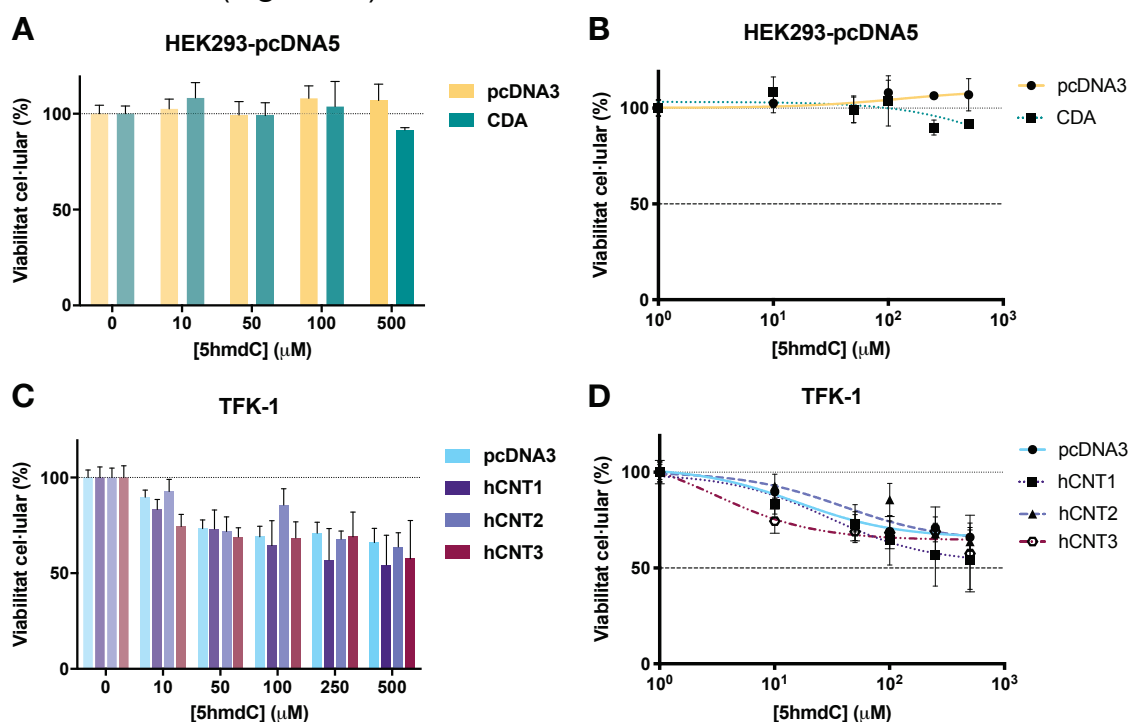
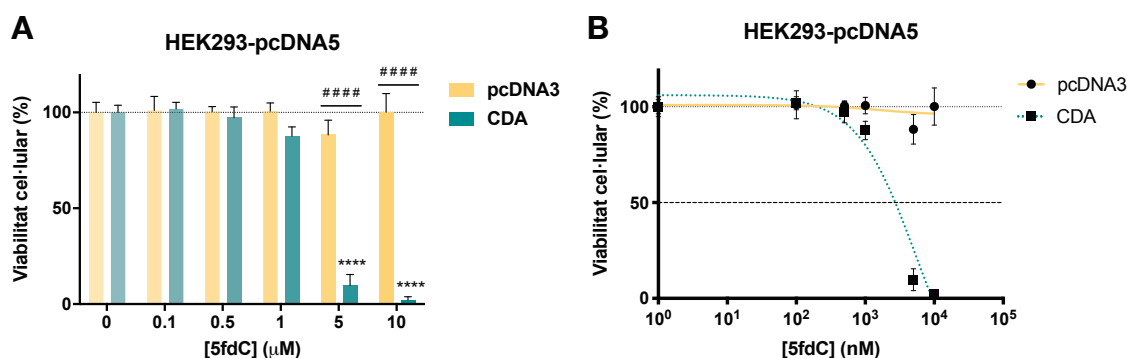


Figura 70. Transport de 5hmdC per hENT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A** i **C** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfica **B** i **D** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van realitzar $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No es van observar diferències estadísticament significatives en ningun dels casos.

En tractar cèl·lules HEK293-pcDNA5 i cèl·lules TFK-1 amb 5fdC es confirma el que ja s'ha avançat en punts anteriors d'aquest treball: el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1 presenta una alta especificitat i una alta eficiència en la translocació del nucleòsid epigenètic 5fdC. En cèl·lules HEK293-pcDNA5 s'observa un efecte específic de CDA molt important especialment a les concentracions de 5 i 10 μM de 5fdC en què la citotoxicitat és pràcticament completa. El valor de IC_{50} que va obtenir-se per a 5fdC en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA, com ja s'havia indicat prèviament, fou $5,42 \pm 1,48 \mu\text{M}$. Aquest efecte específic d'hENT1 en la biodisponibilitat de 5fdC es confirma en cèl·lules TFK-1. En tots els casos de cèl·lules TFK-1, tant el control (pcDNA3) com les cèl·lules transfectades amb els transportadors concentratius (hCNT1, hCNT2 i hCNT3), s'observen patrons similars de citotoxicitat o de disminució de la viabilitat cel·lular en funció de la concentració de nucleòsid epigenètic 5fdC. Donat que en tots els casos existeixen nivells basals d'hENT1, es podria afirmar que hENT1 és el principal responsable de la captació de 5fdC per part de la cèl·lula. Els valors de IC_{50} que es van obtenir per a 5fdC en cèl·lules TFK-1 foren $4,63 \pm 0,001 \mu\text{M}$ (pcDNA3); $2,63 \pm 0,001 \mu\text{M}$ (hCNT1); $3,01 \pm 0,001 \mu\text{M}$ (hCNT2); i $1,65 \pm 0,002 \mu\text{M}$ (hCNT3). A la vista d'aquests valors de IC_{50} , es confirmaria el que s'ha comentat pel que fa a ordre de grau de sensibilització: hCNT3 (hENT1 + hCNT3) > hCNT1 (hENT1 + hCNT1) > hCNT2 (hENT1 + hCNT2) > pcDNA3 (hENT1) (**Figura 71**).



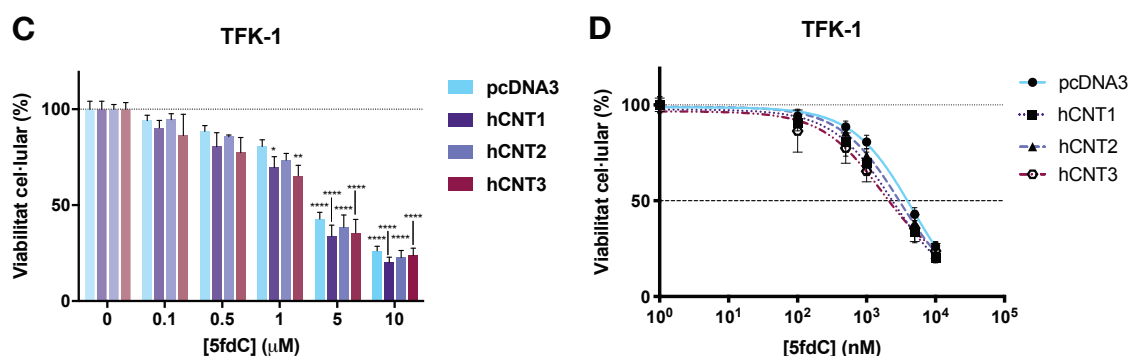
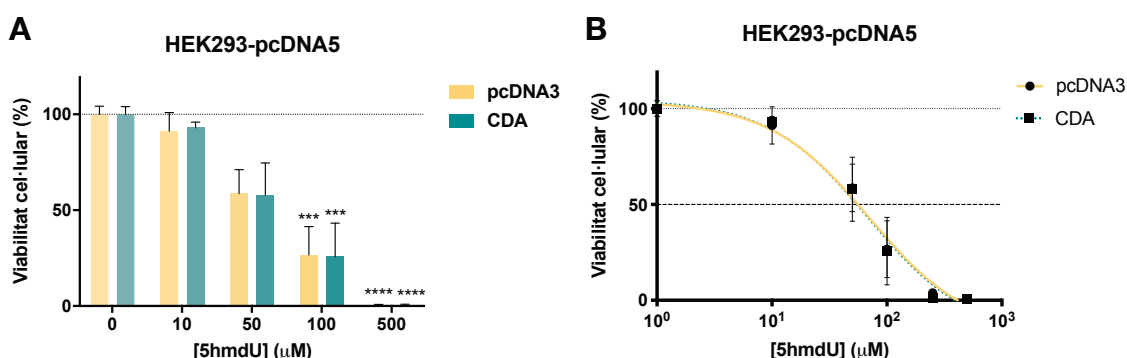


Figura 71. Transport de 5fdC per hENT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5 i cèl·lules TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A** i **C** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B** i **D** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 µM) i el seu control respectiu (0 µM); i el símbol # per diferències degudes a CDA. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$ i #### $P \leq 0,0001$.

El nucleòsid epigenètic 5hmdU seria internalitzat pel transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1, tal i com es deriva dels resultats obtinguts en cèl·lules HEK293-pcDNA5. En tractar-se directament del nucleòsid d'uridina, la seva acció farmacològica és independent de CDA. Els valors de IC_{50} per 5hmdU en cèl·lules HEK293-pcDNA5 foren $70,21 \pm 1,51 \mu\text{M}$ sense CDA i $68,18 \pm 1,61 \mu\text{M}$ amb CDA. En cèl·lules TFK-1 es van observar patrons similars de disminució de la viabilitat cel·lular independentment de que fossin transfectades amb algun dels transportadors concentratius de nucleòsids o de quin transportador concentratiu de nucleòsids en particular amb què fossin transfectades. No obstant, en el cas de les cèl·lules TFK-1 transfectades transitòriament amb hCNT1, aquestes van resultar ser lleugerament sensibilitzades a l'efecte citotòxic de 5hmdU (**Figura 72**).



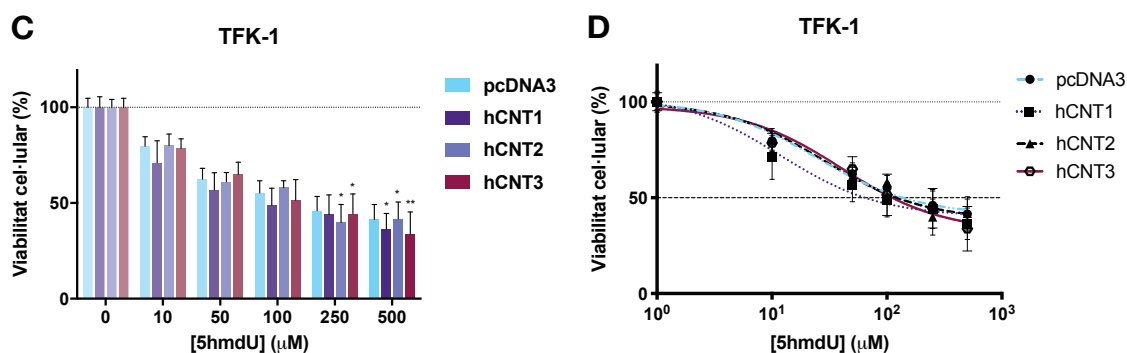


Figura 72. Transport de 5hmdU per hENT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdU de cèl·lules HEK293-pcDNA5 i TFK-1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A** i **C** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B** i **D** les dades estan representats en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 µM) i el seu control respectiu (0 µM). La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ i **** $P \leq 0,0001$.

Tot i no tractar-se específicament d'un transportador de nucleòsids, el transportador de cations orgànics hOCT1, codificat pel gen *SLC22A1*, també té una especial rellevància en fenòmens de transport, quimiosensibilització i quimioresistència a fàrmacs anàlegs de nucleòsids com, per exemple, lamivudina i bendamustina. Per aquesta raó, en aquest treball va plantejar-se avaluar la possibilitat que el transportador hOCT1 pogués exercir algun paper en la biodisponibilitat i el mecanisme d'acció dels nucleòsids epigenètics juntament amb CDA i/o els transportadors de nucleòsids. Per l'estudi d'una possible influència del transportador hOCT1 sobre la biodisponibilitat i l'efecte farmacològic dels nucleòsids epigenètics i el seu transport a través de transportadors de nucleòsids es va seleccionar com a model de treball una de les interaccions més específiques i més clares de les que es descriuen en aquest treball. En aquest cas, es va treballar amb la combinació de 5hmdC i hCNT1. Per això, es van transfectar cèl·lules HEK293-hCNT1 amb CDA i/o amb hOCT1 i foren tractades amb dues concentracions de 5hmdC (50 i 200 µM) (Figura 74). Abans d'avaluar les diferències de viabilitat cel·lular en funció de les diferents variables introduïdes (5hmdC, hCNT1, CDA i/o hOCT1) es va confirmar l'èxit de la transfecció de les cèl·lules amb CDA i/o hOCT1 a través de la determinació de sengles nivells de proteïna mitjançant anàlisi de *Western Blot* (Figura 73).

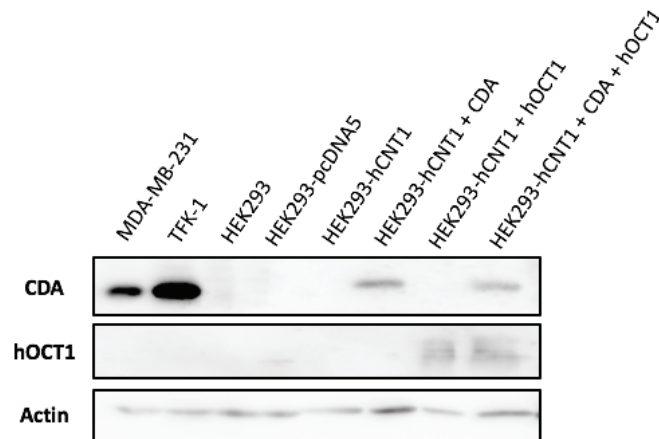


Figura 73. Expressió de CDA i hOCT1 a nivell de proteïna en cèl·lules TFK-1 i HEK293. Western Blot d'extractes de proteïna de cèl·lules derivades de càncer de mama MDA-MB-231 i cèl·lules derivades de colangiocarcinoma TFK-1, ambdues com a controls positius d'expressió de CDA; i d'extractes de proteïna de cèl·lules HEK293, HEK293-pcDNA5, HEK293-hCNT1, i HEK293-hCNT1 transfectades transitòriament amb CDA, amb hOCT1 i amb CDA i hOCT1. La quantitat de proteïna carregada en tots els casos fou de 20 µg. Els temps d'exposició tant per CDA com per hOCT1 foren de 12 minuts.

Gràcies a aquest *Western Blot* es van confirmar els nivells presents de CDA i/o d'hOCT1 en cada cas segons correspongués per validar les observacions i les seves respectives conclusions que poguessin derivar-se dels assaigs de viabilitat cel·lular que van realitzar-se en cèl·lules HEK293-hCNT1 tractades amb 5hmdC en absència o presència de CDA o hOCT1 o ambdues proteïnes alhora (**Figura 73**).

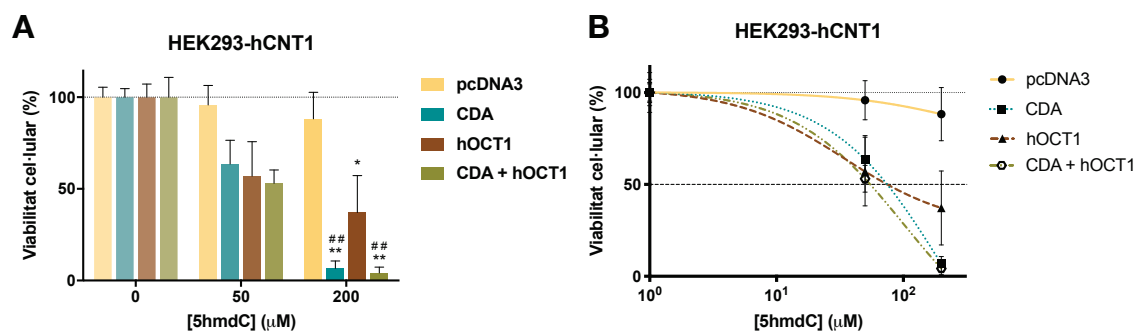


Figura 74. Efecte de CDA i/o hOCT1 sobre la viabilitat cel·lular en resposta a 5hmdC en presència de hCNT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5hmdC de cèl·lules HEK293-hCNT1 control (pcDNA3), cèl·lules HEK293-hCNT1 transfectades transitòriament amb CDA, cèl·lules HEK293-hCNT1 transfectades transitòriament amb hOCT1 i cèl·lules HEK293-hCNT1 cotransfectades transitòriament amb CDA i hOCT1. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 2. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 µM) i el seu control respectiu (0 µM), i mitjançant el símbol # per diferències respecte el control de transfecció (pcDNA3) corresponent a la mateixa concentració. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ i ## $P \leq 0,01$.

La presència del transportador de cations orgànics hOCT1 exerciria per si mateix una influència en l'efecte citotòxic de 5hmdC en cèl·lules amb el transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 sense necessitat d'activitat CDA. Curiosament, en presència d'hOCT1 a una concentració de 200 μM de 5hmdC s'obté una viabilitat cel·lular del voltant del 50%. Es tracta d'un efecte molt menor al que té lloc en presència de CDA, però que en tractar-se d'un efecte únicament atribuïble a hOCT1 resulta com a mínim curiós i sorprenent. La presència combinada de hOCT1 i CDA no confereix un efecte gaire major a 5hmdC en comparació amb el que té lloc únicament amb CDA. No obstant, en posar el focus a les corbes concentració-resposta, s'intueix una lleugera sensibilització per part d'hOCT1 també en presència d'activitat CDA. En aquest cas, els valors de IC_{50} obtinguts foren $205,9 \pm 2,6 \mu\text{M}$ en cèl·lules HEK293-hCNT1 amb CDA i $101,6 \pm 1,8 \mu\text{M}$ en cèl·lules HEK293-hCNT1 amb CDA i hOCT1 (**Figura 74**).

Es van realitzar assaigs de viabilitat cel·lular en cèl·lules HEK293-pcDNA5, HEK293-hCNT1, HEK293-hCNT2, HEK293-hCNT3 i HEK293-hOCT1 tractades amb 5fdC en presència de dipiridamol (inhibidor dels transportadors equilibratius de nucleòsids hENT1 i hENT2) per estudiar el pas d'aquest nucleòsid epigenètic a través dels transportadors concentratius de nucleòsids i del transportador hOCT1 eliminant el transport mitjançat per hENT1 com a variable en el sistema (**Figures 75–81**).

En presència de dipiridamol 10 μM l'efecte dependent de CDA de 5fdC és revertit totalment. Mentre que a concentracions de 5 i 10 μM de 5fdC en presència d'activitat CDA la mort cel·lular resultant és molt important i completa, respectivament, a les mateixes concentracions de 5fdC i en presència de CDA la viabilitat es manté totalment inalterada en bloquejar el transportador equilibratiu hENT1 amb dipiridamol 10 μM . Aquest resultat reafirmaria el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1 com el principal mecanisme de translocació responsable de l'accés de 5fdC al citoplasma. El valor de IC_{50} obtingut per 5fdC en cèl·lules HEK293-pcDNA5 en presència de CDA en aquest experiment fou $6,82 \pm 0,002 \mu\text{M}$ (**Figura 75**). A continuació, va forçar-se el sistema amb concentracions de 5fdC superiors a la més alta utilitzada fins el moment (10 μM) amb l'objectiu de determinar l'afinitat d'hENT1 per aquesta molècula a nivell de la capacitat de desplaçament del seu inhibidor específic dipiridamol a una concentració de 10 μM per part del propi nucleòsid 5fdC a concentracions més elevades (fins a 500 μM) (**Figura 76**).

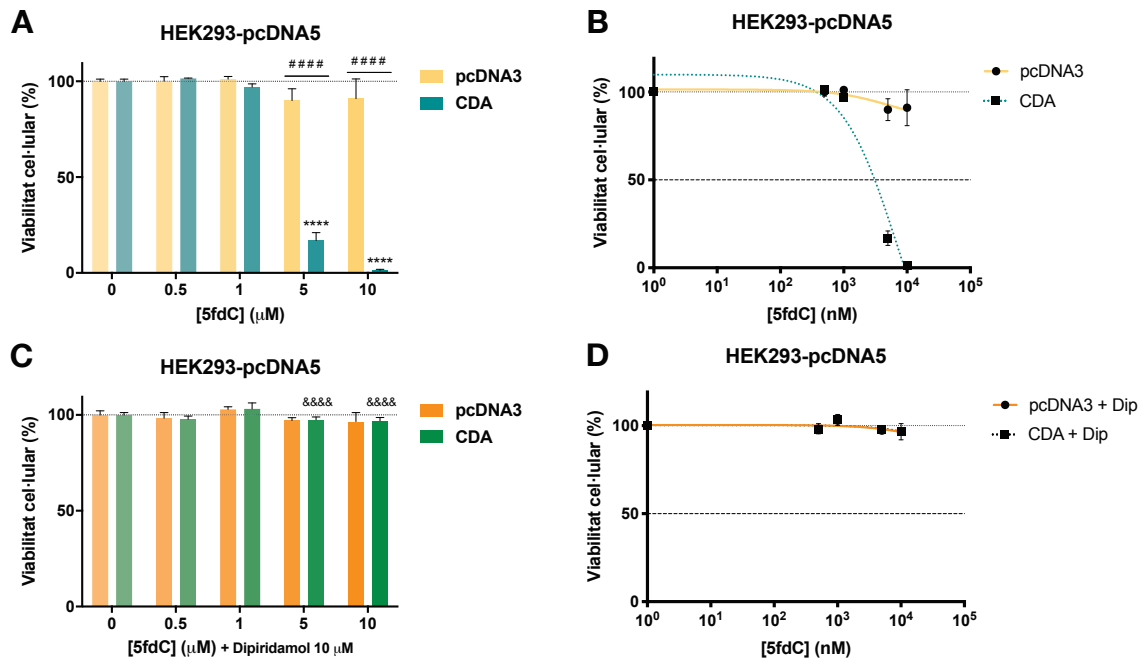


Figura 75. Captació de 5fdC per hENT1 amb i sense inhibidor. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5 i cèl·lules HEK293-pcDNA5 tractades amb dipiridamol 10 µM. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A** i **C** els percentatges venen representats en forma d’histograma. A les gràfiques **B** i **D** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L’anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 µM) i el seu control respectiu (0 µM); el símbol # per diferències degudes a l’activitat CDA; i el símbol & per diferències degudes a la inhibició de hENT1 amb dipiridamol 10 µM. La significació estadística ve expressada com **** $P \leq 0,0001$; #### $P \leq 0,0001$ i &&&& $P \leq 0,0001$.

A partir d’aquest experiment se’n deriven unes quantes consideracions rellevants sobre la interacció del nucleòsid 5fdC amb el transportador hENT1, així com sobre la seva especificitat d’interacció i la seva eficiència de translocació. A la vista d’aquestes dades, es podria concloure que la inhibició del transportador hENT1 per part de dipiridamol i la manera com impedeix el reconeixement i la translocació consegüent de 5fdC consistiria en un fenomen de naturalesa competitiva. A concentracions de 5fdC superiors a la de l’inhibidor (10 µM), l’efecte inhibitori de dipiridamol és revertit i curtcircuitat per part d’un efecte de desplaçament pel substrat dependent de la concentració. Així mateix, aquest efecte té lloc en menor mesura a una concentració de 5fdC de 50 µM, però arriba a ser totalment notori i evident a concentracions de 100 i 500 µM de 5fdC en què, fins i tot en presència de dipiridamol 10 µM, els valors de citotoxicitat obtinguts en presència d’activitat citidina desaminasa són del voltant d’un 75% i un 100% per les concentracions de 100 µM i 500 µM de 5fdC, respectivament. A més, resulta sorprenent comprovar com no només en presència d’activitat CDA, sinó també en absència d’aquesta (condició control, pcDNA3) a concentracions de 100 µM lleugerament i de 500 µM molt clarament, existeix un efecte d’inhibició del creixement cel·lular per part del nucleòsid 5fdC

que no pot ser atribuït a la seva conversió al seu derivat d'uridina 5fdU per part de l'enzim citidina desaminasa donada l'absència d'aquest. El valor de IC_{50} obtingut per 5fdC en presència de CDA i dipiridamol 10 μ M en aquesta última corba fou $93,39 \pm 1,84 \mu$ M (**Figura 76**).

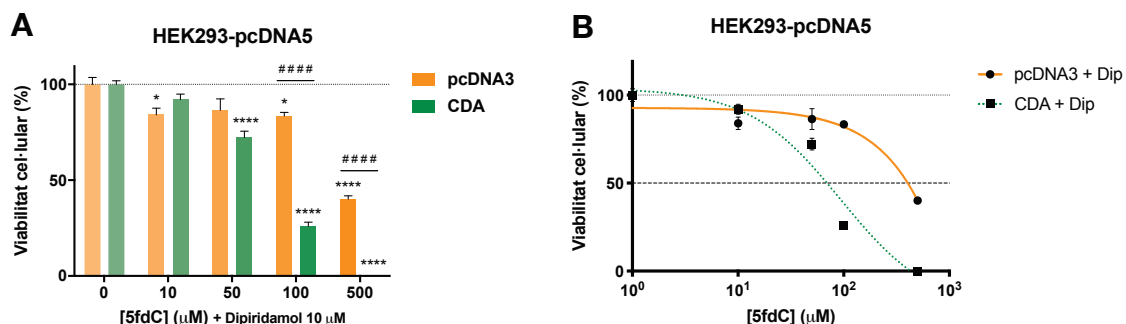


Figura 76. Captació de 5fdC amb bloqueig d'hENT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-pcDNA5 tractades amb dipiridamol 10 μ M. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μ M) i el seu control respectiu (0 μ M); i el símbol # per diferències degudes a l'activitat CDA. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; **** $P \leq 0,0001$ i #### $P \leq 0,0001$.

En inhibir el transportador hENT1 amb dipiridamol 10 μ M, s'observa que seguiria havent-hi translocació de 5fdC per part d'hCNT1 que es tradueix en una certa citotoxicitat observada a concentracions de 5fdC de 5 μ M i 10 μ M que no s'havia observat a les mateixes concentracions de nucleòsid en cèl·lules HEK293-pcDNA5 sense el transportador concentratiu hCNT1 en presència de dipiridamol. Per tant, en base a aquests resultats, el transport de 5fdC semblaria no ser exclusiu del transportador equilibratiu hENT1, sinó que també podria ser transportat per almenys un transportador concentratiu de nucleòsids, en aquest cas, hCNT1. En introduir concentracions de 5fdC superiors a 10 μ M (des de 50 μ M fins 500 μ M) mantenint el bloqueig de hENT1 amb dipiridamol 10 μ M, l'efecte d'hCNT1 en l'augment de la biodisponibilitat de 5fdC es fa especialment evident, obtenint-se viabilitats cel·lulars del 0% en tots els casos en els que hi ha presència d'activitat CDA. A més, igual que ja s'ha detectat en cèl·lules HEK293-pcDNA5, en tractar les cèl·lules HEK293-hCNT1 amb hENT1 bloquejat amb dipiridamol amb concentracions de 5fdC superiors a 10 μ M, s'observa un inesperat fenomen d'inhibició del creixement cel·lular i/o mort cel·lular causat pel propi nucleòsid 5fdC de forma independent de la seva conversió a 5fdU per part de l'enzim CDA. El valor de IC_{50} obtingut per 5fdC en l'escala de concentracions entre 10 μ M i 500 μ M en cèl·lules HEK293-hCNT1 tractades amb dipiridamol 10 μ M i sense activitat CDA fou $93,24 \pm 1,23 \mu$ M (**Figura 77**).

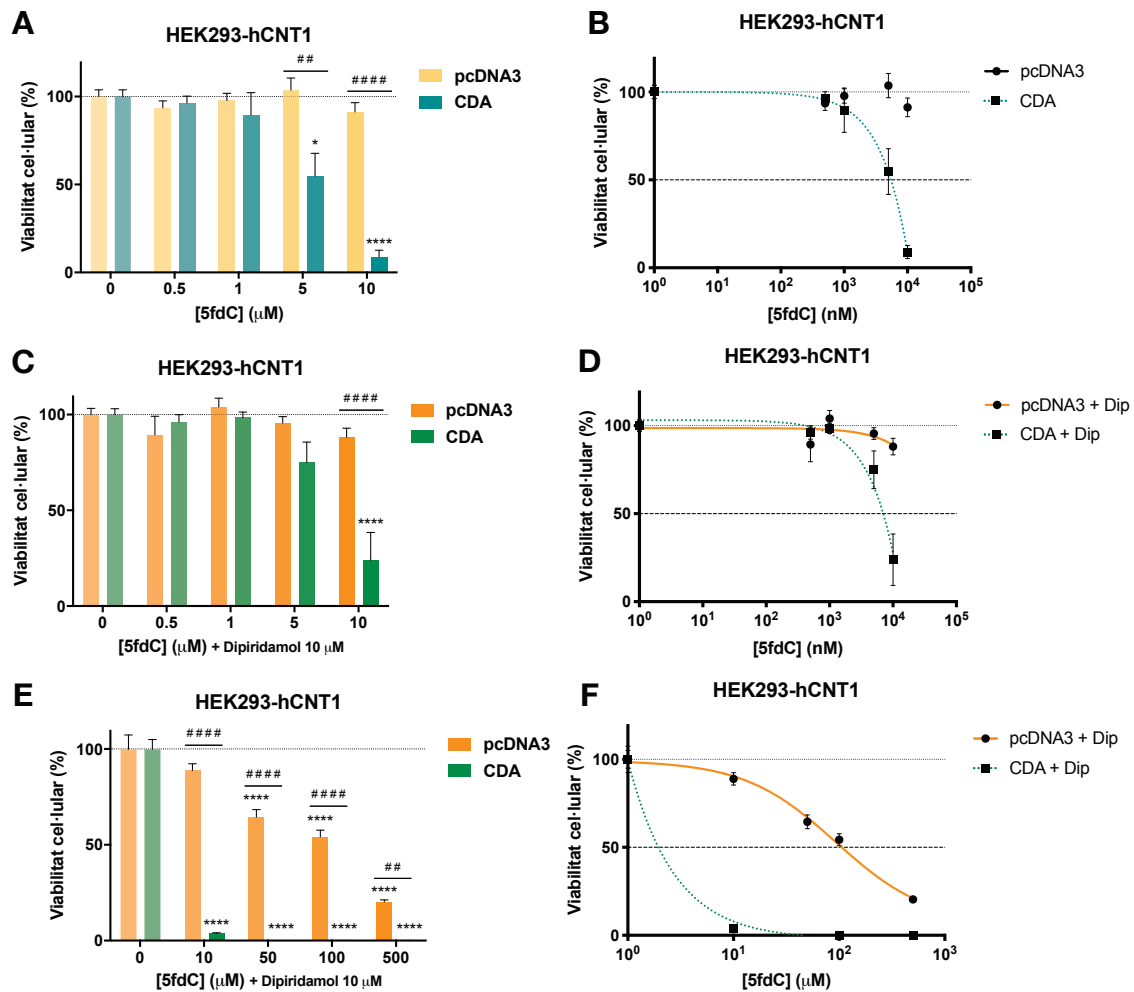


Figura 77. Captació de 5fdC a través d'hCNT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-hCNT1 i cèl·lules HEK293-hCNT1 tractades amb dipiridamol 10 μM. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van portar a terme en quintuplicats. Els experiments es van realitzar n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM); i el símbol # per diferències degudes a l'activitat CDA. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$ i ##### $P \leq 0,0001$.

Contràriament al que podria suposar-se en un inici, donat que hCNT2 no té capacitat de reconeixement ni de translocació de nucleòsids de citidina, com és el cas de 5fdC, sembla ser que, excepcionalment, hCNT2 sí tindria capacitat tant d'interaccionar amb el nucleòsid epigenètic 5fdC com de transportar-lo. En absència de l'activitat transportadora d'hCNT1, a una concentració de 10 μM de 5fdC s'observa aproximadament un 25% de reducció de la viabilitat cel·lular que no té lloc a la mateixa concentració i en les mateixes condicions en cèl·lules HEK293-pcDNA5 sense hCNT2. Per tant, encara que es tracti d'un percentatge d'inhibició petit, seria realment significatiu que el transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2 sigui capaç d'internalitzar el nucleòsid 5fdC per ell mateix i que sigui responsable d'una disminució del creixement cel·lular de fins una

quarta part a una concentració de nucleòsid de 10 μM estant el seu mecanisme de translocació principal, hENT1, sense activitat mitjançant la seva inhibició amb dipiridamol. Més enllà de 10 μM , la contribució d'hCNT2 a la biodisponibilitat i als nivells intracel·lulars de 5fdC s'observa clarament sobretot a les concentracions de 50 μM i 100 μM en comparació amb les mateixes dades obtingudes en cèl·lules HEK293-pcDNA5. Mentre que en aplicar concentracions de 5fdC de 50 μM i 100 μM en cèl·lules amb hCNT2 la viabilitat cel·lular obtinguda en presència d'activitat CDA i amb hENT1 bloquejat amb dipiridamol 10 μM és del 0%, en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb activitat CDA i bloqueig d'hENT1 les viabilitats cel·lulars obtingudes són aproximadament del 75% i el 25% per les concentracions de 5fdC de 50 μM i 100 μM , respectivament. Aquesta diferència probablement sigui atribuïble a l'activitat d'hCNT2. Els valors de IC_{50} obtinguts per 5fdC en cèl·lules HEK293-hCNT2 foren $6,98 \pm 1,68 \mu\text{M}$ amb CDA i sense dipiridamol; $92,04 \pm 1,41 \mu\text{M}$ amb dipiridamol 10 μM i sense CDA; i $11,98 \pm 1,31 \mu\text{M}$ amb dipiridamol 10 μM i amb CDA (**Figura 78**).

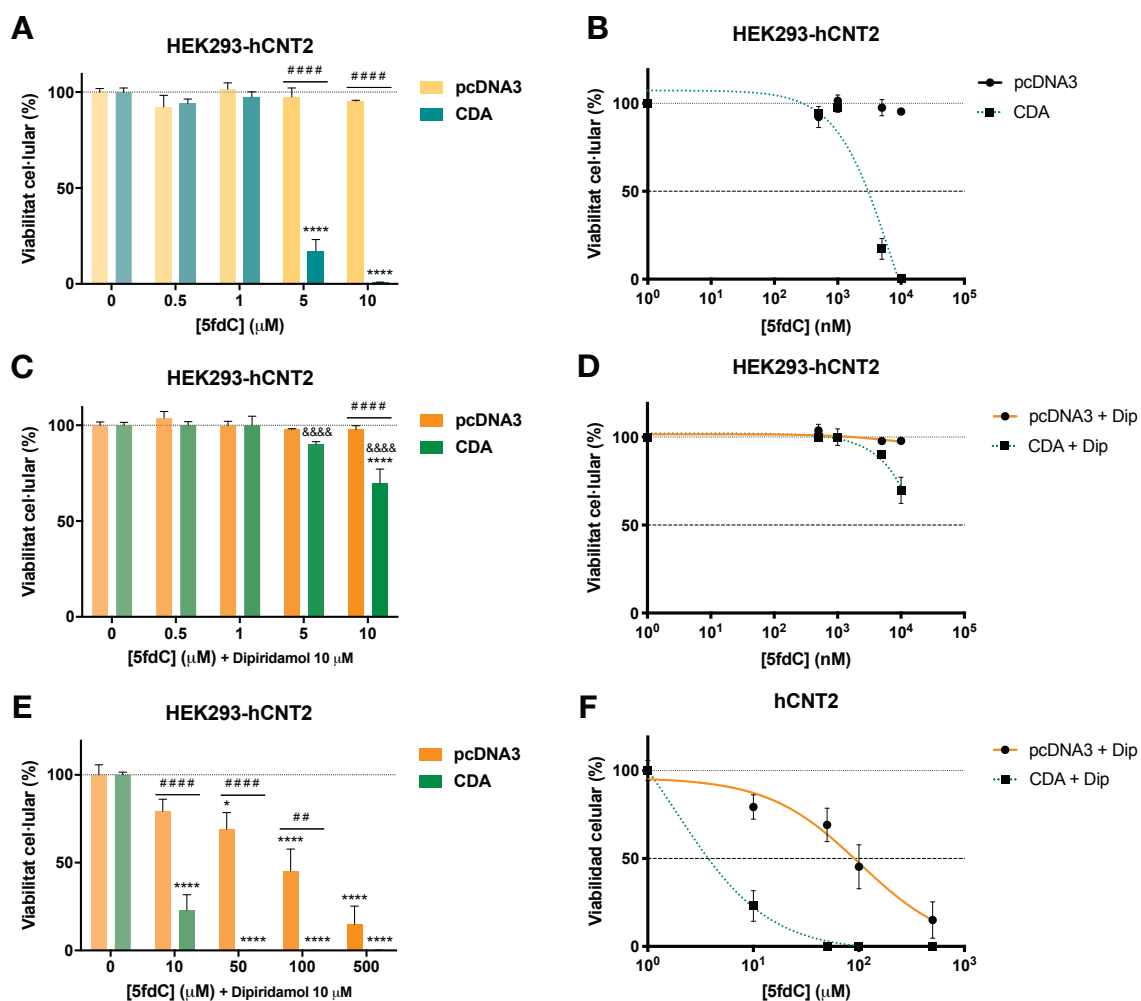


Figura 78. Captació de 5fdC a través d'hCNT2. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-hCNT2 i cèl·lules HEK293-pcDNA5 tractades amb dipiridamol 10 μM . Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala

logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM); el símbol # per diferències degudes a l'activitat CDA; i el símbol & per diferències degudes al bloqueig de hENT1 amb dipiridamol 10 μM . La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$; #### $P \leq 0,0001$ i &&&& $P \leq 0,0001$.

Al contrari del que s'observa amb els transportadors concentratius hCNT1 i hCNT2, el transportador concentratiu de nucleòsids d'ampli espectre hCNT3 no semblaria mostrar indicis de participar activament en la translocació del nucleòsid epigenètic 5fdC. Aquest fet es mostra de forma clara en els resultats obtinguts en cèl·lules HEK293–hCNT3 amb un bloqueig d'hENT1 amb dipiridamol. A més, no tan sols no semblaria participar en la internalització de 5fdC, sinó que a més hCNT3 semblaria dificultar el transport del nucleòsid a través d'hENT1 revertint el seu efecte citocida. Aquest fet es pot observar amb molta claredat en els valors de viabilitat cel·lular en presència de CDA a concentracions de 5fdC de 5 i 10 μM en cèl·lules HEK293–hCNT3 en què hENT1 sí que és funcional. En aquests casos, les viabilitats cel·lulars obtingudes són molt més elevades que les obtingudes a les mateixes concentracions en cèl·lules HEK293–pcDNA5 amb únicament nivells basals del transportador hENT1 (**Figura 79**).

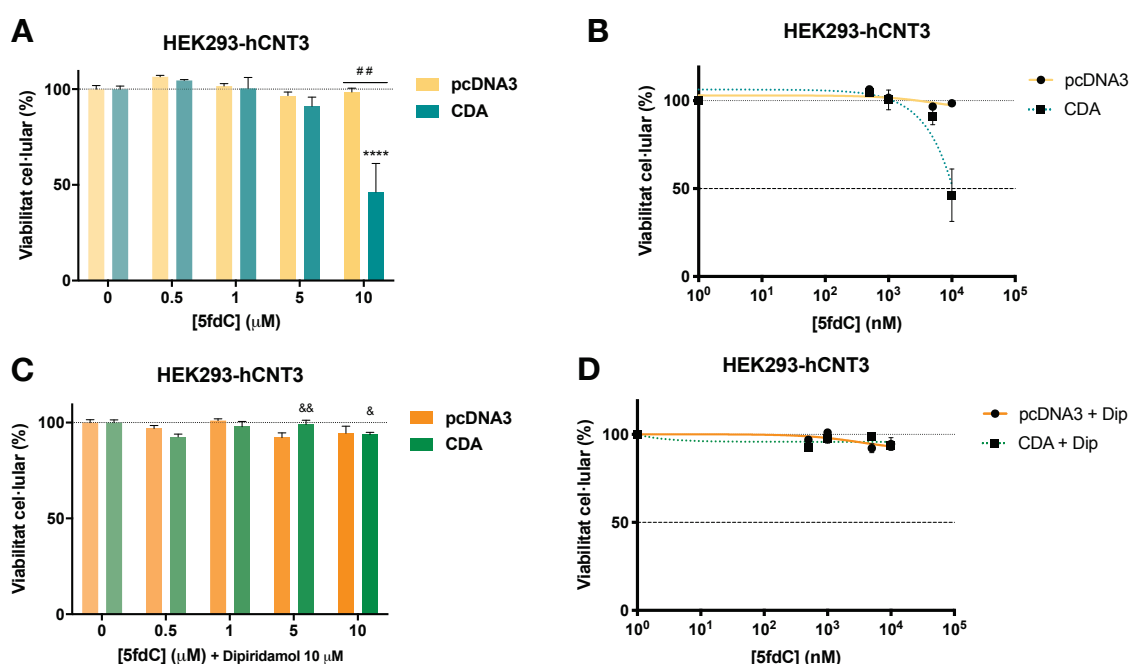


Figura 79. Captació de 5fdC (0,5 – 10 μM) a través d'hCNT3. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-hCNT3 i cèl·lules HEK293-hCNT3 tractades amb dipiridamol 10 μM . Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A** i **C** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B** i **D** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre

cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM); el símbol # per diferències degudes a l'activitat CDA; i el símbol & per diferències degudes al bloqueig de hENT1 amb dipiridamol 10 μM . La significació estadística ve expressada com & $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$; && $P \leq 0,01$ y **** $P \leq 0,0001$.

A concentracions de 5fdC superiors a 10 μM i amb ambdós transportadors hCNT3 i hENT1 presents en el sistema, la citotoxicitat per part de 5fdC en presència d'activitat CDA és completa. Aquest fet podria portar a pensar que hCNT3 efectivament uniria i segrestaria 5fdC sense arribar a transportar-lo i que, en incrementar el rang de concentracions provades, l'efecte dependent d'hENT1 senzillament seria desplaçat.

Els valors de IC_{50} obtinguts en cèl·lules HEK293-hCNT3 foren $39,64 \pm 1,45 \mu\text{M}$ sense CDA; $36,71 \pm 1,26 \mu\text{M}$ amb CDA; $254,1 \pm 0,002 \mu\text{M}$ sense CDA i amb dipiridamol 10 μM ; i $5,03 \pm 0,001 \mu\text{M}$ amb CDA i amb dipiridamol 10 μM (Figura 80).

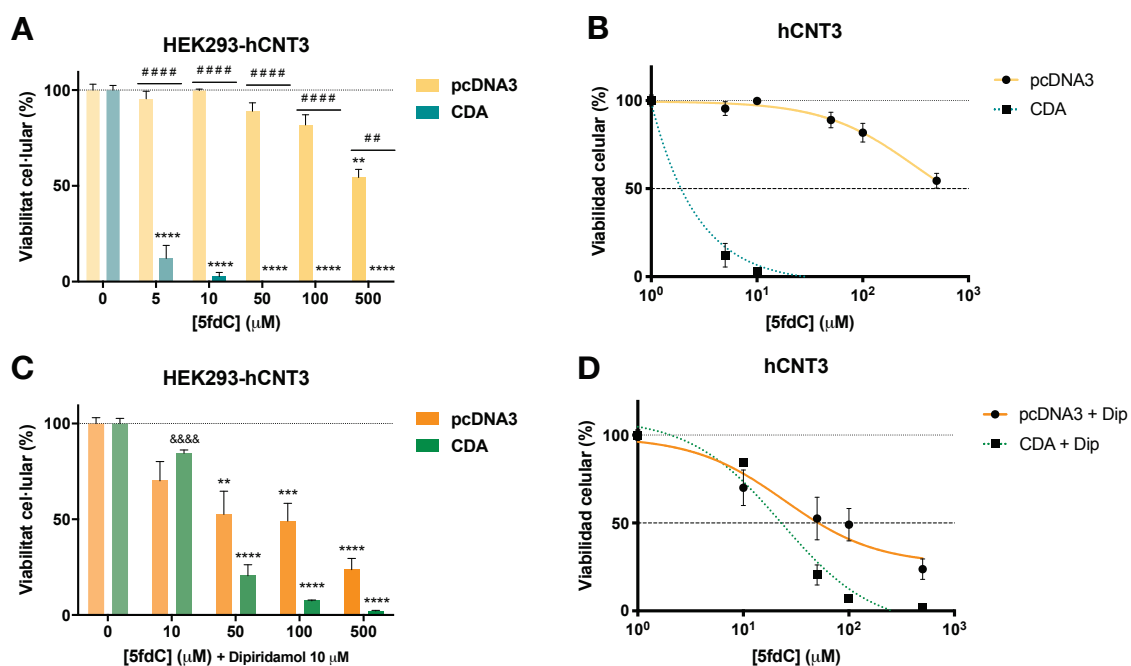


Figura 80. Captació de 5fdC (10 – 500 μM) a través d'hCNT3. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-hCNT3 i cèl·lules HEK293-hCNT3 tractades amb dipiridamol 10 μM . Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques A i C els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques B i D les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de nucleòsid epigenètic (10 – 500 μM) i el seu control respectiu (0 μM); el símbol # per diferències degudes a l'activitat CDA; i el símbol & per diferències degudes al bloqueig de hENT1 amb dipiridamol 10 μM . La significació estadística ve expressada com ** $P \leq 0,01$; ## $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$; ##### $P \leq 0,0001$ i &&& $P \leq 0,0001$.

A primera vista, no semblaria que el transportador de cations orgànics hOCT1 participi activament en la translocació de 5fdC a través de la membrana plasmàtica. Els valors de IC₅₀ que es van obtenir per 5fdC en cèl·lules HEK293-hOCT1 foren 4,94 ± 1,70 μM amb CDA i sense dipiridamol 10 μM; i 24,62 ± 1,64 μM amb CDA i amb dipiridamol 10 μM (**Figura 81**).

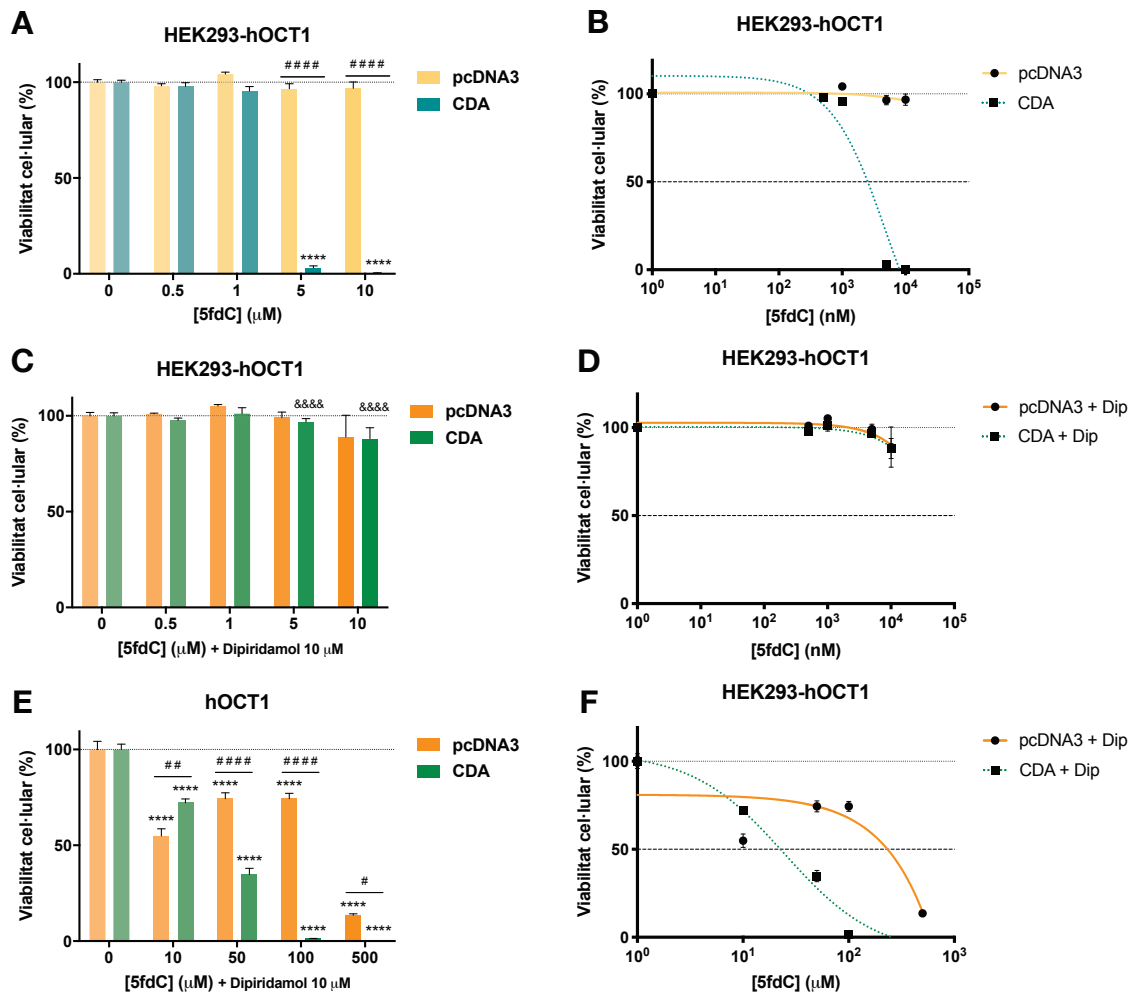


Figura 81. Captació de 5fdC a través d'hOCT1. Viabilitat cel·lular després del tractament amb 5fdC de cèl·lules HEK293-hOCT1 i cèl·lules HEK293-hOCT1 tractades amb dipiridamol 10 μM. Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A les gràfiques **A**, **C** i **E** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A les gràfiques **B**, **D** i **F** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol # per diferències degudes a l'activitat CDA; i el símbol & per diferències degudes al bloqueig de hENT1 amb dipiridamol 10 μM. La significació estadística ve expressada com # $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$; ##### $P \leq 0,0001$ i &&&& $P \leq 0,0001$.

2.6. Anàlisi microscòpica de la confluència i la morfologia cel·lulars en resposta al tractament amb els nucleòsids epigenètics 5hmdC i 5fdC en funció dels transportadors de nucleòsids

Tal i com ja s'ha vist prèviament, la combinació formada per 5hmdC i hCNT1 probablement sigui una de les que s'estableixen entre els nucleòsids epigenètics i els seus transportadors amb un nivell més alt d'especificitat mútua de les estudiades al llarg d'aquest treball. Per aquesta raó, es van obtenir imatges a través de microscòpia òptica de cèl·lules HEK293 amb expressió estable del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 (HEK293-hCNT1; **Figures 84–85**) i el seu control (HEK293-pcDNA5; **Figures 82–83**) amb i sense expressió transitòria de CDA en resposta al tractament amb 5hmdC a la concentració més alta provada en aquest treball (500 μ M). Les imatges mostrades en tots els casos corresponen a les cèl·lules o bé just abans del tractament (0 hores; **Figures 82 i 84**), un dia després de ser transfectades transitòriament amb el gen *CDA* o amb el vector buit pcDNA3 com a control negatiu; o bé al cap de 24 hores (**Figures 83 i 85**) de ser tractades amb 5hmdC, és a dir, al cap de 48 hores després de ser transfectades (**Figures 82–85**).

En cèl·lules HEK293-pcDNA5 es poden observar una morfologia i uns nivells de confluència similars tant en absència com en presència de CDA just abans d'exposar-les al tractament amb 5hmdC (**Figura 82**).

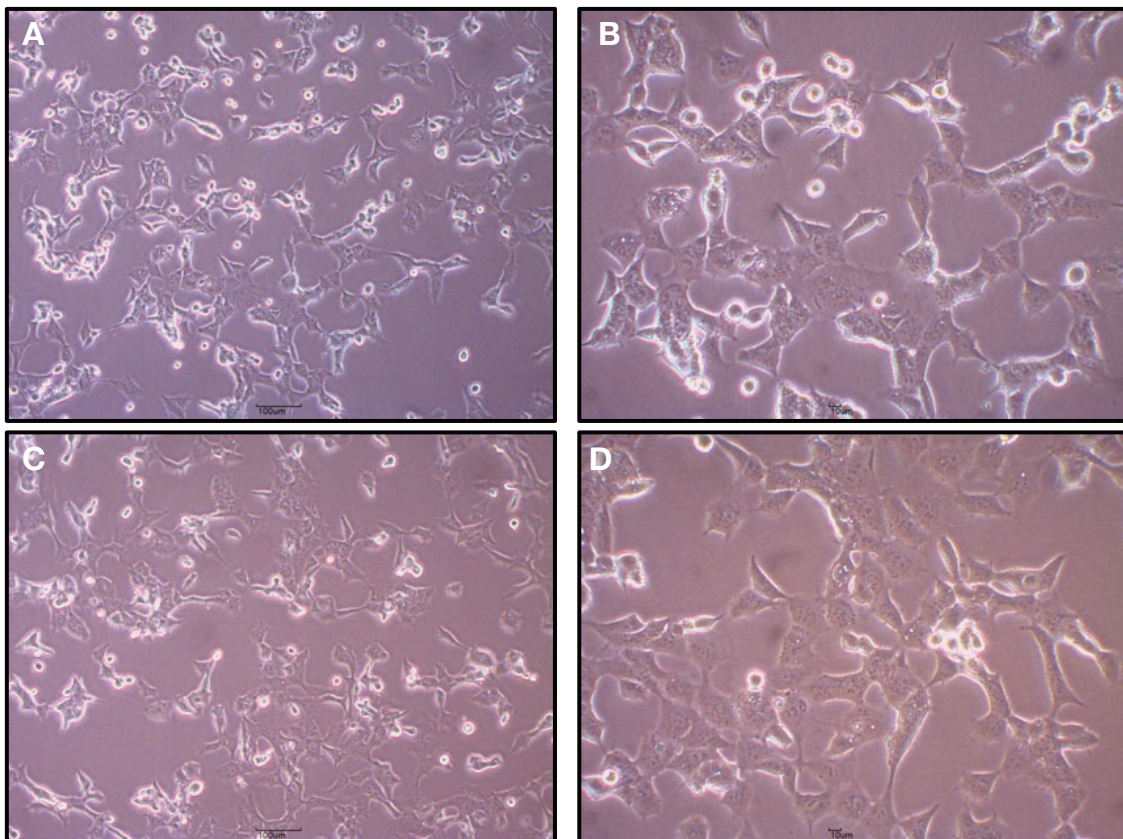


Figura 82. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 (I). Cèl·lules HEK293-pcDNA5 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre al cap de 24 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 48 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10× (panells **A** i **C**) i 20× (panells **B** i **D**).

Vint-i-quatre hores més tard, les cèl·lules HEK293-pcDNA5 tant les mancades de CDA com les que en posseeixen, mostren un grau de creixement cel·lular equiparable respecte 24 hores abans (**Figura 82**) i no presenten diferències notòries degudes a la presència de l'activitat CDA i, per tant, causades per la presència del nucleòsid epigenètic 5hmdC. Això sembla corroborar que l'activitat citidina desaminasa no només és necessària per a l'acció citotòxica de 5hmdC, sinó que a més no seria suficient i es requeriria un actor addicional en el mecanisme d'acció de 5hmdC que bé podria ser hCNT1, tal i com s'ha proposat amb anterioritat en aquest treball (**Figura 83**).

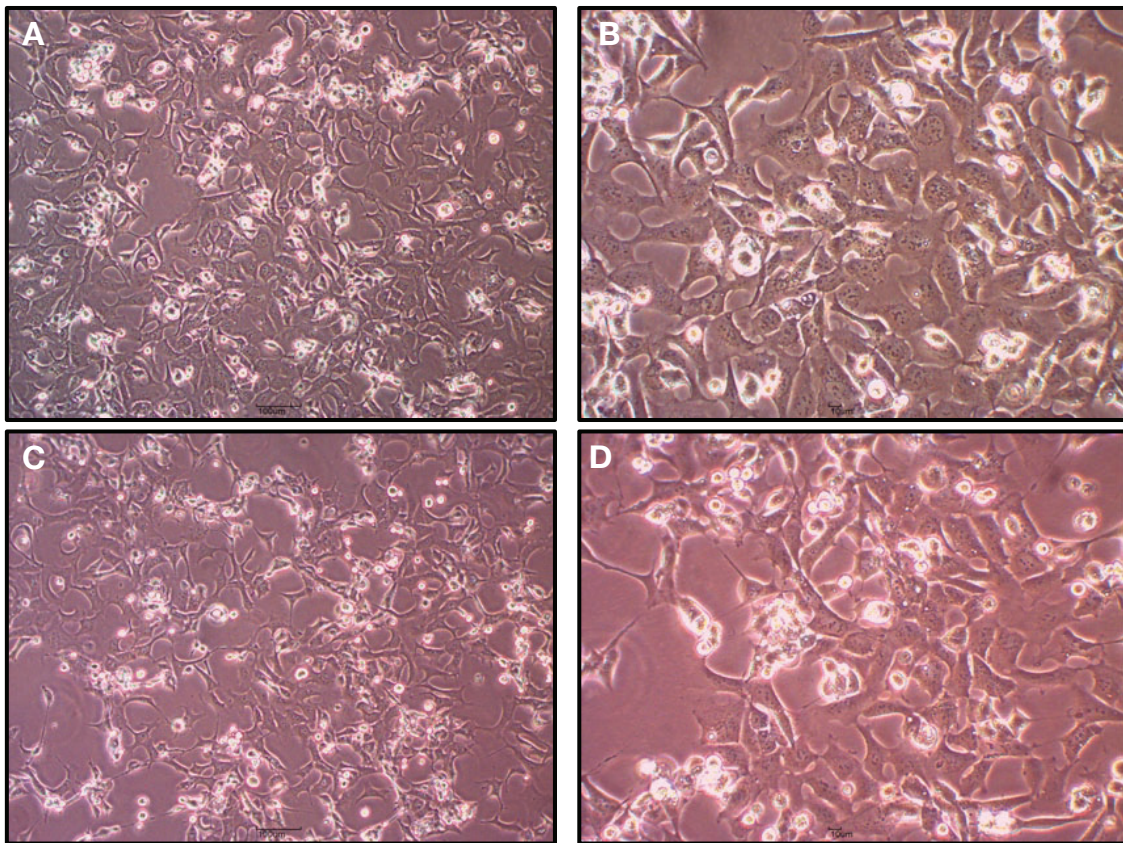


Figura 83. Efecte de la captació de 5hmdC per hCNT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-pcDNA5 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5hmdC 500 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica de amb objectius de diferents augments, concretament 10× (panells **A** i **C**) i 20× (panells **B** i **D**).

En cèl·lules HEK293-hCNT1 no s'observen diferències de proliferació i/o mort cel·lular ni pel que fa a la morfologia de les cèl·lules; per un costat, degudes a la presència de l'activitat CDA, ni per un altre costat, degudes a la presència

del transportador hCNT1, en tenir aquestes imatges (**Figura 84**) una gran semblança amb les imatges respectives en cèl·lules HEK293-pcDNA5 (**Figura 82**). Per tant, abans del tractament amb 5hmdC a una concentració de 500 μ M, no hi ha diferències observables a les cèl·lules degudes a la presència d'activitat enzimàtica CDA ni causades per la presència del transportador hCNT1; de tal manera que les diferències que poguessin haver-hi en tractar les cèl·lules amb 5hmdC, en efecte, serien atribuïbles al factor diferencial que exerciria hCNT1 en el mecanisme d'acció de 5hmdC (**Figura 84**).

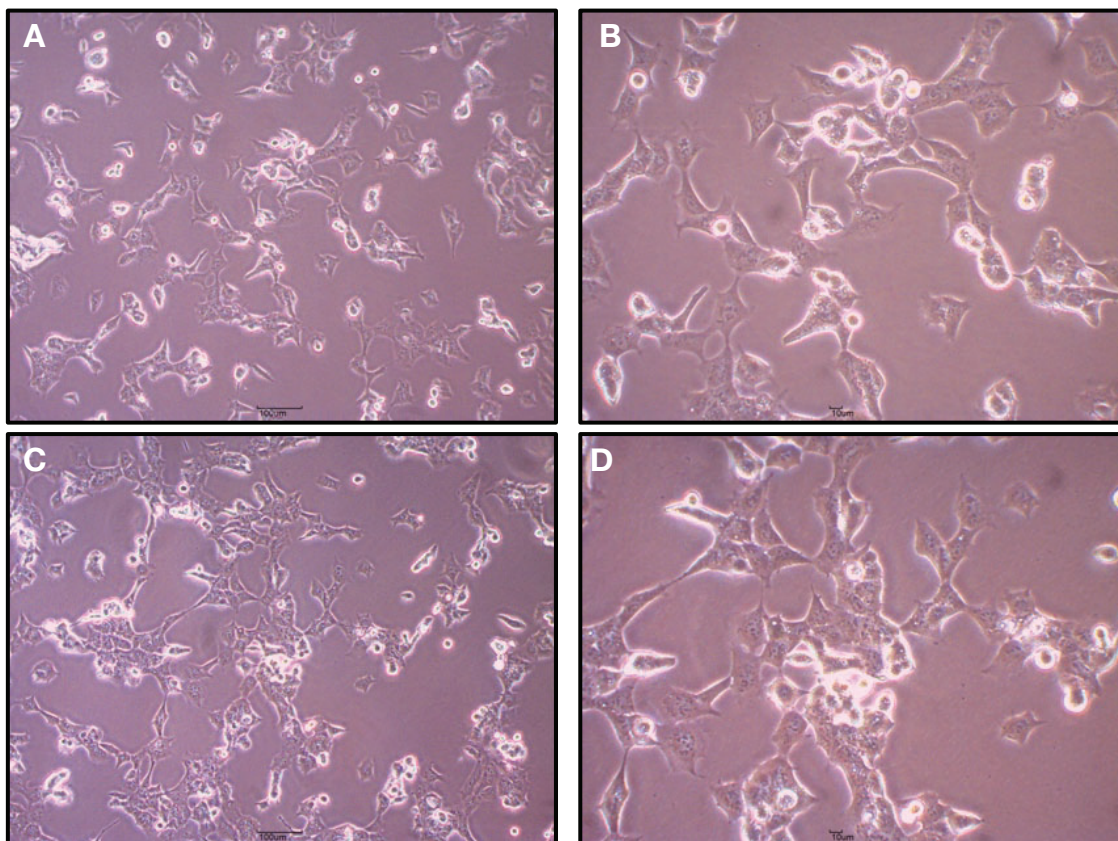


Figura 84. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hCNT1 (I). Cèl·lules HEK293-hCNT1 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre al cap de 24 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 48 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

Efectivament, tal i com es podia anticipar, existeix una diferència clara tant a nivell de confluència com a nivell de morfologia cel·lular entre les cèl·lules HEK293-hCNT1 que tenen activitat CDA i porten 24 hores exposades a 5hmdC 500 μ M (**Figura 85**, imatges **C** i **D**) i tant les cèl·lules en les mateixes condicions excepte per l'activitat CDA (**Figura 85**, imatges **A** i **B**) com les cèl·lules igualment tractades i amb activitat CDA però mancades del transportador hCNT1 (**Figura 83**, imatges **C** i **D**).

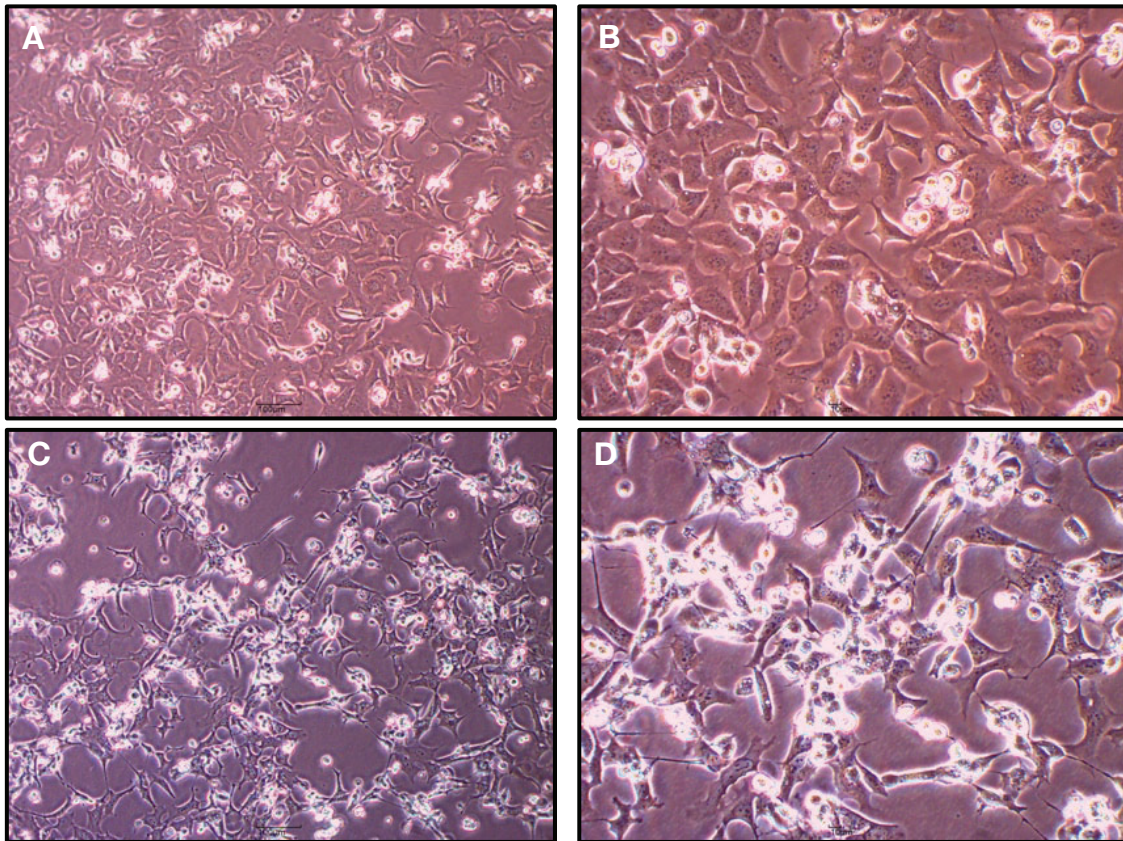


Figura 85. Efecte de la captació de 5hmdC per hCNT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hCNT1 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5hmdC 500 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen *CDA* contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augmentos, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

Apart de la parella formada per 5hmdC i hCNT1, l'altra combinació que destaca en aquest treball en quant al seu elevat nivell d'especificitat és la formada pel nucleòsid epigenètic 5fdC i el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1. Per això van obtenir-se imatges de cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb nivells basals d'expressió d'hENT1 amb i sense activitat citidina desaminasa (**Figures 86–88**). Aquestes imatges corresponen tant al moment previ al tractament amb 5fdC 10 μ M (**Figura 86**) com al cap de 24 hores d'exposició al nucleòsid epigenètic (**Figura 87**). També es van obtenir imatges de cèl·lules HEK293-pcDNA5 no només tractades igualment amb 5fdC 10 μ M, sinó a més amb dipiridamol 10 μ M per bloquejar el pas a través d'hENT1 per confirmar l'efecte d'aquest transportador en la biodisponibilitat intracel·lular del nucleòsid epigenètic (**Figura 88**).

Igual que ja s'ha mostrat al subapartat anterior (**Figura 82**), no s'observen diferències en cèl·lules HEK293-pcDNA5 degudes a la transfecció transitòria de citidina desaminasa abans de sotmetre-les a cap tipus de tractament (**Figura 86**).

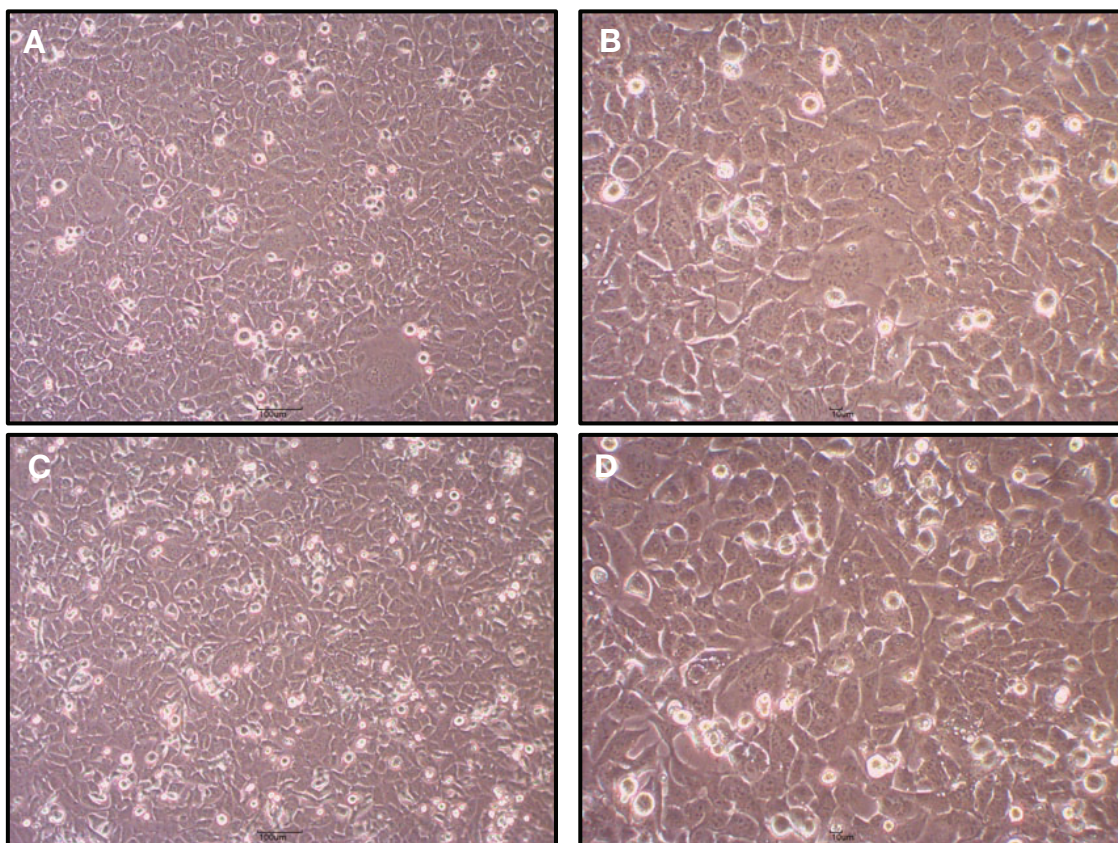


Figura 86. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 (II). Cèl·lules HEK293-pcDNA5 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre al cap de 24 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 48 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10× (panells **A** i **C**) i 20× (panells **B** i **D**).

Després de 24 hores d'exposició a una concentració 10 μM de 5fdC, que és una concentració que s'ha mostrat farmacològicament efectiva en quant a l'efecte citocida de 5fdC en presència de CDA es refereix, encara que no s'observa un efecte de mort cel·lular molt intens en presència de CDA (**Figura 87**, imatges **C** i **D**), també és cert que la confluència cel·lular en presència de CDA i 5fdC 10 μM és, tot i que lleugerament, sensiblement menor que en absència de CDA. A més, la proporció de cèl·lules desadherides amb una morfologia amb apariència apoptòtica és també major en cèl·lules amb activitat citidina desaminasa. Aquestes observacions són congruents amb l'efecte citotòxic observat amb 5fdC en presència d'ambdues activitats CDA i hENT1. La raó que pot explicar la diferència del grau de mortalitat cel·lular en resposta a 5fdC a una concentració 10 μM és el temps d'exposició al nucleòsid epigenètic. La letalitat observada al llarg d'aquest treball per a 5fdC a 10 μM correspon a un temps d'exposició al tractament de 72 hores que és el temps emprat en els assaigs de viabilitat cel·lular. En canvi, en aquest cas el temps d'exposició és només de 24 hores, fet que pot explicar aquesta diferència que, *a priori*, podria resultar inesperada (**Figura 87**).

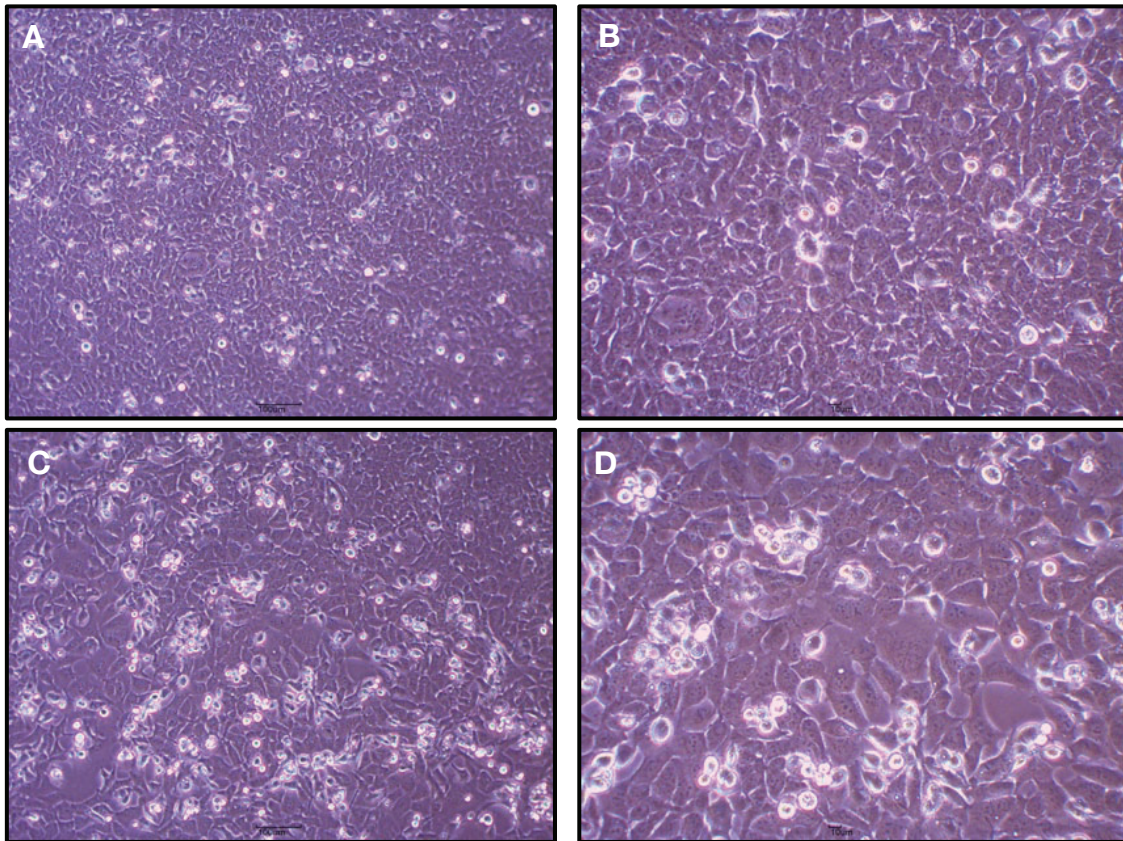


Figura 87. Efecte de la captació de 5fdC per hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-pcDNA5 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augmentos, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

Amb la finalitat de confirmar si hENT1 és realment responsable de l'efecte farmacològic de 5fdC a nivell de l'increment de la seva biodisponibilitat intracel·lular, de la mateixa manera que es va fer amb els experiments de viabilitat cel·lular, les cèl·lules foren tractades, a més d'amb el propi nucleòsid epigenètic, amb dipiridamol 10 μ M per bloquejar el pas de nucleòsid a través de hENT1 (**Figures 88, 91, 94, 97 i 100**).

En cèl·lules HEK293-pcDNA5 l'aplicació de dipiridamol 10 μ M per inhibir el pas de molècules a través d'hENT1, en efecte, reverteix l'efecte citotòxic de 5fdC i les cèl·lules amb CDA i dipiridamol (**Figura 88**, imatges **C** i **D**) tot i estar exposades a 5fdC presenten un aspecte més aviat semblant a les cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb CDA abans del tractament (**Figura 85**, imatges **C** i **D**) que no pas a les mateixes cèl·lules després de 24 hores d'exposició a 5fdC 10 μ M i amb citidina desaminasa amb hENT1 plenament funcional (**Figura 86**, imatges **C** i **D**).

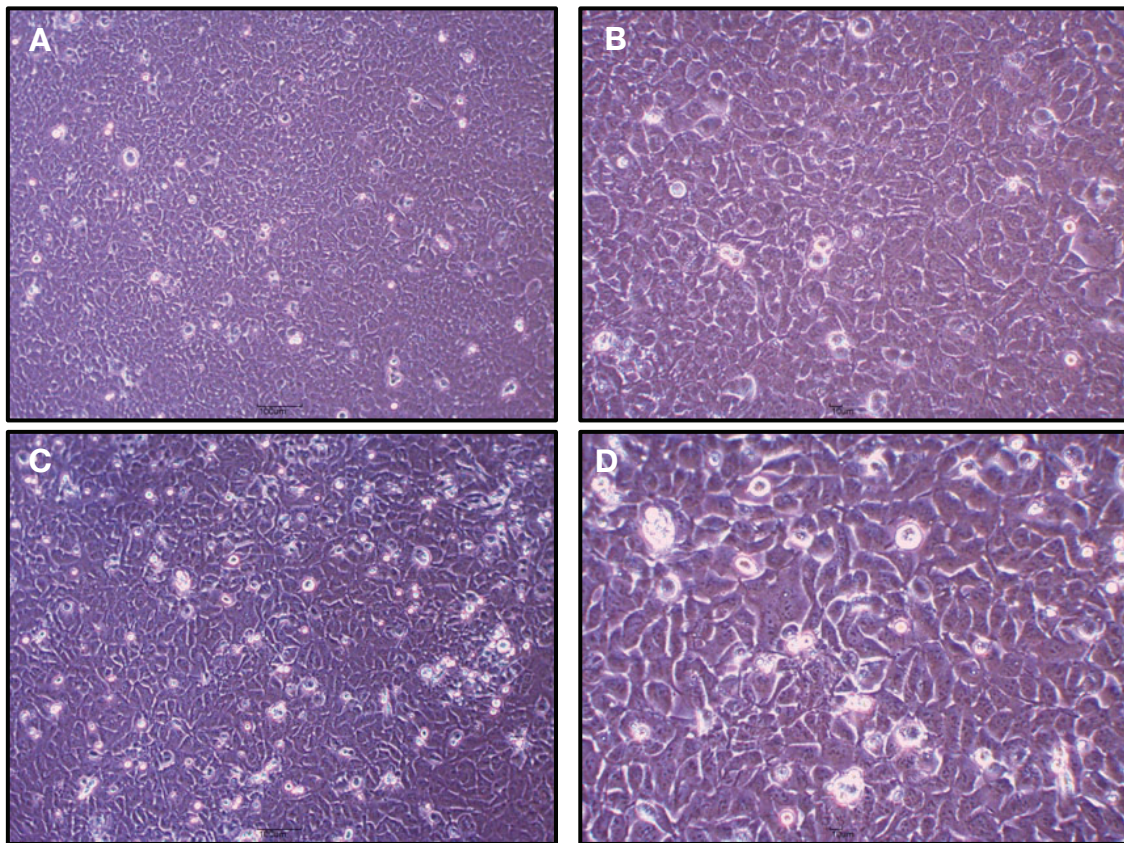


Figura 88. Efecte de 5fdC amb blocatge d'hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-pcDNA5 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M i dipiridamol 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

En cèl·lules HEK293-hCNT1, a diferència de cèl·lules HEK293-pcDNA5, s'observa un efecte causat per la transfecció amb citidina desaminasa previ a l'aplicació del tractament amb 5fdC. Mentre que les cèl·lules HEK293-hCNT1 transfectades amb el vector pcDNA3 control presenten un nivell de confluència pràcticament complet i una morfologia cel·lular dins la normalitat (**Figura 89**, imatges **A** i **B**), les cèl·lules HEK293-hCNT1 transfectades amb CDA al cap de 24 hores presenten una confluència notablement menor i una proporció molt major de cèl·lules amb morfologia esfèrica en relació a les cèl·lules totals. No obstant, també és veritat que tot i haver-hi una proporció de cèl·lules esfèriques molt per sobre respecte el control de transfecció no sembla ser degut a un efecte de mort cel·lular, sinó més aviat a un nombre més elevat de cèl·lules en fase de divisió cel·lular, donat que la població de cèl·lules que no estan en divisió i es mantenen adherides semblen trobar-se en bon estat (**Figura 89**, imatges **C** i **D**).

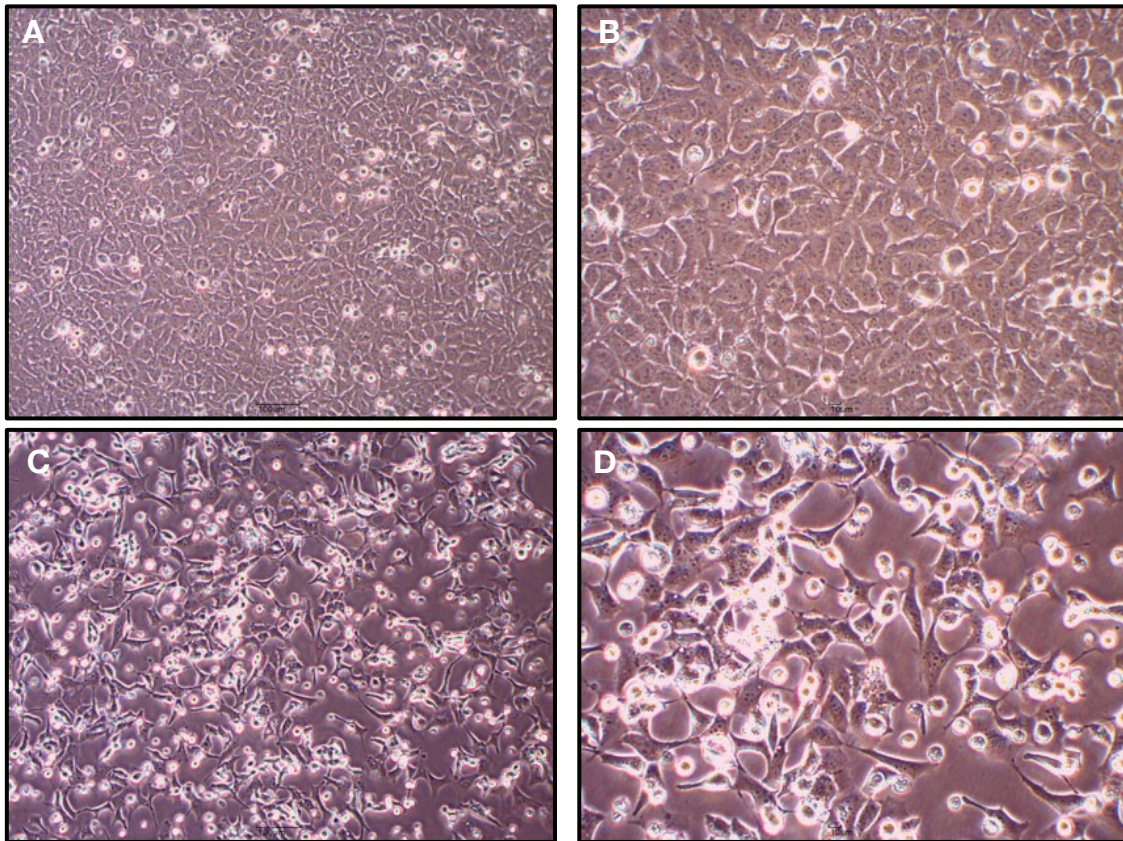


Figura 89. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i la morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hCNT1 (II). Cèl·lules HEK293-hCNT1 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre al cap de 24 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen *CDA* contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 48 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10x (panells **A** i **C**) i 20x (panells **B** i **D**).

Transcorregudes 24 hores després de tractar les cèl·lules HEK293-hCNT1 amb 5fdC a una concentració de 10 μ M s'observen les mateixes diferències entre les cèl·lules amb i sense citidina desaminasa ja observades abans de l'aplicació del tractament (**Figures 90** i **89**, respectivament). En cèl·lules HEK293-hCNT1 tractades amb 5fdC 10 μ M i amb activitat CDA, la confluència és notablement menor i la proporció de cèl·lules desadherides i amb morfologia esfèrica sensiblement major (**Figura 90**).

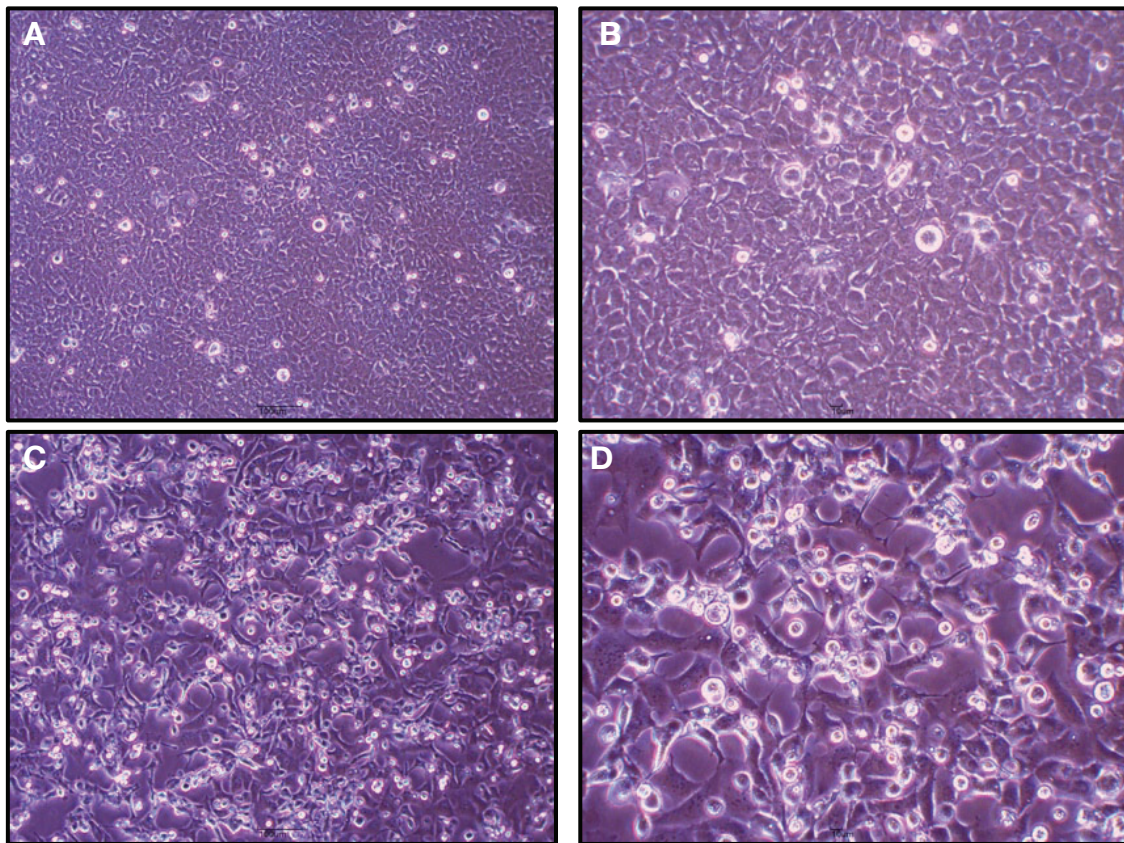


Figura 90. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT1 i hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hCNT1 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

En no poder observar diferències degudes al tractament amb 5fdC en cèl·lules HEK293-hCNT1 amb activitat CDA degut a l'efecte causat per aquesta darrera que podria estar emmascarant qualsevol afectació causada per 5fdC en cas que tingui lloc, es van tractar cèl·lules HEK293-hCNT1 amb dipiridamol 10 μ M a més del propi nucleòsid epigenètic. D'aquesta manera, en bloquejar el pas de substrats a través del transportador equilibratiu hENT1 en qualsevol dels sentits s'elimina almenys una de les variables experimentals d'un sistema en què resulta complex poder elucidar algun tipus de conclusió degut a la possible convivència de diversos mecanismes que podrien emmascarar-se mútuament. El nivell de confluència cel·lular observat en cèl·lules HEK293-hCNT1 amb CDA tractades amb 5fdC 10 μ M i amb hENT1 bloquejat amb dipiridamol és major que en cèl·lules HEK293-hCNT1 amb CDA amb hENT1 plenament funcional, tant en ser tractades amb 5fdC com abans del tractament. Més enllà de la confluència, pel que fa a morfologia cel·lular, la proporció de cèl·lules en divisió respecte el total és menor a l'observada en cèl·lules HEK293-hCNT1 amb CDA sense bloqueig d'hENT1. Això podria suggerir que qualsevol que siguin els mecanismes farmacològics que estiguin tenint lloc, fins i tot disposant del

transportador concentratiu hCNT1, la presència de hENT1 és, si no essencial, molt important per al mecanisme d'acció de 5fdC (**Figura 91**).

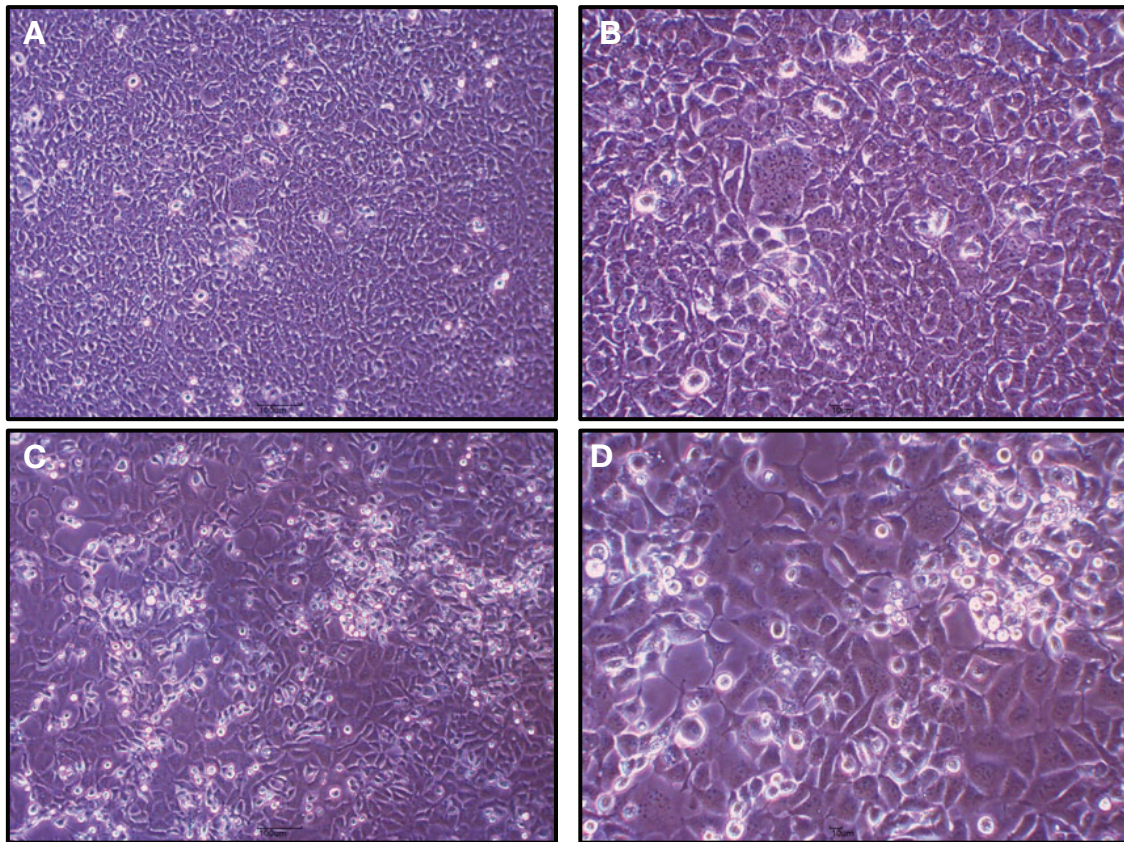


Figura 91. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hCNT1 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M i dipiridamol 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitoriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

De la mateixa manera que succeeix en cèl·lules HEK293-hCNT1 en el subapartat anterior, en cèl·lules HEK293-hCNT2 a temps zero del tractament amb nucleòsid epigenètic s'observa un efecte semblant degut a l'activitat citidina desaminasa sobre la confluència i la morfologia cel·lulars. En aquest cas, en cèl·lules HEK293-hCNT2, la menor confluència cel·lular i la major proporció de cèl·lules en divisió cel·lular també són únicament atribuïbles a l'existència de l'activitat enzimàtica CDA, eventualment potenciada o no per la presència del transportador hCNT2. Igual que també succeeix en presència d'hCNT1, les cèl·lules amb CDA i hCNT2 que es mantenen adherides i no es troben en divisió cel·lular tenen una morfologia normal i no presenten signes visibles d'estrès cel·lular o activació de mecanismes apoptòtics. En aquest cas, a diferència del subapartat anterior, la magnitud d'aquest efecte (**Figura 92**) és de molt menor envergadura que l'efecte citotòxic causat per 5fdC i mitjançat per CDA i, possiblement, per hCNT2 (**Figures 93–94**); i tot i estar present en el sistema, és el segon el que emmascara totalment el primer (**Figures 92–94**).

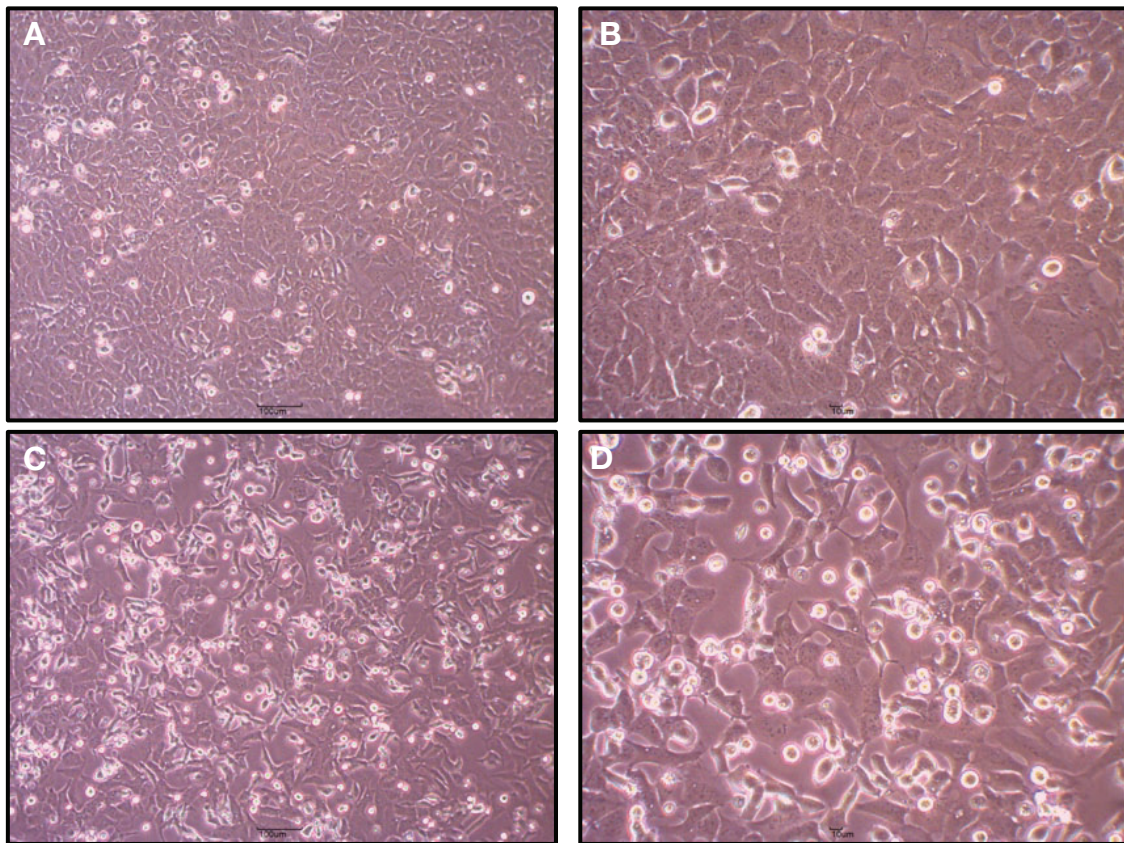


Figura 92. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i la morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hCNT2. Cèl·lules HEK293-hCNT2 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre al cap de 24 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 48 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10x (panells **A** i **C**) i 20x (panells **B** i **D**).

Efectivament, la presència conjunta de les tres activitats catalítiques, una enzimàtica (CDA) i dues transportadores (hENT1 i hCNT2) té un efecte devastador en cèl·lules HEK293 després de ser exposades durant 24 hores a una concentració 10 μ M de 5fdC. Tot i així, en base a aquestes imatges no és possible discernir les diferents contribucions del transportador equilibratiu hENT1 i del transportador concentratiu hCNT2 a la biodisponibilitat intracel·lular resultant, i per tant el seu efecte citocida, de 5fdC. No obstant, si es comparen aquestes imatges amb les imatges anàlogues en cèl·lules HEK293-pcDNA5 en què únicament existeix activitat transportadora d'hENT1 (**Figura 87**) és molt evident que la contribució d'hCNT2 a l'accessibilitat de 5fdC al citoplasma és molt important. En cèl·lules HEK293-hCNT2 amb activitat CDA i 24 hores d'exposició a 5fdC 10 μ M la mort cel·lular és pràcticament completa i les poques cèl·lules romanents estan completament desadherides i amb una morfologia d'aparença apoptòtica (**Figura 93**).

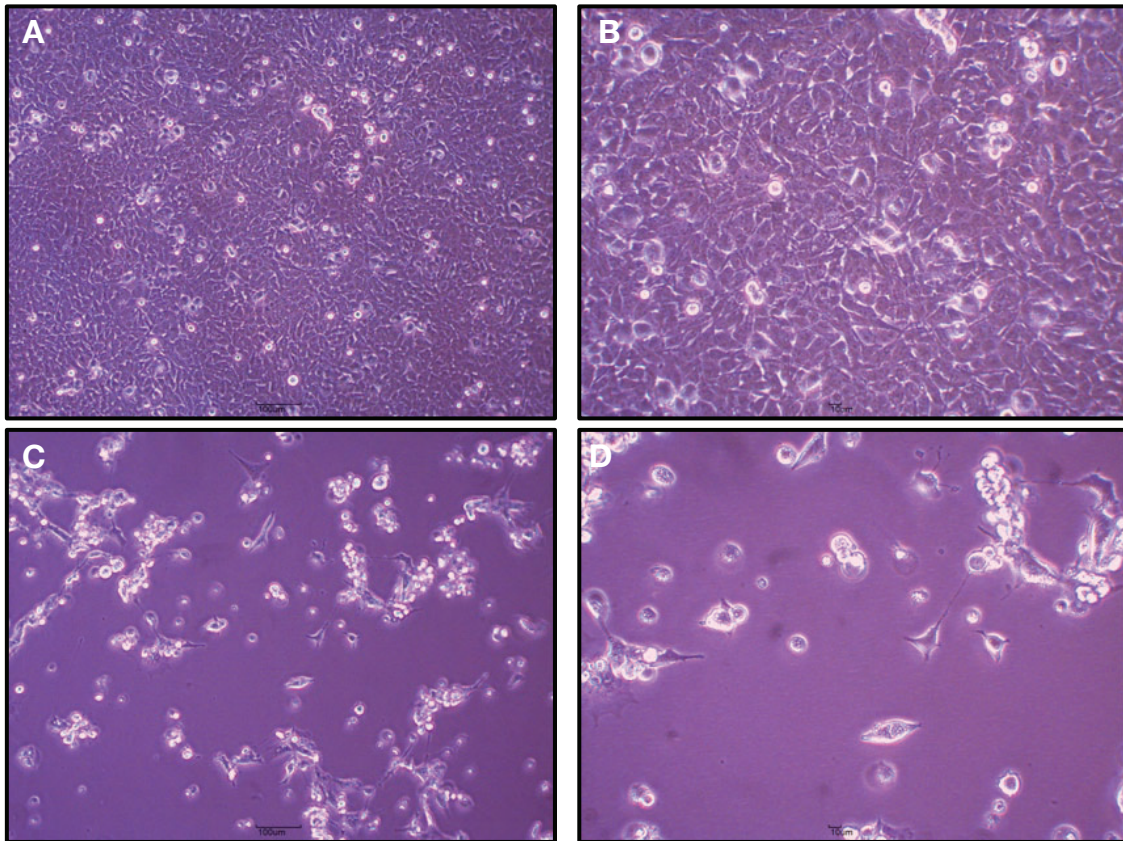


Figura 93. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT2 i hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hCNT2 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

Amb la finalitat d'esbrinar quin és l'ordre de magnitud de la contribució neta d'hCNT2 a la biodisponibilitat intracel·lular de 5fdC, com es va realitzar en multitud d'ocasions en aquest treball, es va bloquejar el pas de molècules a través d'hENT1 mitjançant dipiridamol 10 μ M. D'aquesta manera, és possible fer-se una idea, encara que sigui de tipus qualitatiu, de la contribució d'hCNT2 a l'efecte farmacològic de 5fdC en absència del seu transportador preferent, que com s'ha vingut postulant en aquest treball, sembla ser principalment hENT1. Clarament existeix una diferència molt evident entre cèl·lules HEK293-hCNT2 amb CDA i hENT1 inhibït amb dipiridamol tractades amb 5fdC 10 μ M (**Figura 94**, imatges **C** i **D**) i, tant cèl·lules HEK293-hCNT2 amb CDA i hENT1 funcional abans de ser tractades amb 5fdC per una banda (**Figura 92**, imatges **C** i **D**) com cèl·lules HEK293-hCNT2 amb CDA i hENT1 funcional un cop tractades amb 5fdC 10 μ M (**Figura 93**, imatges **C** i **D**). En aquest cas, la mortalitat cel·lular és molt important però no està tan a prop de la letalitat completa com en el cas anterior en què hENT1 contribueix a l'efecte total; però està realment molt per sobre degut exclusivament a la contribució d'hCNT2. *Grosso modo*, es podria dir que les poques cèl·lules que resten en aquest cas i que es mantenen vives i adherides correspondrien a la diferència deguda a la contribució d'hENT1 a

l'efecte total. En altres paraules, l'efecte restant observat, que representa la major part de l'efecte observat a la figura anterior, correspon a hCNT2. Per tant, sembla ser que 5fdC, en efecte, sí seria translocat per hCNT2 sense cap mena de dubte (**Figura 94**).

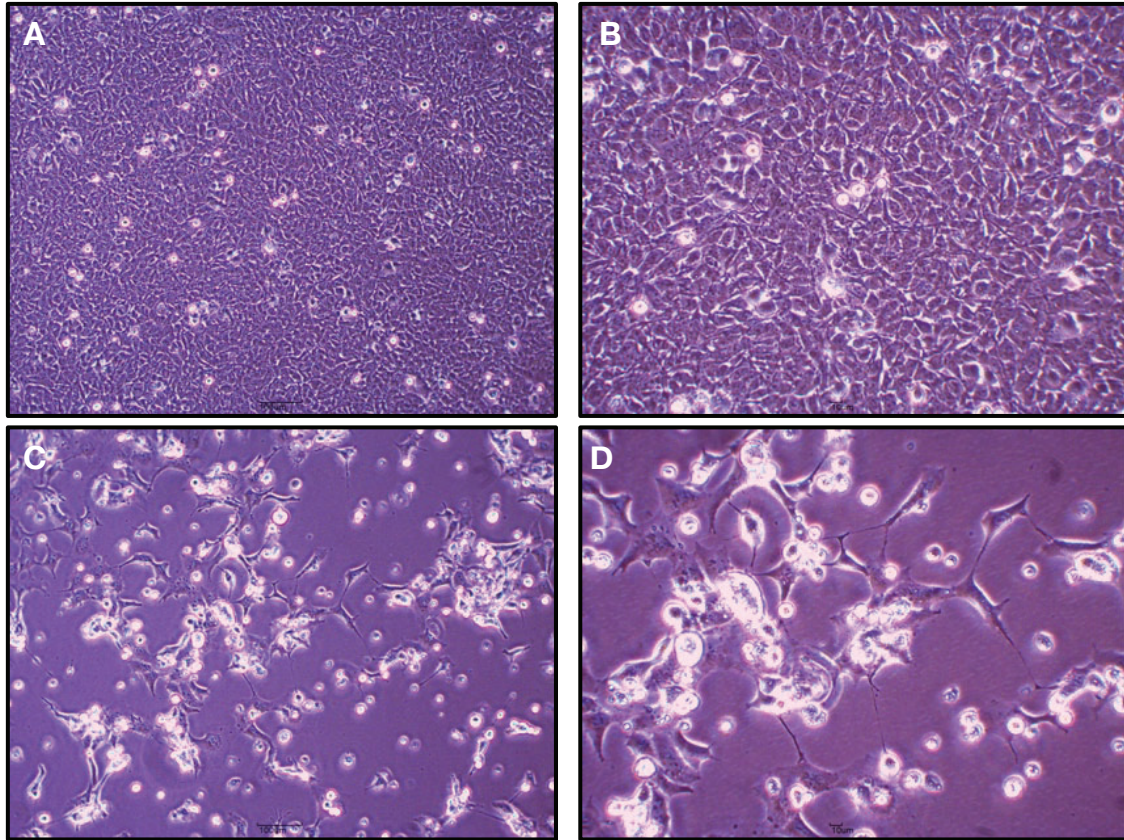


Figura 94. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT2 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hCNT2 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M i dipiridamol 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen *CDA* contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

En cèl·lules HEK293-hCNT3 s'observa un comportament en resposta al tractament amb 5fdC en funció del perfil de transportadors similar a l'exposat en cèl·lules HEK293-hCNT2. Igual que en cèl·lules HEK293-hCNT1 i HEK293-hCNT2, en cèl·lules HEK293-hCNT3 també té lloc un efecte de menor confluència i major proporció de la població de cèl·lules en divisió degut únicament a l'existència d'activitat enzimàtica citidina desaminasa (**Figura 95**). A partir d'aquestes imatges, es podria suggerir que aquest efecte dependent de CDA i independent del tractament amb cap nucleòsid epigenètic estaria lligat d'una o altra manera a l'existència de transport concentratiu en general (ja sigui degut a hCNT1, hCNT2 o hCNT3) (**Figures 89, 92 i 95**); a diferència del que s'observa en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb presència únicament de transport equilibratiu, fonamentalment hENT1 (**Figura 86**).

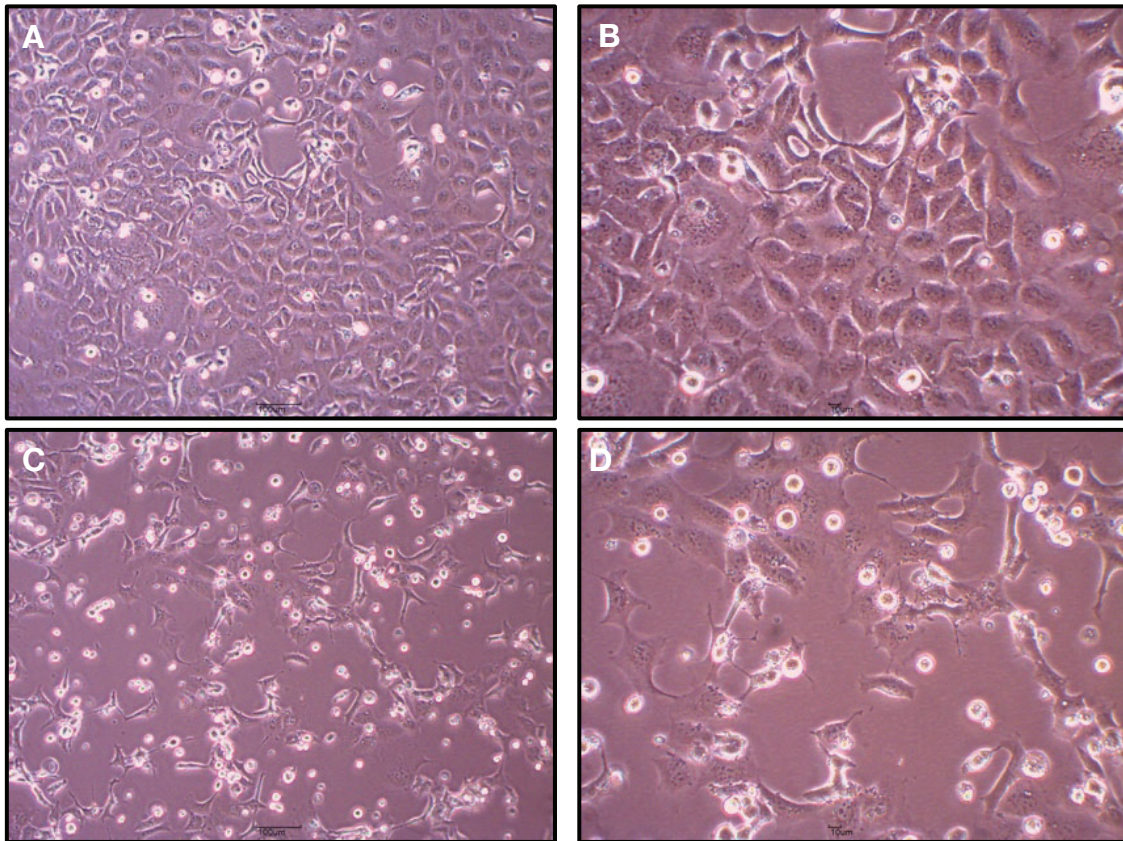


Figura 95. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i la morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hCNT3. Cèl·lules HEK293-hCNT3 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre al cap de 24 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen *CDA* contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 48 hores després de la sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10× (panells **A** i **C**) i 20× (panells **B** i **D**).

En exposar cèl·lules HEK293-hCNT3 a 5fdC 10 μ M durant un període de 24 hores la mortalitat cel·lular és pràcticament del cent per cent si el nucleòsid epigenètic pot ser convertit al seu respectiu derivat d'uridina per part de l'activitat citidina desaminasa. En aquest cas, pràcticament no queden cèl·lules viables i les poques que queden presenten una aparença apoptòtica. L'efecte observat és el resultat de la combinació d'efectes d'hCNT3 i hENT1 en el seu conjunt (**Figura 96**).

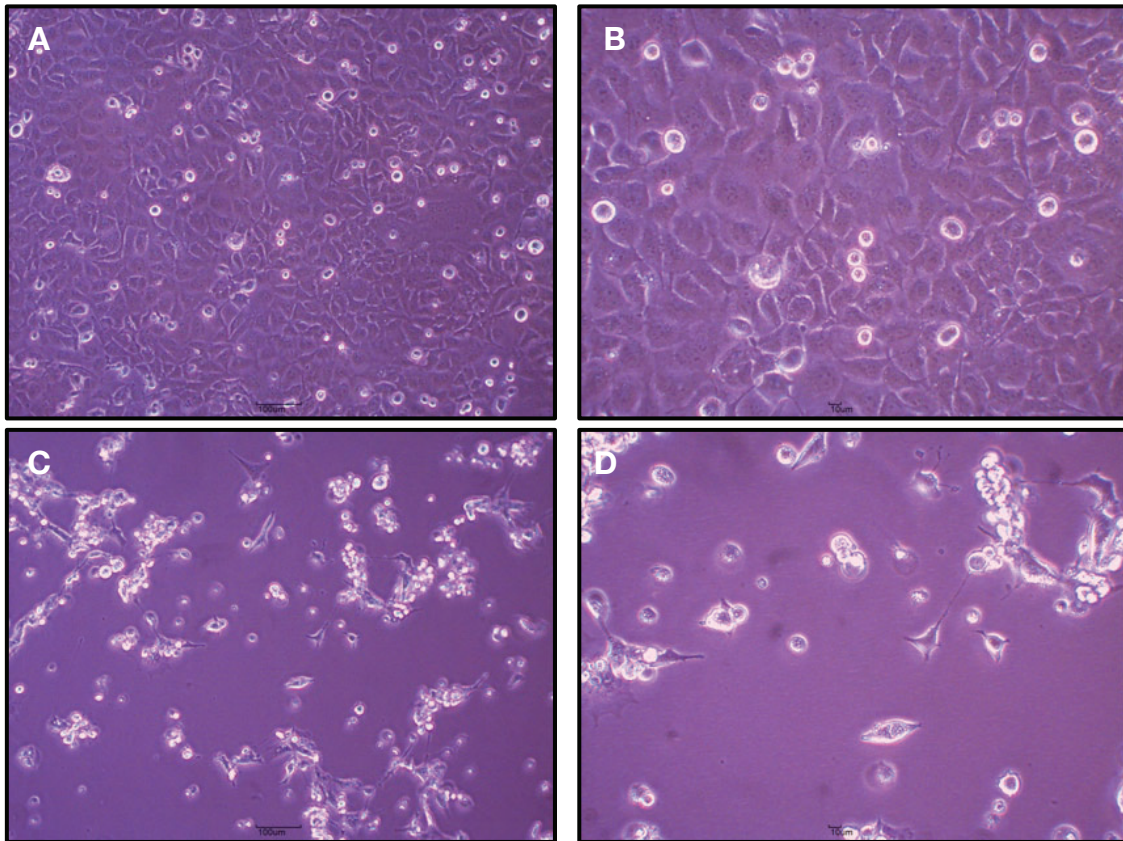


Figura 96. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT3 i hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hCNT3 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

De la mateixa manera que va realitzar-se per hCNT2, es van tractar cèl·lules HEK293-hCNT3 amb dipiridamol 10 μ M a més de 5fdC 10 μ M per inhibir el transportador equilibratiu hENT1 i conèixer d'aquesta manera la contribució neta del transportador hCNT3 a l'efecte citotòxic dependent de CDA de 5fdC i, per tant, la contribució real del transportador hCNT3 a la captació cel·lular de 5fdC. En aquest cas, la mortalitat cel·lular en presència de CDA està sensiblement per sota de la figura anterior en què hENT1 és funcional però molt per sobre de les cèl·lules a temps zero abans de ser tractades amb 5fdC. Per tant, l'efecte citotòxic dependent de CDA observat es deu al tractament amb 5fdC i la contribució d'hCNT3 a l'efecte farmacològic d'aquest és molt important a nivell del seu transport i és complementària a la contribució d'hENT1 (**Figura 97**).

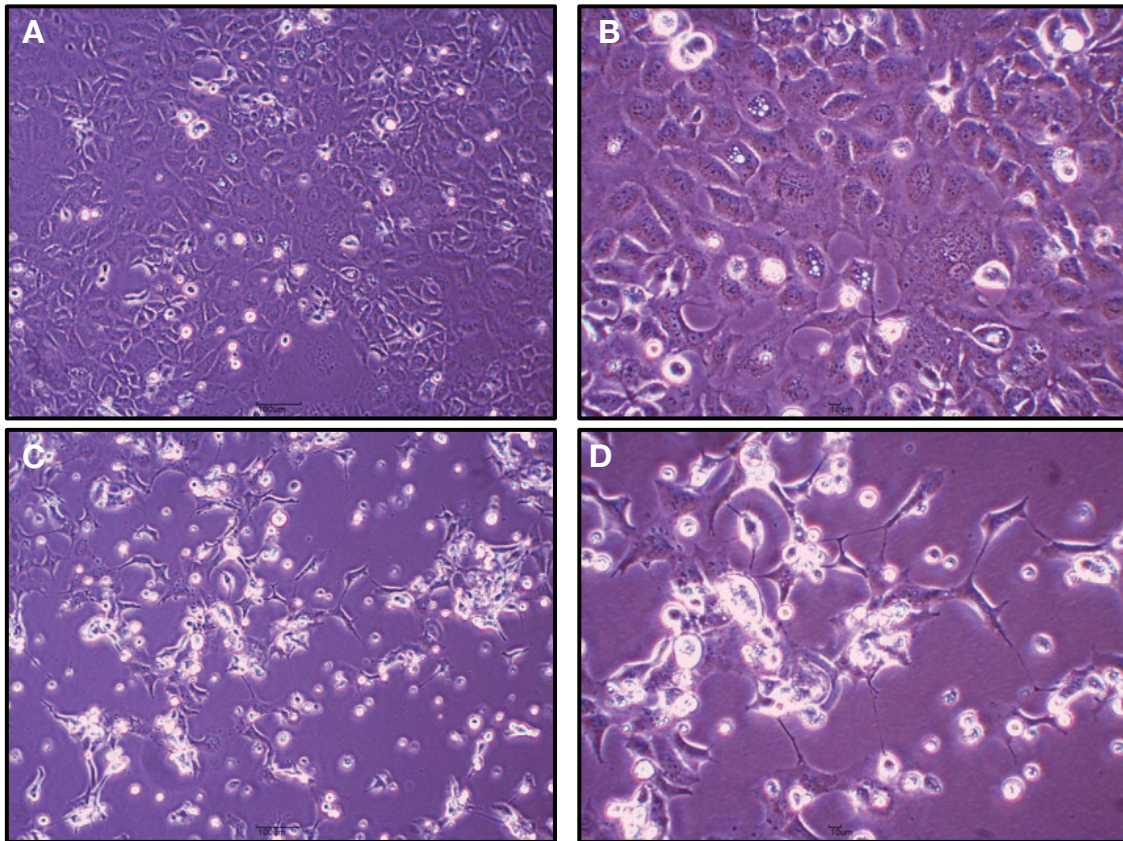


Figura 97. Efecte de la captació de 5fdC per hCNT3 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hCNT3 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M i dipiridamol 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

En últim lloc, també es van obtenir imatges de cèl·lules HEK293-hOCT1 per avaluar un possible rol d'aquest transportador en el mecanisme d'acció del nucleòsid epigenètic 5fdC (**Figures 98–100**). En aquest cas, igual que als subapartats anteriors, també existeix un efecte previ al tractament amb 5fdC causat per l'enzim citidina desaminasa. No obstant, en cèl·lules HEK293-hOCT1 aquest efecte presenta un comportament completament diferent a l'efecte derivat de CDA lligat a transportadors concentratius. Mentre que en els casos en què aquest efecte causat per CDA està lligat a algun transportador concentratiu de nucleòsids cursa amb una menor confluència cel·lular i una major proporció de la població de cèl·lules en divisió però al mateix temps un manteniment de la morfologia de les cèl·lules adherides que no estan en divisió (**Figures 89, 92 i 95**), en cèl·lules amb hOCT1 el nivell de confluència és inclús menor que en els demés casos, la proporció de la població de cèl·lules en divisió també és notablement major i la morfologia de les cèl·lules restants adherides aparentment sembla ser més estrellada (**Figura 98**).

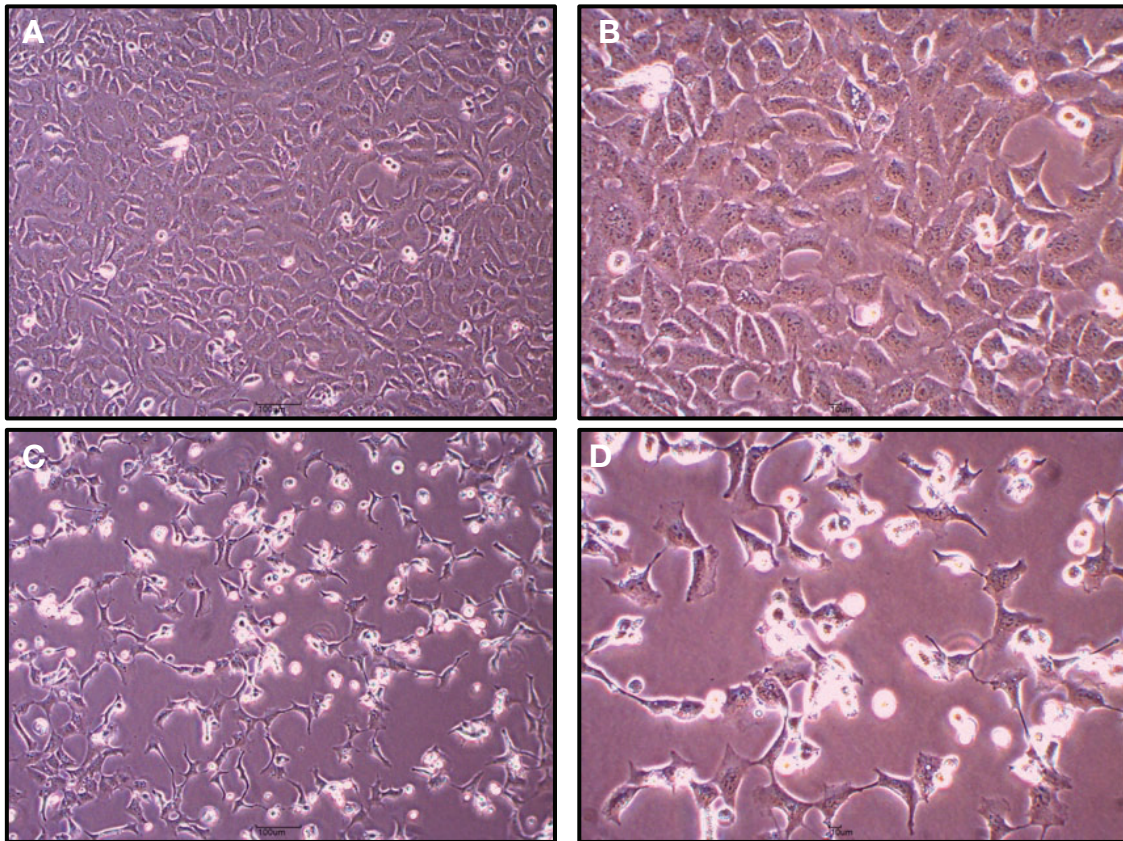


Figura 98. Efecte de la transfecció transitòria amb CDA sobre el creixement i la morfologia cel·lulars en cèl·lules HEK293 amb sobreexpressió estable d'hOCT1. Cèl·lules HEK293-hOCT1 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre al cap de 24 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 48 hores després de la sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augmentos, concretament 10× (panells **A** i **C**) i 20× (panells **B** i **D**).

En resposta a 24 hores de tractament amb una concentració 10 μ M de 5fdC, les cèl·lules HEK293-hOCT1 amb CDA presenten una elevada mortalitat cel·lular, tot i que no completa. En canvi, sí que tota la població cel·lular restant són cèl·lules totalment esfèriques amb aparença apoptòtica i/o desadherides, de manera que no existeix ni tan sols una mínima població de cèl·lules encara adherides. En principi, en tant que no s'esperaria translocació de 5fdC per part del transportador hOCT1 en base als resultats obtinguts tant en els experiments de transport de nucleòsids com en els assaigs de viabilitat cel·lular, l'efecte citotòxic observat en aquest cas hauria de ser conseqüència exclusivament de la translocació de 5fdC portada a terme per hENT1 (**Figura 99**). Tot i així, si la incidència de la existència d'hOCT1 realment fos innòcua, l'aspecte de les cèl·lules hauria de tenir cert grau de semblança amb allò observat en cèl·lules HEK293-pcDNA5 (**Figura 87**), però en comparar sengles imatges això no és així. Per tant, d'alguna manera, podria arribar a pensar-se que la proteïna hOCT1 tingués algun tipus d'incidència en l'efecte farmacològic de 5fdC ja sigui o bé de forma directa o bé de forma indirecta regulant d'alguna forma el seu transport a través d'hENT1 (**Figura 99**).

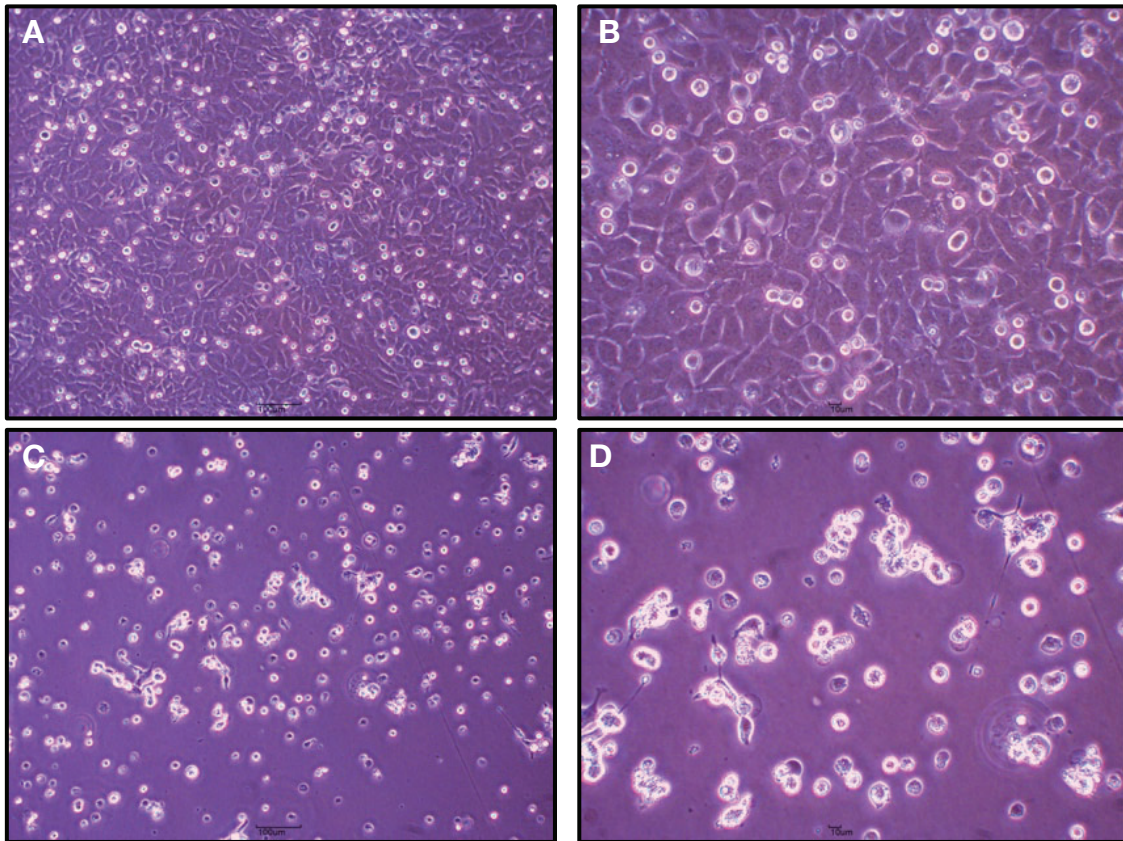


Figura 99. Efecte de la captació de 5fdC per hOCT1 i hENT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hOCT1 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitòriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen CDA contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la seva sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

Per conèixer si el transportador de cations orgànics hOCT1 exerceix algun tipus d'influència sobre l'acció citotòxica de 5fdC dependent de citidina desaminasa o, si aquesta influència en cas d'existir, tingués lloc de forma directa sobre el mecanisme d'acció de 5fdC o per un altre costat incidís d'una forma més aviat indirecta actuant sobre la seva translocació a nivell d'hENT1, es van obtenir imatges de cèl·lules HEK293-hOCT1 amb CDA tractades amb 5fdC 10 μ M i amb el transport a través d'hENT1 completament inhibït per l'aplicació de dipiridamol 10 μ M (**Figura 100**). Les imatges corresponents a cèl·lules HEK293-hOCT1 amb CDA, hENT1 bloquejat amb dipiridamol i tractades amb 5fdC (**Figura 100**, imatges **C** i **D**) són iguals a les imatges obtingudes de cèl·lules HEK293-hOCT1 transfectades amb citidina desaminasa però amb hENT1 funcional i abans de ser tractades amb 5fdC (**Figura 98**).

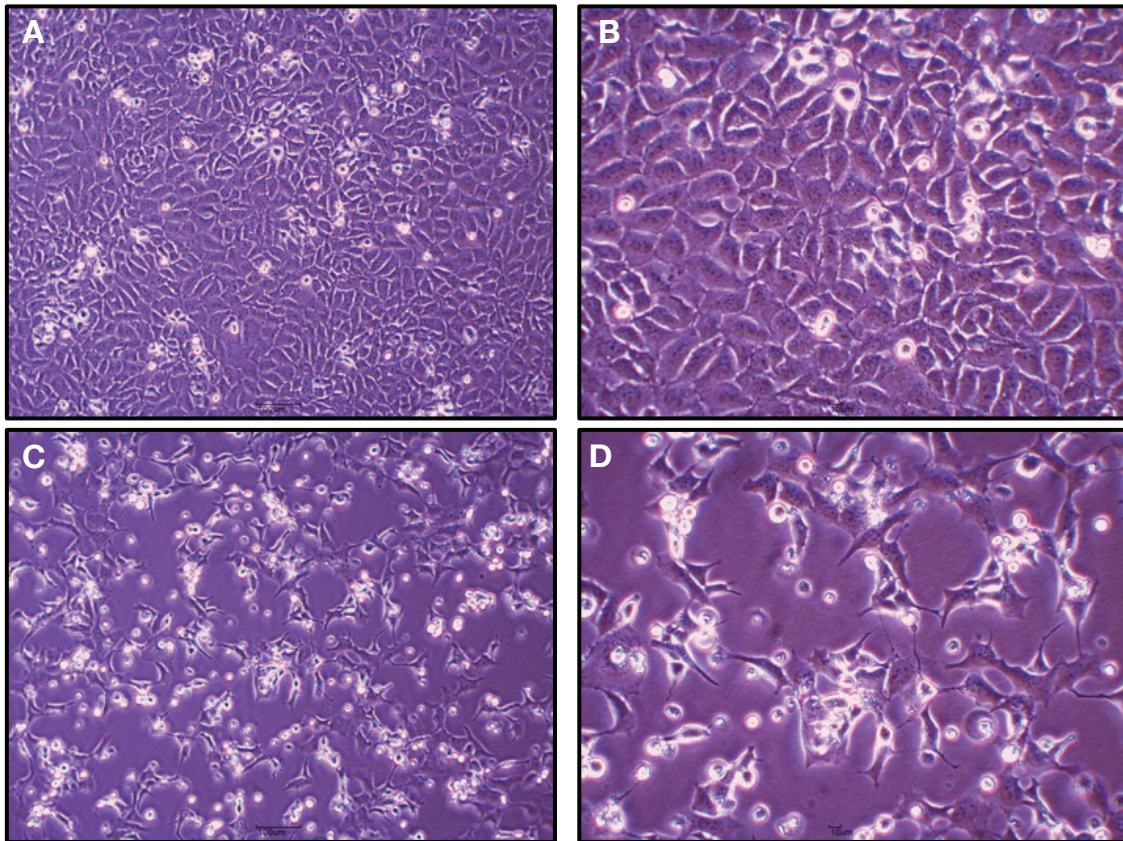


Figura 100. Efecte de la captació de 5fdC per hOCT1 sobre el creixement i la morfologia cel·lulars. Cèl·lules HEK293-hOCT1 sembrades en plaques de 60 mm de diàmetre després de 24 hores d'exposició al tractament amb 5fdC 10 μ M i dipiridamol 10 μ M, al cap de 48 hores de ser transfectades transitoriament amb el vector control pcDNA3 (panells **A** i **B**) o amb el gen *CDA* contingut en el vector pcDNA3 (panells **C** i **D**) i 72 hores després de la sembra. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia òptica amb objectius de diferents augments, concretament 10 \times (panells **A** i **C**) i 20 \times (panells **B** i **D**).

3. Modelatge dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors de nucleòsids per acoblament molecular (*molecular docking*)

Amb la finalitat de elucidar i identificar alguns determinants estructurals rellevants en la interacció entre els nucleòsids epigenètics i els transportadors de nucleòsids i estudiar la influència dels diversos elements estructurals, ja sigui del grup funcional situat a la posició 5 de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i en conseqüència de la seva distribució de la densitat electrònica i la capacitat d'establiment d'interaccions de tipus Van der Waals per ponts d'hidrogen, o bé dels residus aminoacídics que queden estèricament més propers a aquest grup funcional determinant la capacitat de formació de ponts d'hidrogen; es van realitzar tot un seguit de simulacions per acoblament molecular entre cada nucleòsid epigenètic i els transportadors de nucleòsids, concentratius (vcCNT) o equilibratius (hENT1).

3.1. Acoblament molecular dels nucleòsids epigenètics amb el transportador concentratiu de nucleòsids de *Vibrio cholerae* (vcCNT)

Les diverses simulacions de *molecular docking* corresponent a cadascun dels nucleòsids epigenètics amb els transportadors concentratius de nucleòsids es van realitzar en base al model de vcCNT extret de la seva estructura cristal·litzada amb citidina com a lligand (estructura 4PDA) (**Figura 101**).

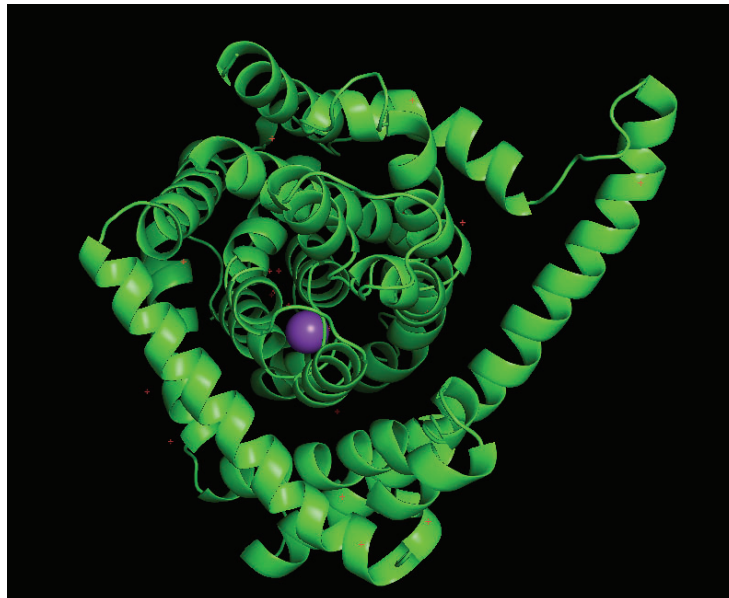
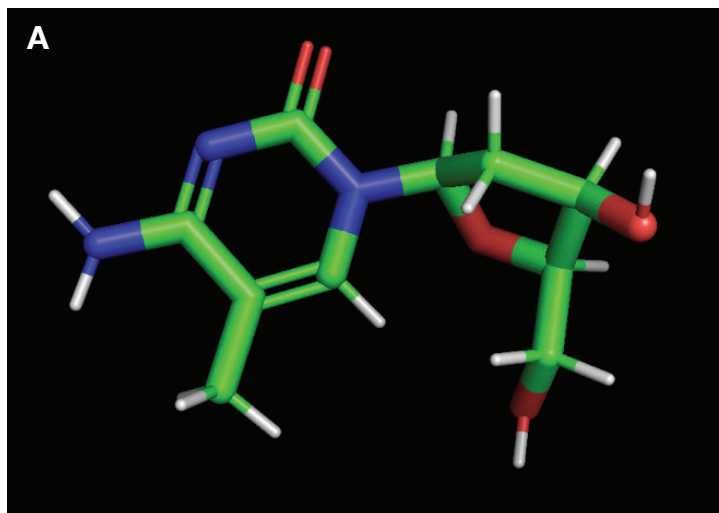


Figura 101. Estructura de vcCNT. Estructura cristal·litzada del transportador concentratiu de nucleòsids de *Vibrio cholerae* (vcCNT) amb un catió sodi (Na^+) unit a la seva estructura visualitzada mitjançant PyMOL.

El nucleòsid 5mdC, a diferència de la resta de nucleòsids epigenètics estudiats en aquest treball, no té el carboni enllaçat a la posició 5 de l'anell de pirimidina funcionalitzat de forma que pugui formar potencials ponts d'hidrogen ja sigui actuant com a donador o com a acceptor (**Figura 102-A**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5mdC a vcCNT de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -7,78 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 102-B**). En aquest model 5mdC es situa a l'interior de l'estructura terciària de vcCNT, de manera que la interacció de 5mdC amb aquest transportador concentratiu es veu confirmada. El residu aminoacídic de vcCNT que queda més proper espacialment al grup metil de la posició 5 de 5mdC és un residu de valina, concretament Val¹⁸⁸ (**Figura 102-C**). Aquesta interacció entre el grup metil ($-\text{CH}_3$) de 5mdC i Val¹⁸⁸ de vcCNT té sentit en tant que; donat que el grup metil no està funcionalitzat i, per tant, no és un potencial formador de ponts d'hidrogen, ja sigui a mode de donador o d'acceptor; precisament aquest grup metil interaccioni amb el grup isopropil ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) de la cadena lateral de la valina. Tant el grup metil com el grup isopropil mantenen una connectivitat i una constitució d'àtoms de carboni i hidrogen similar, de forma que tant les seves característiques en quant a distribució de la densitat electrònica i característiques estèriques siguin semblants també i, tractant-se de grups hidrofòbics, poden mantenir cert grau d'afinitat entre ambdós (**Figura 102-D**).



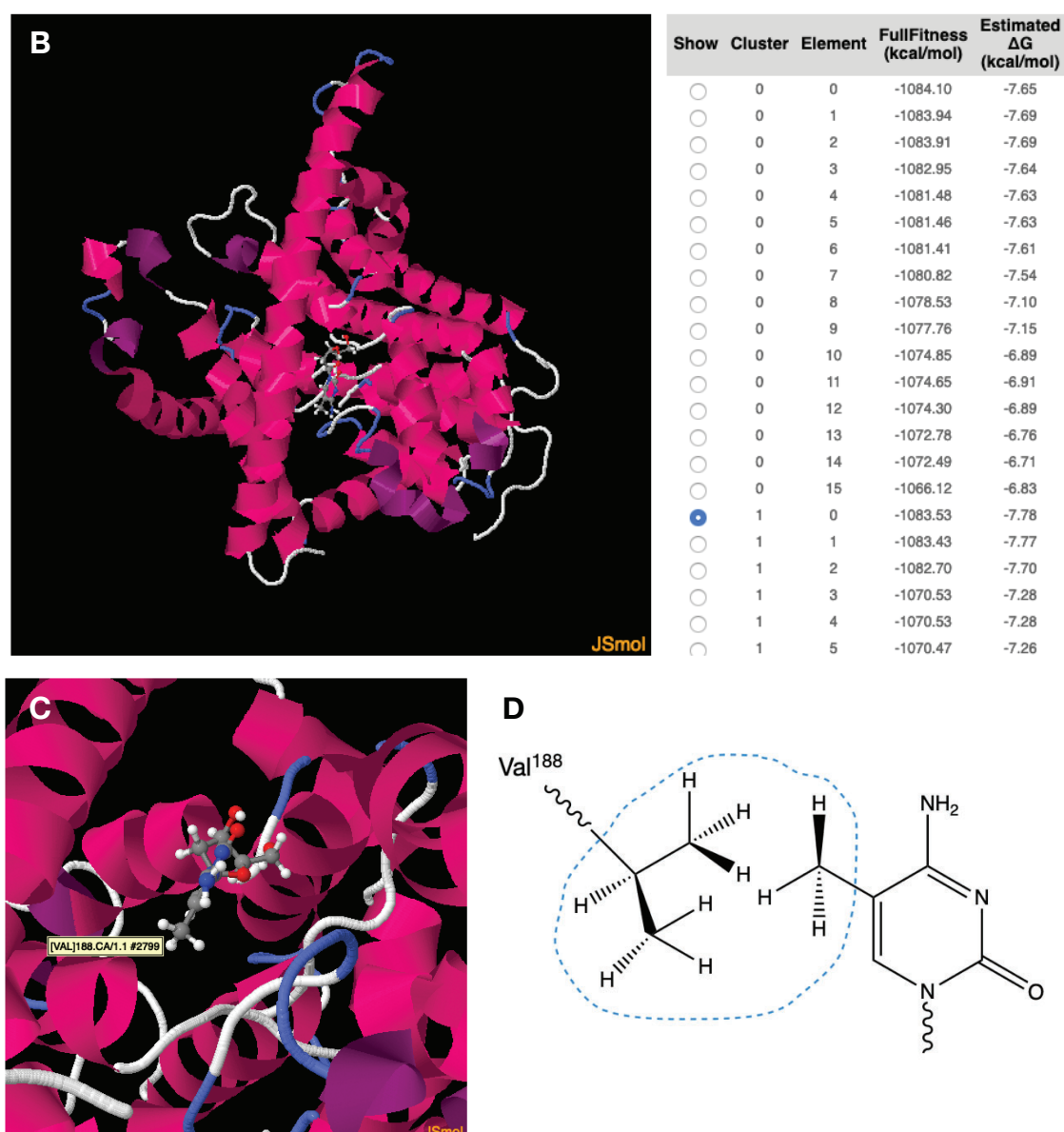
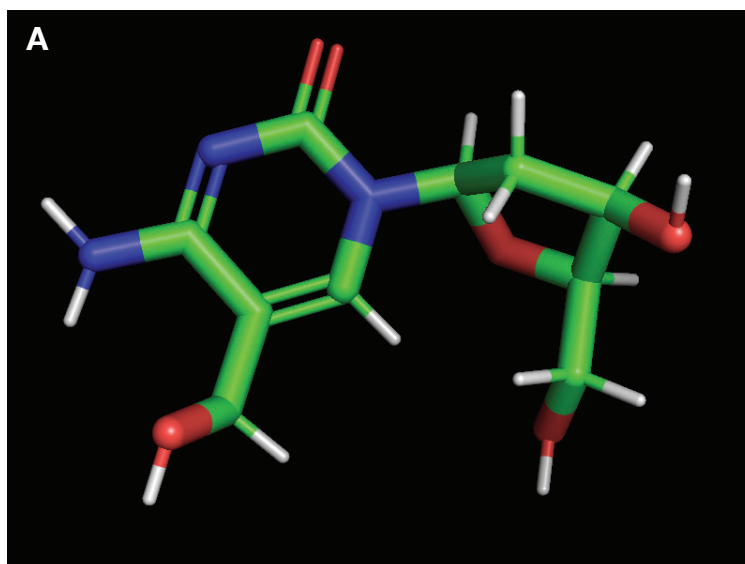


Figura 102. Acoblament molecular entre 5mdC i vcCNT. Visualització de la molècula 5-metil-2'-desoxicitidina (5mdC) i del model de l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5mdC i el transportador vcCNT. **(A)** Molècula de 5mdC utilitzada en l'acoblament molecular visualitzada a PyMOL, **(B)** visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5mdC i vcCNT en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(C)** visualització propera del lligand (5mdC) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna vcCNT amb què interactua i **(D)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (metil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Val¹⁸⁸) mitjançant fórmules de ziga-zaga-Kekulé en perspectiva.

En quant al nucleòsid 5hmdC, a diferència de 5mdC, sí que té funcionalitzat l'àtom de carboni directament enllaçat a la posició 5 de l'anell de pirimidina, concretament mitjançant un grup hidroxil (**Figura 103–A**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5hmdC a vcCNT de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -8,15 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 103–B**). Els grups hidroxil típicament actuen com a donadors de ponts d'hidrogen, en tant que l'àtom d'hidrogen enllaçat a l'àtom d'oxigen està

disponible per a l'establiment d'aquest tipus d'interacció donat que els dos electrons de l'enllaç O–H queden atrets per l'electronegativitat de l'àtom d'oxigen. Tot i així, en aquest cas, la presència d'un grup hidroxil a l'estructura a nivell de la posició 5 no sembla suficient per a l'establiment d'un patró clar de ponts d'hidrogen respecte la cadena lateral de l'aminoàcid més proper, que és Val¹⁵² (**Figura 103–C**). Per contra, més que actuar com a donador de ponts d'hidrogen a nivell de l'àtom d'hidrogen, seria factible que el grup hidroxil actués més aviat com a acceptor de ponts d'hidrogen dels múltiples àtoms d'hidrogen dels dos grups metil de la cadena lateral de la valina que podrien interactuar en certa forma amb els dos parells d'electrons no enllaçants situats en orbitals sp^3 de l'àtom d'oxigen. A més, l'àtom d'hidrogen pertanyent al grup hidroxil podria participar d'aquestes interaccions mitjançant la generació d'un entorn químic estable d'àtoms d'hidrogen format pels sis àtoms d'hidrogen de la cadena de valina i l'àtom d'hidrogen del grup hidroxil. L'àtom d'hidrogen del grup hidroxil veu frustrada la possibilitat d'establir ponts d'hidrogen perquè no troba un acceptor clar a l'altra banda; però, el fet que els parells no enllaçants de l'àtom d'oxigen puguin interaccionar en certa mesura amb altres àtoms d'hidrogen de la cadena lateral de la valina, augmenta la capacitat atractiva de l'oxigen envers els dos electrons de l'enllaç amb l'àtom d'hidrogen com a mecanisme compensatori. Per tant, d'aquesta forma s'estableix un mecanisme d'interacció que permet explicar que existeixi un comportament termodinàmicament estable i favorable entre 5hmdC i vcCNT, tot i no donar-se a nivell d'un residu aminoacídic amb una cadena lateral que contingui un grup funcional que permeti vislumbrar una interacció evident a primer cop d'ull (**Figura 103–D**).



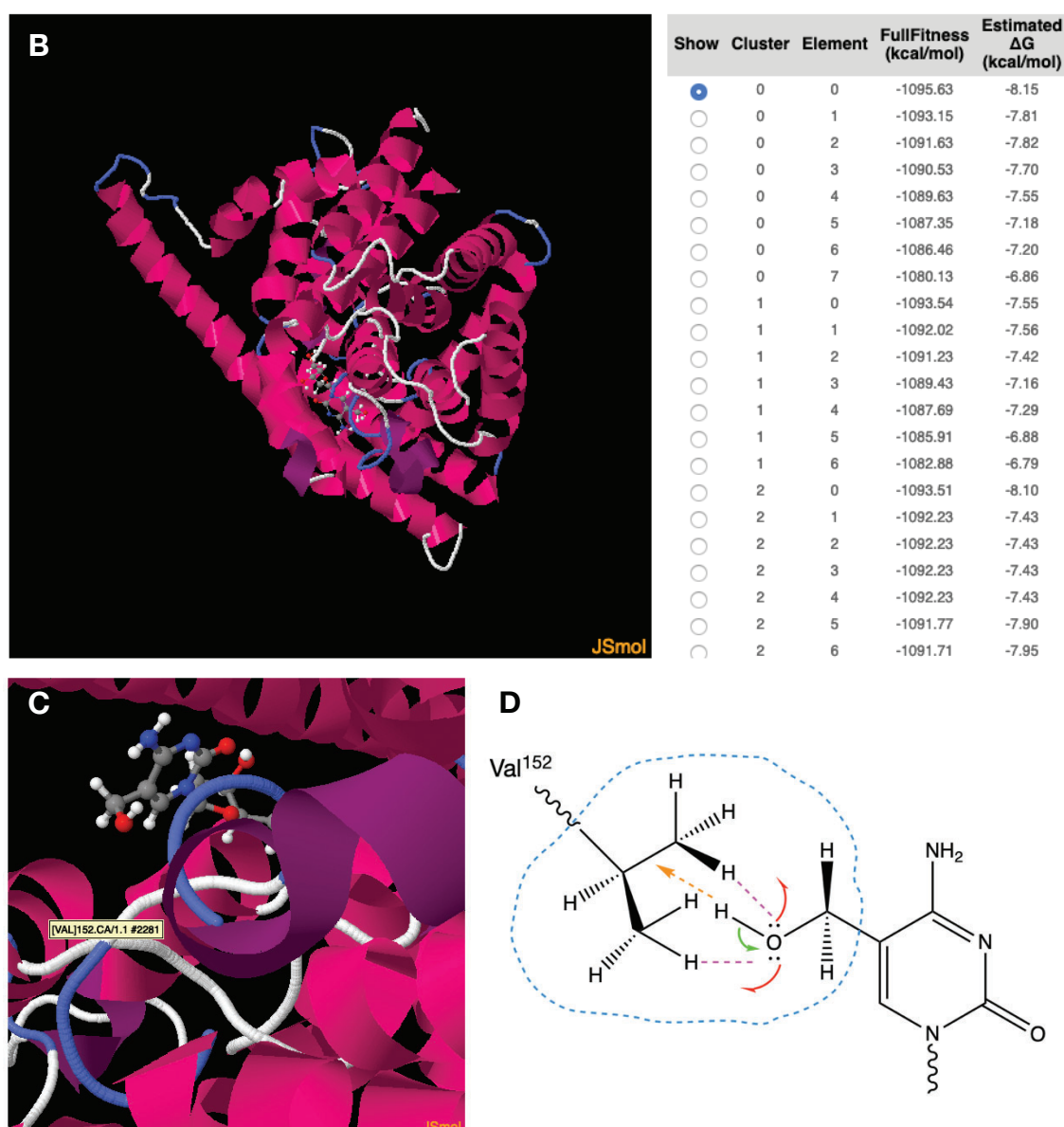
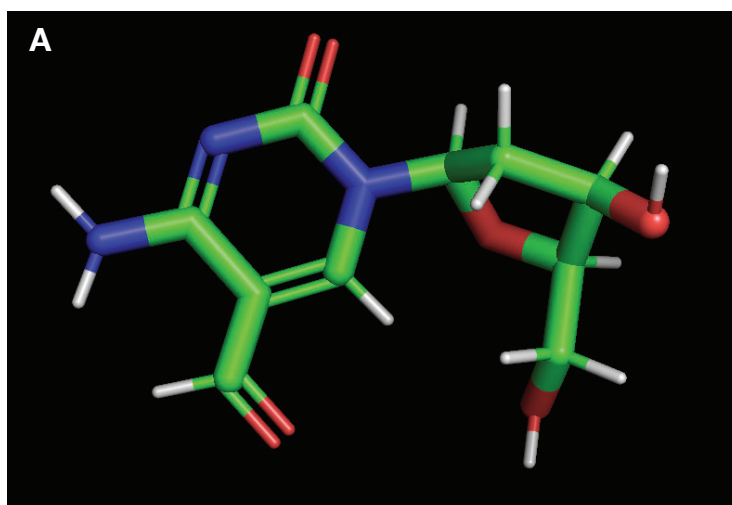


Figura 103. Acoblament molecular entre 5hmdC i vcCNT. Visualització de la molècula 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5hmdC) i del model de l'estat conformational més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5hmdC i el transportador vcCNT. **(A)** Molècula de 5hmdC utilitzada en l'acoblament molecular visualitzada a PyMOL, **(B)** visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5hmdC i vcCNT en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(C)** visualització propera del lligand (5hmdC) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna vcCNT amb què interactua i **(D)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (hidroximetil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Val¹⁵²) mitjançant fórmules de ziga-zaga-Kekulé en perspectiva.

El nucleòsid 5fdC està clarament més funcionalitzat a la posició 5 que 5mdC i 5hmdC, en tant que té un grup carbonil que no només canvia tota la distribució de la densitat electrònica d'aquesta protuberant de la molècula, sinó que també resulta determinant per a la seva geometria i disposició espacial. La presència d'un grup carbonil confereix al carboni enllaçat a la posició 5 un estat d'hibridació sp^2 – a diferència de 5mdC i 5hmdC en què aquest carboni té hibridació sp^3 –, de forma que tot el substituent (els àtoms de carboni, oxigen i

hidrogen, i el doble enllaç $\sigma+\pi$ C=O i l'enllaç senzill σ C-H) es troba situat en el mateix pla; i no és, per tant, un tetraedre com en els casos de 5mdC i 5hmdC (**Figura 104-A**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5fdC a vcCNT de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -8,09 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 104-B**). Aquestes diferències tant en la distribució electrònica com a nivell de la disposició espacial es veuen reflectits en el residu aminoacídic de vcCNT, Gln²⁵⁸, més proper amb què 5fdC interactua i el tipus d'interacció que s'estableix a nivell molecular (**Figura 104-C**). En primera instància, els parells d'electrons no enllaçants de l'àtom d'oxigen del grup formil estan disponibles per actuar com a acceptors de ponts d'hidrogen envers els àtoms d'hidrogen enllaçats al nitrogen de la cadena lateral del residu de glutamina. L'establiment d'aquests ponts d'hidrogen fa que, al seu torn, els electrons dels enllaços N-H caiguin més sobre l'àtom de nitrogen augmentant-ne la seva nucleofília o densitat electrònica, de manera que el parell d'electrons no enllaçant de què ja consta aquest àtom de nitrogen queda més disponible per actuar com a acceptor de pont d'hidrogen envers l'àtom d'hidrogen del grup formil. Aquesta última circumstància es veu encara més afavorida per l'establiment anterior de ponts d'hidrogen entre l'oxigen carbonílic i els hidrògens de glutamina, de forma que per deslocalització electrònica $sp^2-\pi$ els electrons de l'enllaç entre l'hidrogen i el carboni carbonílic del grup formil es veuen desplaçats cap a l'àtom d'oxigen per compensar la pèrdua de densitat electrònica generada precisament pels ponts d'hidrogen previs. Això accentua la capacitat d'aquest hidrogen formílic d'actuar com a donador de ponts d'hidrogen, no només amb el parell d'electrons no enllaçant de l'àtom de nitrogen, sinó també amb els dos parells d'electrons no enllaçants de l'àtom d'oxigen del mateix grup amida a què pertany l'àtom de nitrogen de la cadena lateral del residu de glutamina (**Figura 104-D**).



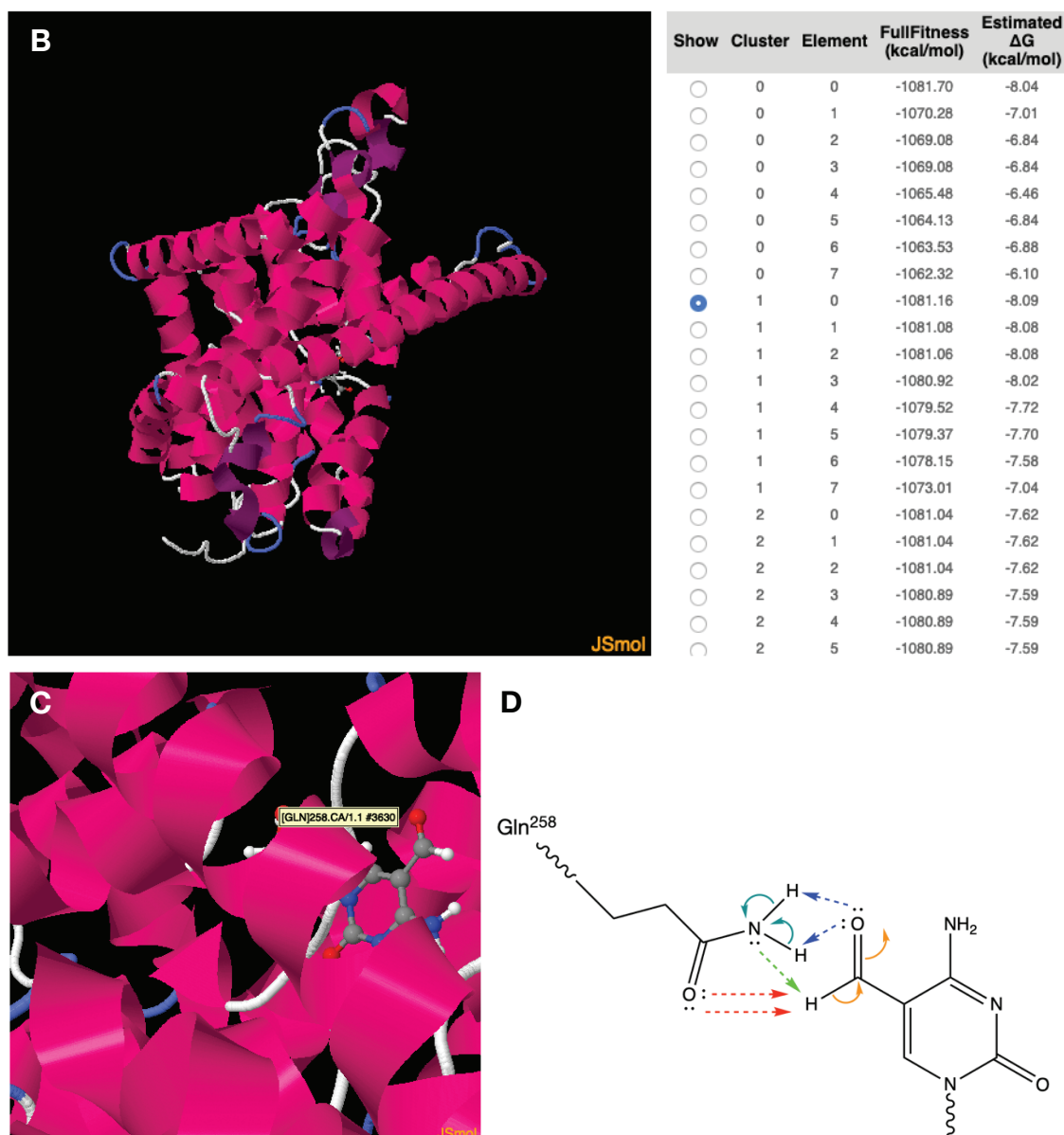
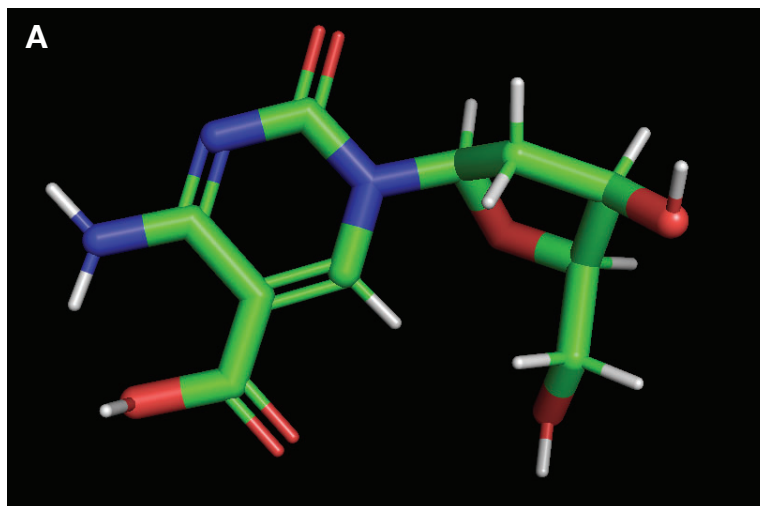


Figura 104. Acoblament molecular entre 5fdC i vcCNT. Visualització de la molècula 5-formil-2'-desoxicitidina (5fdC) i del model de l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5fdC i el transportador vcCNT. **(A)** Molècula de 5fdC utilitzada en l'acoblament molecular visualitzada a PyMOL, **(B)** visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5fdC i vcCNT en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(C)** visualització propera del lligand (5fdC) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna vcCNT amb què interactua i **(D)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (formil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Gln²⁵⁸) mitjançant fórmules de zig-zaga-Kekulé en perspectiva.

El nucleòsid 5-carboxil-2'-desoxicitidina (5cadC) no es va avaluar a nivell funcional i de citotoxicitat en aquest treball per la manca d'activitat farmacològica derivada de la seva desaminació per CDA mostrada a **Zauri et al.**, 2015. Tot i així, es va realitzar el modelatge molecular d'aquest nucleòsid amb els transportadors de nucleòsids amb la finalitat d'extreure'n previsions de possible interacció de 5cadC amb aquests. 5cadC és el nucleòsid epigenètic

tant de major grau d'oxidació del carboni enllaçat a la posició 5 com de major nivell de funcionalització d'aquest substituent, donat que, no només és un clar donador de ponts d'hidrogen, sinó que es tracta directament d'un àcid carboxílic (**Figura 105-A**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5cadC a vcCNT de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -8,02 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 105-B**). El residu aminoacídic de vcCNT més proper al grup carboxil de 5cadC és Ser³⁷⁰ (**Figura 105-C**). A nivell molecular, la interacció entre 5cadC i la cadena lateral de Ser³⁷⁰ s'estableix mitjançant un cicle de ponts d'hidrogen i moviments en la distribució de la densitat electrònica. L'hidrogen de l'àcid carboxílic actua com a donador de pont d'hidrogen amb els parells d'electrons no enllaçants de l'àtom d'oxigen del grup hidroxil de la serina. Per tant, els electrons de l'enllaç O-H de l'àcid carboxílic, que ja pertanyen molt més a l'entorn de l'oxigen que de l'hidrogen perquè es tracta d'un àcid, acaben d'incorporar-se del tot a l'espai electrònic de l'oxigen. La densitat electrònica d'aquest àtom d'oxigen amb hibridació sp^3 es deslocalitza pel sistema π cap a l'àtom d'oxigen carbonílic amb hibridació sp^2 . En augmentar la densitat electrònica de l'oxigen carbonílic, els seus dos parells d'electrons no enllaçants tenen una tendència encara major a la que ja tenen d'entrada a establir ponts d'hidrogen en tant que acceptors amb l'hidrogen del grup hidroxil de la serina que, al seu torn, també està més disponible per donar aquest pont d'hidrogen perquè el seu enllaç amb l'oxigen és debilitat pel primer pont d'hidrogen format entre aquest oxigen i l'hidrogen de l'àcid carboxílic (**Figura 105-D**).



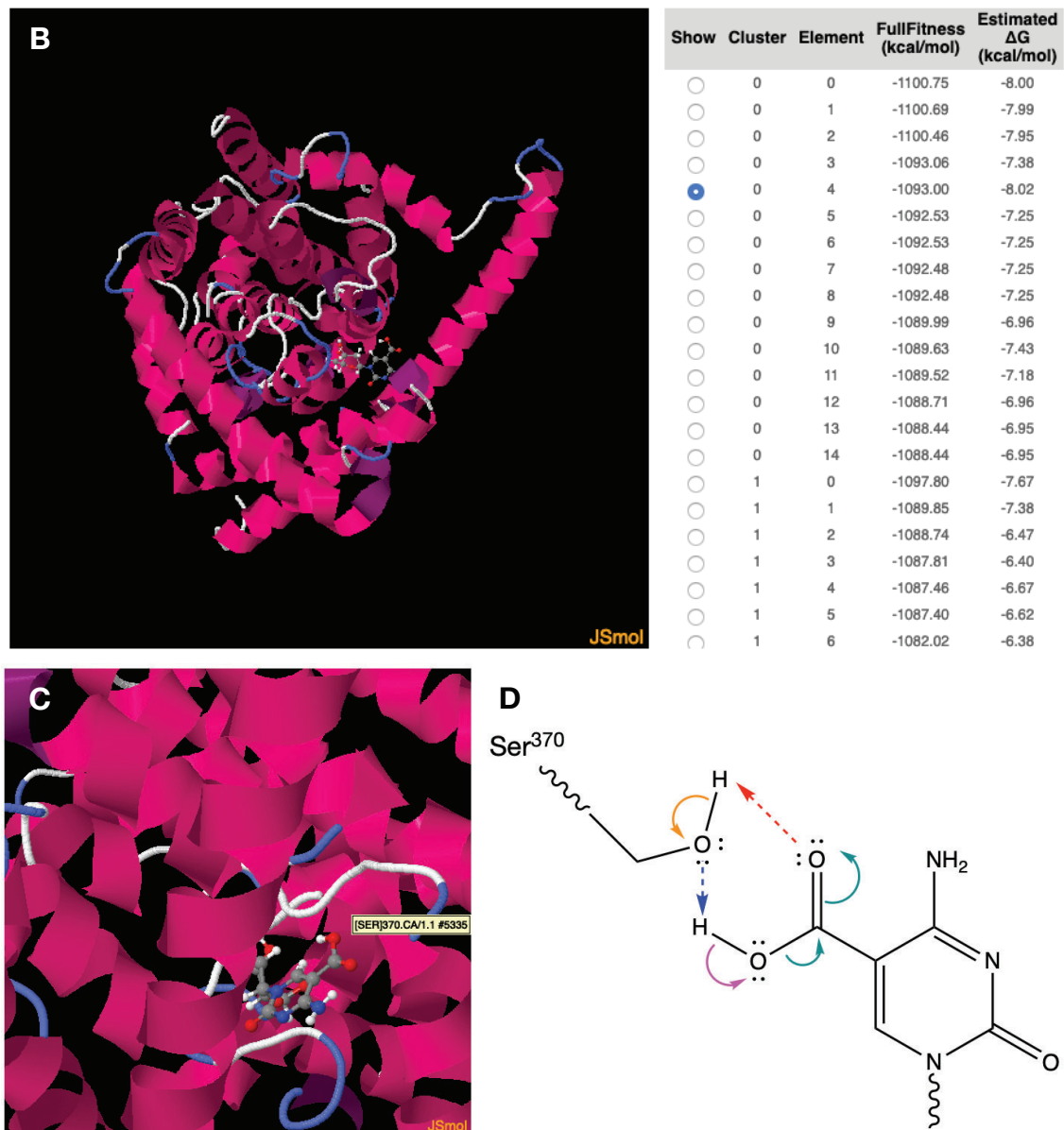
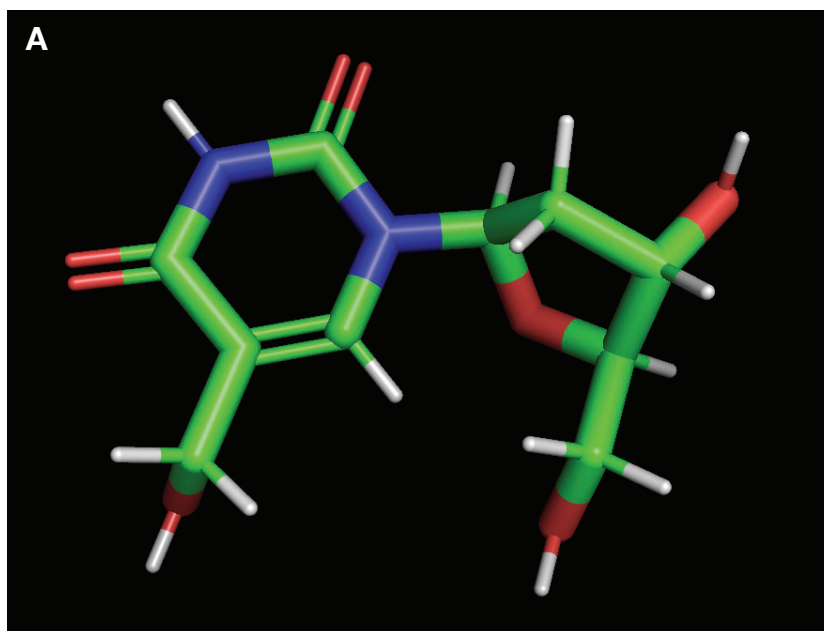


Figura 105. Acoblament molecular entre 5cadC i vcCNT. Visualització de la molècula 5-carboxil-2'-desoxicitidina (5cadC) i del model de l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5cadC i el transportador vcCNT. (A) Molècula de 5cadC utilitzada en l'acoblament molecular visualitzada a PyMOL, (B) visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5cadC i vcCNT en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, (C) visualització propera del lligand (5cadC) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna vcCNT amb què interactua i (D) representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (carboxil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Ser³⁷⁰) mitjançant fórmules de ziga-zaga-Kekulé en perspectiva.

El nucleòsid 5hmdU té el mateix grau de funcionalització del substituent a la posició 5 que 5hmdC, de manera que el que diferencia aquests dos nucleòsids epigenètics és l'anell de pirimidina corresponent a la nucleobase. En el cas de 5hmdU, la substitució del grup amino tipus anilina a la posició 4 per un grup carbonil, redueix el grau d'aromaticitat de l'anell. D'aquesta manera, la densitat electrònica del sistema π disminueix molt i és probable que el grup

hidroxil de 5hmdU consti d'una densitat electrònica major que el de 5hmdC (**Figura 106–A**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5cadC a vcCNT de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -7,79 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 106–B**). El residu aminoacídic de vcCNT que queda espacialment més proper a 5hmdU en aquest estat conformacional és Met²⁶⁶ (**Figura 106–C**). En aquest cas, l'àtom d'hidrogen del grup hidroxil de 5hmdU actua com a donador de pont d'hidrogen que és acceptat pels dos parells d'electrons no enllaçants de l'àtom de sofre de la cadena lateral de la metionina. En conseqüència, aquesta interacció es veu reforçada per l'afinitat dels parells no enllaçants de l'àtom d'oxigen de l'hidroxil amb els tres àtoms d'hidrogen del carboni enllaçat al sofre, que, a més, es veu reforçat per la contribució electrònica dels electrons de l'enllaç O–H que recauen sobre l'oxigen després de l'establiment del pont d'hidrogen amb l'àtom de sofre (**Figura 106–D**).



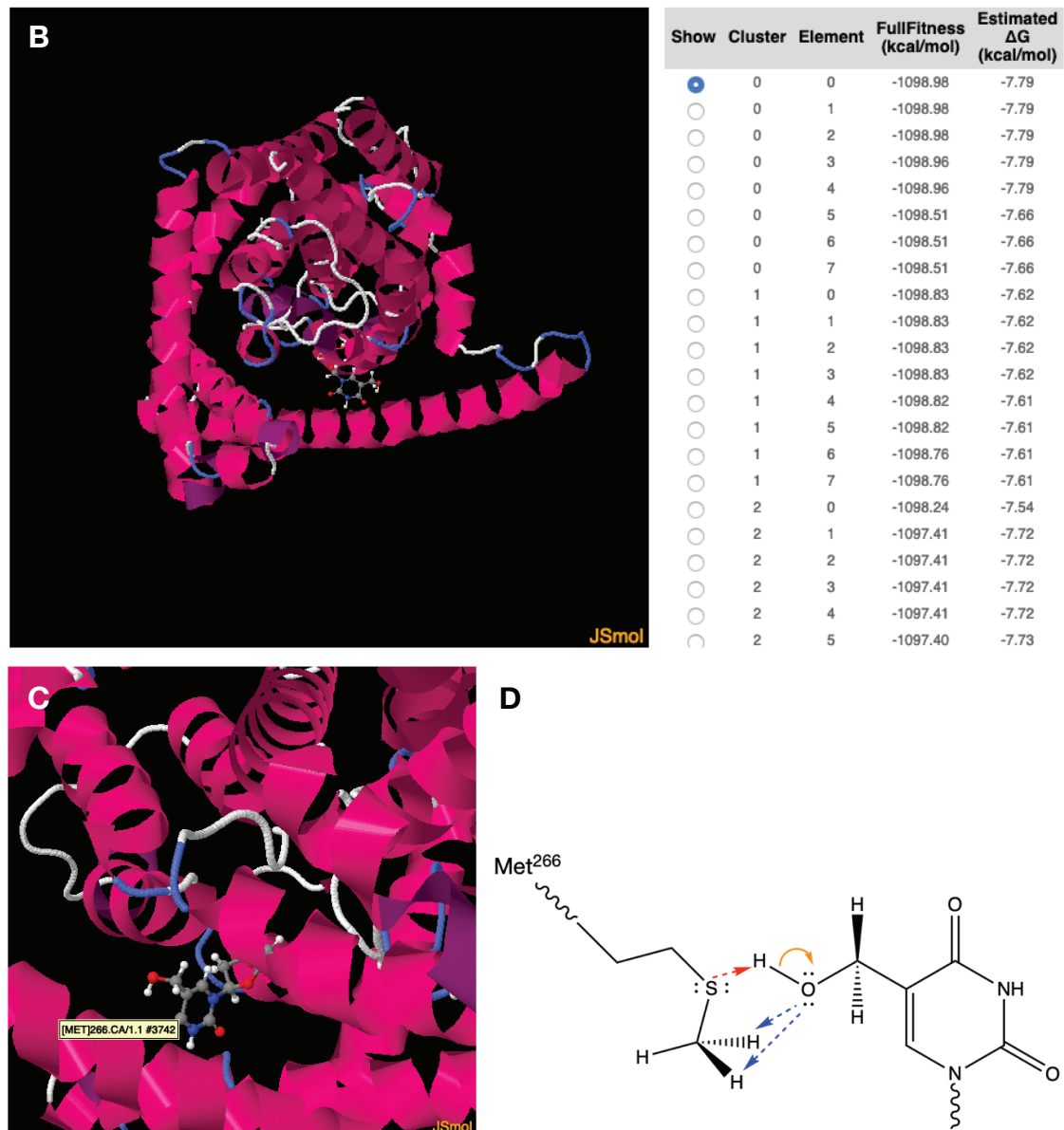


Figura 106. Acoblament molecular entre 5hmdU i vcCNT. Visualització de la molècula 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (5hmdU) i del model de l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5hmdU i el transportador vcCNT. **(A)** Molècula de 5hmdU utilitzada en l'acoblament molecular visualitzada a PyMOL, **(B)** visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5hmdU i vcCNT en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(C)** visualització propera del lligand (5hmdU) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna vcCNT amb què interactua i **(D)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (hidroximetil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Met²⁶⁶) mitjançant fórmules de ziga-zaga-Kekulé en perspectiva.

3.2. Acoblament molecular dels nucleòsids epigenètics amb el transportador equilibratiu de nucleòsids 1 humà (hENT1)

Els diversos models obtinguts per acoblament molecular corresponents a cadascun dels nucleòsids epigenètics amb el transportador equilibratiu de nucleòsids 1 (hENT1) es van obtenir a partir del model d'hENT1 extret de la seva estructura cristal·litzada amb dilazep com a lligand (estructura **6OB7**) (**Figura 107**).

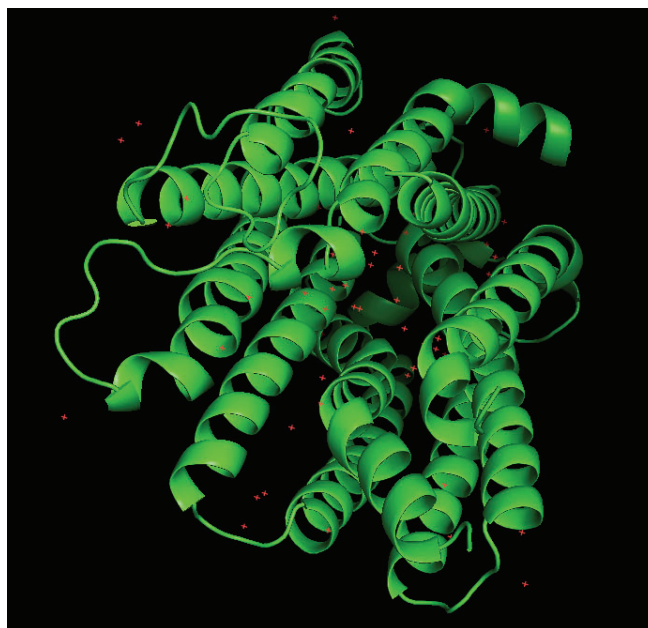


Figura 107. Estructura d'hENT1. Estructura cristal·litzada del transportador equilibratiu de nucleòsids 1 (hENT1) visualitzada mitjançant PyMOL.

El nucleòsid 5mdC interacciona amb hENT1 de la mateixa manera que ho fa amb el transportador vcCNT, a nivell d'un residu de valina, Val³¹⁰ (**Figura 108-B**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5mdC a hENT1 de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -8,30 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 108-A**). Els tres àtoms d'hidrogen del grup metil de la posició 5 de l'heterocicle pirimidínic de 5mdC interaccionen amb els sis hidrògens dels grups metil de la cadena lateral de la valina generant un entorn hidrofòbic (**Figura 108-C**).

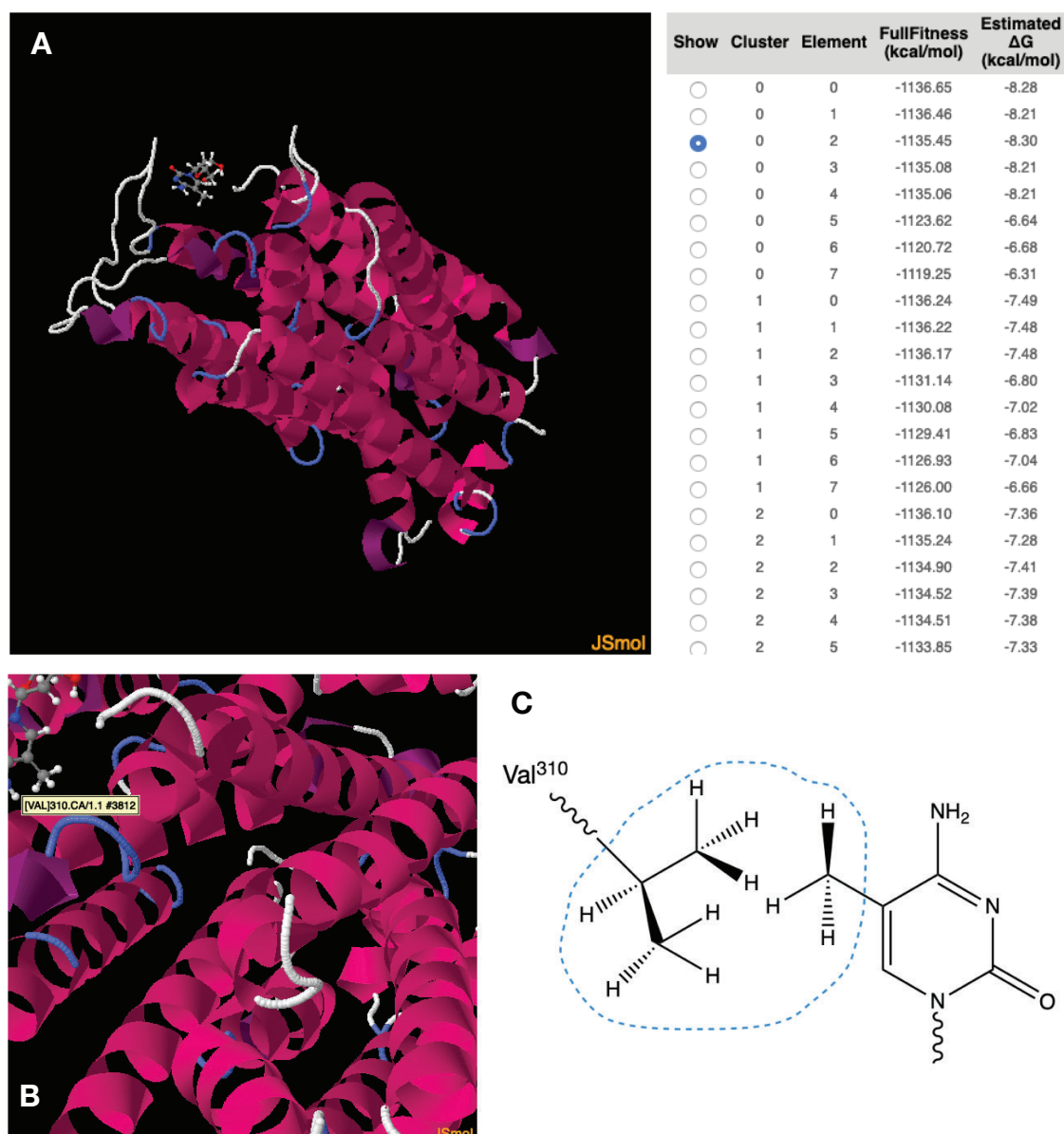


Figura 108. Acoblament molecular entre 5mdC i hENT1. Visualització del model corresponent a l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5mdC i el transportador hENT1. **(A)** Visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5mdC i hENT1 en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(B)** visualització propera del lligand (5mdC) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna hENT1 amb què interaccua i **(C)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (metil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Val³¹⁰) mitjançant fórmules de ziga-zaga-Kekulé en perspectiva.

El substituent a la posició 5 de 5hmdC, el grup hidroxil, interacciona amb el transportador hENT1 a nivell d'un residu de fenilalanina, Phe⁴⁵², que és el que queda més proper a aquest determinant estructural del nucleòsid (**Figura 109-B**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5hmdC a hENT1 de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -8,68 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 109-A**). En aquest cas, tant per la banda del grup funcional a la posició 5 del nucleòsid epigenètic com per part de la cadena

lateral del residu aminoacídic d'hENT1 amb què interacciona el lligand, hi ha un donador i un acceptor, respectivament, de pont d'hidrogen clars i evidents. En el cas de 5hmdC l'hidrogen del grup hidroxil unit a l'àtom d'oxigen que és altament electronegatiu, és el donador del pont d'hidrogen. A nivell del residu de fenilalanina, el sistema π de l'anell aromàtic del benzè té una densitat electrònica amb entitat pròpia que és equiparable a un grup nucleòfil (δ^-) o amb alta càrrega electrònica o negativa que permet actuar com l'acceptor del pont d'hidrogen que s'estableix amb el lligand (**Figura 109-C**).

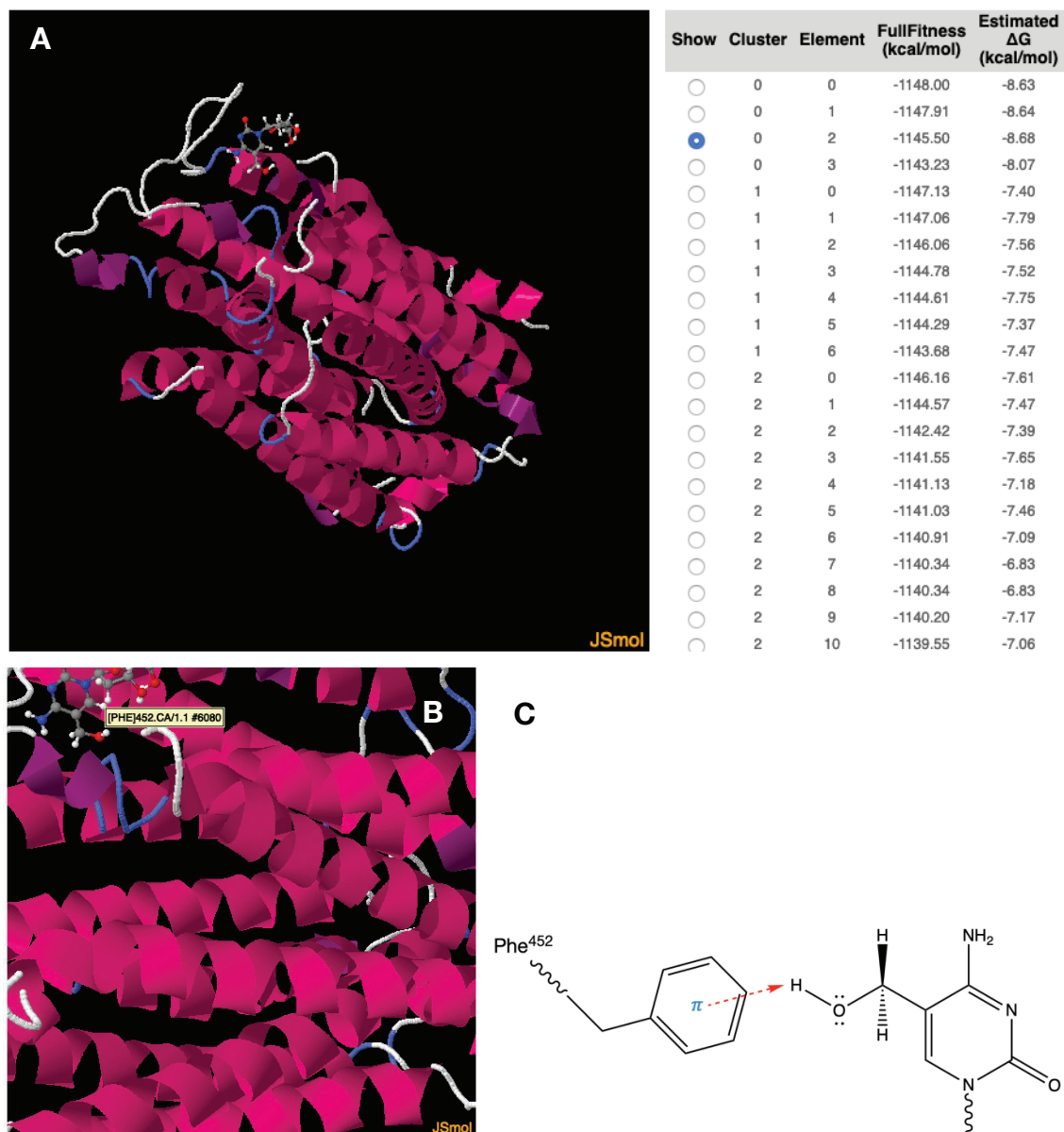
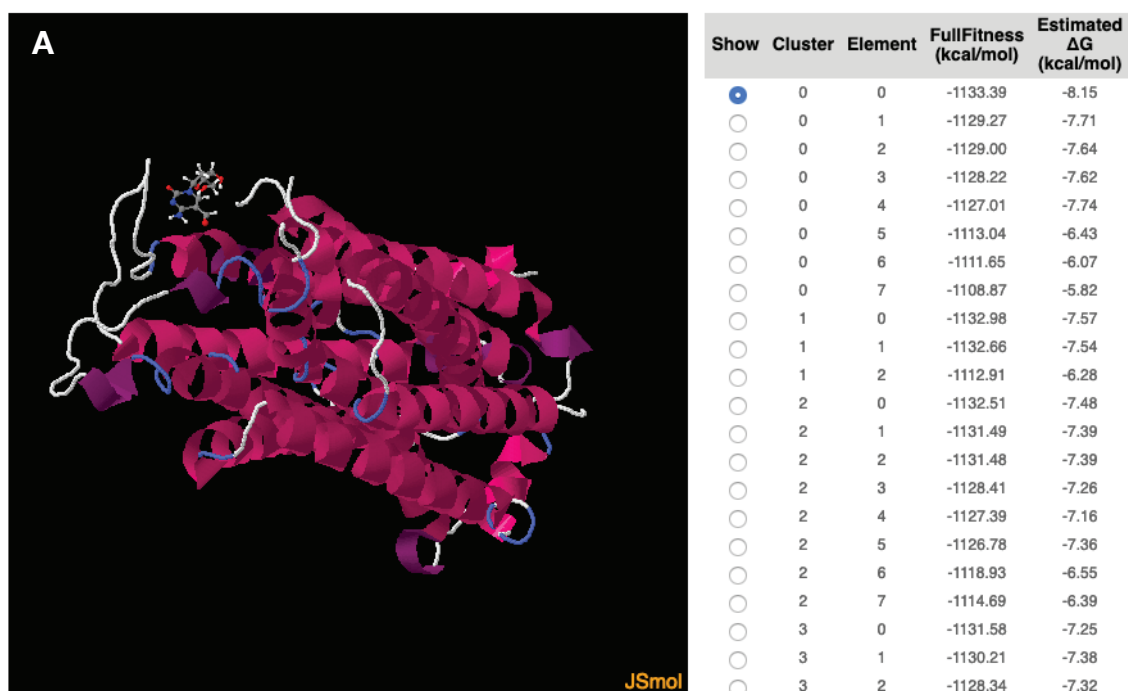


Figura 109. Acoblament molecular entre 5hmdC i hENT1. Visualització del model corresponent a l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5hmdC i el transportador hENT1. **(A)** Visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5hmdC i hENT1 en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(B)** visualització propera del lligand (5hmdC) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna hENT1 amb què interacciona i **(C)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (hidroximetil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Phe⁴⁵²) mitjançant fórmules de ziga-zaga-Kekulé en perspectiva.

En el cas del nucleòsid 5fdC, la part del substituent a la posició 5 que estableix ponts d'hidrogen amb la proteïna hENT1 és l'àtom d'oxigen carbonílic del grup formil, concretament els dos parells d'electrons no enllaçants de l'oxigen situats en orbitals sp^2 . Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5fdC a hENT1 de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -8,15 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 110–A**). El residu aminoacídic d'hENT1 més proper al grup formil és Val³¹⁰, el mateix que en la interacció amb 5mdC (**Figura 110–B**). L'àtom d'hidrogen del grup formil no està unit a un àtom suficientment electronegatiu, en aquest cas un carboni carbonílic que típicament és un element més aviat electròfil ($\delta+$), i en absència d'un acceptor clarament fort de ponts d'hidrogen no es veu forçat a variar la participació dels dos electrons en l'enllaç $C_{\text{carbonílic}}-H$. En canvi, d'altra banda, l'àtom d'oxigen del grup carbonil o aldèhid sí que actúa com a acceptor de ponts d'hidrogen, a nivell dels dos parells d'electrons no enllaçants, envers els sis àtoms d'hidrogen dels dos grups metil de la cadena lateral de la valina (**Figura 110–C**).



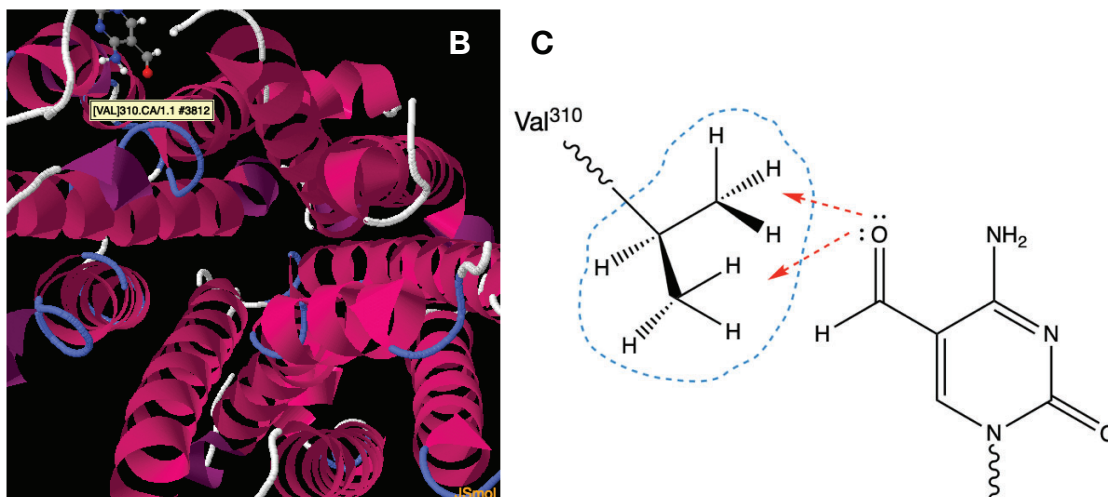


Figura 110. Acoblament molecular entre 5fdC i hENT1. Visualització del model corresponent a l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5fdC i el transportador hENT1. **(A)** Molècula de 5fdC utilitzada en l'acoblament molecular visualitzada a PyMOL, **(B)** visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5fdC i hENT1 en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(C)** visualització propera del lligand (5fdC) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna hENT1 amb què interactua i **(D)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (formil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Val³¹⁰) mitjançant fórmules de ziga-zaga-Kekulé en perspectiva.

El nucleòsid epigenètic 5cadC interacciona amb hENT1 seguint el mateix patró de mecanisme que el que s'acaba d'exposar per 5fdC amb hENT1 també. En aquest cas, però, s'observen dues diferències significatives. La primera diferència consisteix en què 5cadC no interacciona amb un residu de valina, sinó amb un residu d'isoleucina, exactament el residu Ile¹⁹² (**Figura 111-B**). Tot i això, aquest fet no representa una diferència important donat que tant isoleucina com valina tenen igualment cadenes laterals consistents en cadenes hidrocarbonades alifàtiques completament saturades que tan sols difereixen en la constitució i la connectivitat dels seus àtoms de carboni. L'altra diferència consisteix en el mecanisme de deslocalització electrònica per ressonància del grup carboxil del nucleòsid epigenètic, que confereix una major densitat electrònica a nivell de l'àtom d'oxigen carbonílic, fet que resulta en una major predisposició dels dos parells d'electrons no enllaçants a establir punts d'hidrogen com a acceptors, tal i com succeeix en aquesta ocasió (**Figura 111-C**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5cadC a hENT1 de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G_{\min}^0 = -7,81 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 111-A**).

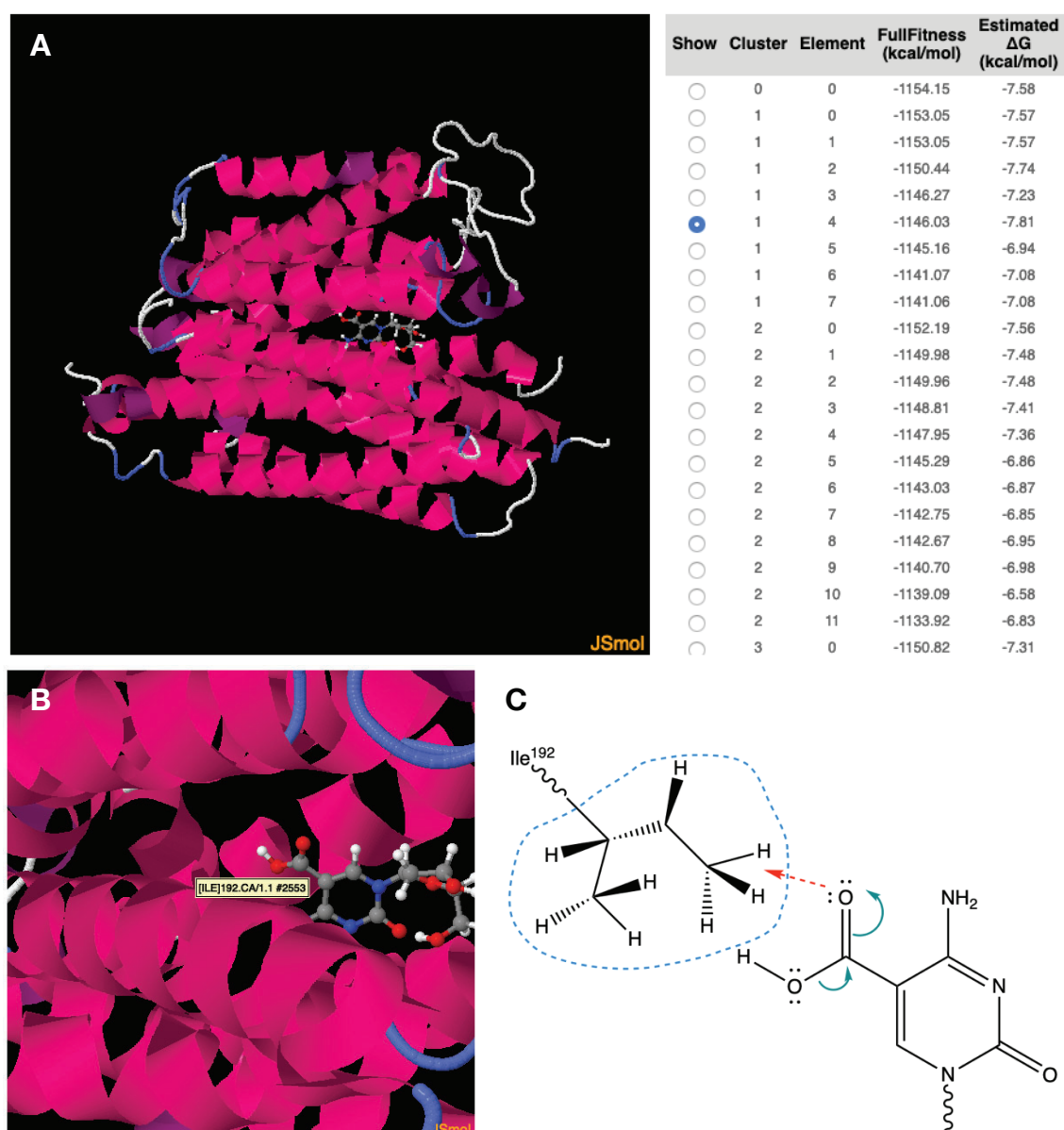


Figura 111. Acoblament molecular entre 5cadC i hENT1. Visualització del model corresponent a l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5cadC i el transportador hENT1. **(A)** Molècula de 5cadC utilitzada en l'acoblament molecular visualitzada a PyMOL, **(B)** visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5cadC i hENT1 en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(C)** visualització propera del lligand (5cadC) i de l'entorn a nivell de residu aminoacídic i d'estructura secundària de la proteïna hENT1 amb què interactua i **(D)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (carboxil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i la cadena lateral del residu aminoacídic més proper (Ile¹⁹²) mitjançant fórmules de ziga-zaga-Kekulé en perspectiva.

El nucleòsid 5hmdU interacciona amb la proteïna hENT1 a nivell de dos aminoàcids, un residu de treonina (Thr³⁴) (**Figura 112-B**) i un residu de glicina (Gly¹⁸⁴) (**Figura 112-C**). Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5cadC a hENT1 de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -7,89 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 112-A**). En aquest cas, no es vislumbra un mecanisme clar d'interacció per forces intermoleculars de Van der Waals entre el substituent de la posició 5 de 5hmdU i els residus aminoacídics

de treonina i de glicina detectats en el seu entorn espacial, donat que tots tres determinants estructurals, tot i que cadascun en la seva mesura, són potencials donadors de ponts d'hidrogen (**Figura 112–D**).

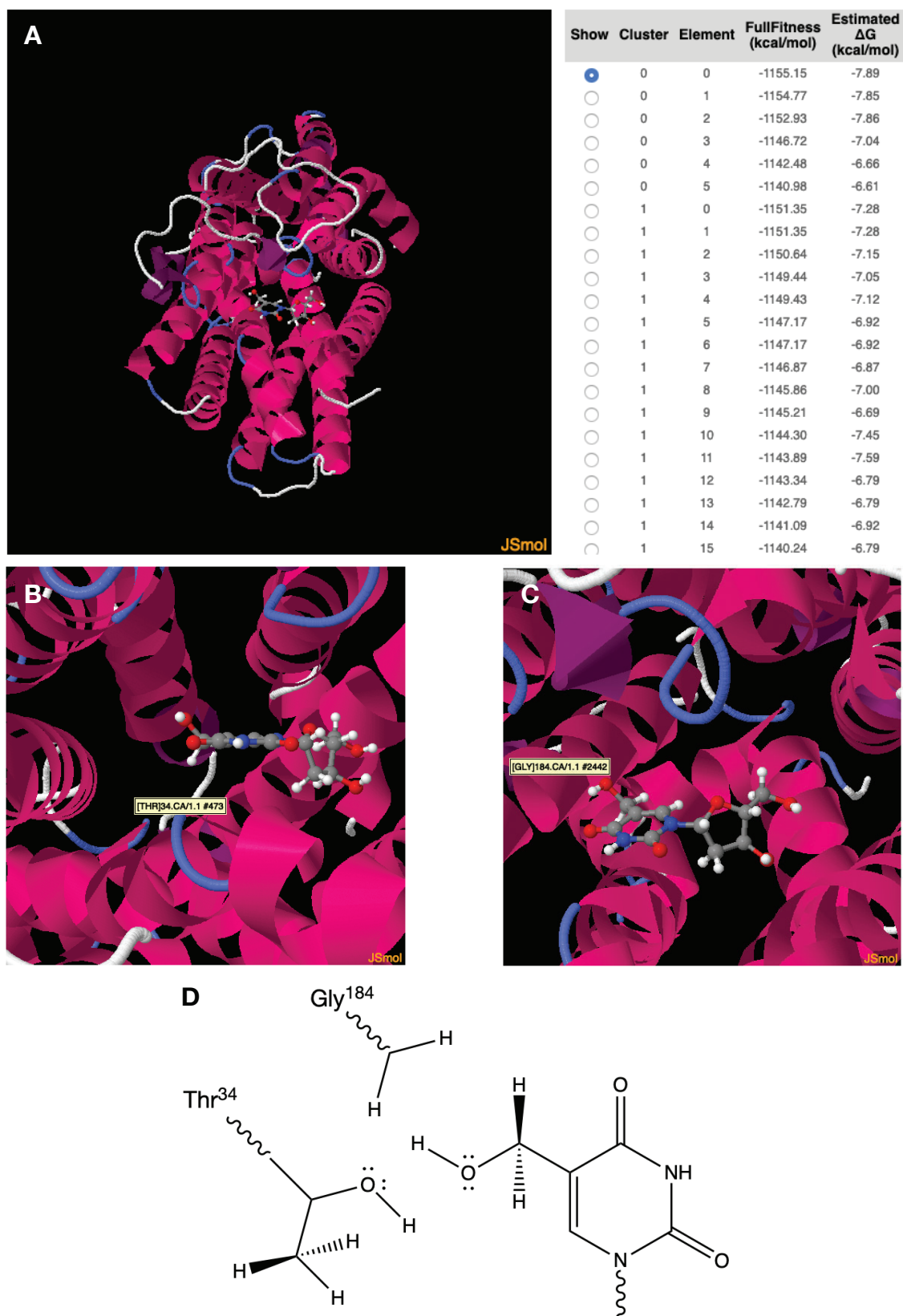


Figura 112. Acoblament molecular entre 5hmdU i hENT1. Visualització del model corresponent a l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre 5hmdU i el transportador hENT1. **(A)** Visualització global del model de l'acoblament molecular entre 5hmdU i hENT1 en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(B)** visualització propera del lligand (5hmdU) i de l'entorn a nivell del residu aminoacídic Thr³⁴ de la proteïna hENT1 amb què interactua, **(C)** visualització propera 5hmdU i de l'entorn a nivell del residu aminoacídic Gly¹⁸⁴ d'hENT1 amb què interactua i **(D)** representació orgànica a nivell de constitució, connectivitat i disposició espacial de l'entorn químic generat per la interacció entre el grup funcional de la posició 5 (hidroximetil) de l'heterocicle pirimidínic del nucleòsid i les cadenes laterals dels residus aminoacídics més propers (Thr³⁴ i Gly¹⁸⁴) mitjançant fórmules de zig-zaga–Kekulé en perspectiva.

3.3. Termodinàmica de la interacció entre els nucleòsids epigenètics i els transportadors de nucleòsids a partir d'acoblament molecular

A continuació es mostren de forma conjunta els valors d'energia lliure de Gibbs (ΔG^0) dels estats conformacionals termodinàmicament més estables i més afavorits – és a dir, els corresponents a valors mínims d'energia lliure de Gibbs (ΔG^0_{\min}) – de les interaccions dels diversos nucleòsids epigenètics amb el transportador concentratiu de nucleòsids de *Vibrio cholerae* (vcCNT) i amb el transportador equilibratiu de nucleòsids humà 1 (hENT1) a partir dels models obtinguts per acoblament molecular lligand–proteïna (**Taula 49**).

ΔG^0_{\min} (kcal mol ⁻¹)	vcCNT	hENT1
5mdC	- 7.78	- 8.30
5hmdC	- 8.15	- 8.68
5fdC	- 8.09	- 8.15
5cadC	- 8.02	- 7.81
5hmdU	- 7.79	- 7.89

Taula 49. Termodinàmica de la interacció entre els nucleòsids epigenètics i els transportadors de nucleòsids. Valors mínims d'energia lliure de Gibbs (ΔG^0_{\min}) en kcal mol⁻¹ per a cadascuna de les interaccions dels nucleòsids epigenètics 5mdC, 5hmdC, 5fdC, 5cadC i 5hmdU amb els transportadors de nucleòsids vcCNT i hENT1.

4. Interacció de ruxolitinib amb els transportadors de nucleòsids

4.1. Interacció de ruxolitinib amb els transportadors concentratius de nucleòsids

Amb l'objectiu d'estudiar la possible interacció del fàrmac ruxolitinib, en tant que un component de la seva estructura consisteix en un heterocicle aromàtic bicíclic quasi idèntic a purina – excepte per l'àtom de nitrogen de naturalesa pirròlica de la posició 9, que en el cas de ruxolitinib és substituït per un carboni sp^2 –, van dur-se a terme experiments de *cis*-inhibició de transport de nucleòsid per als diversos transportadors de nucleòsids, tant concentratius (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) com equilibratius (hENT1) (**Figures 113–115**).

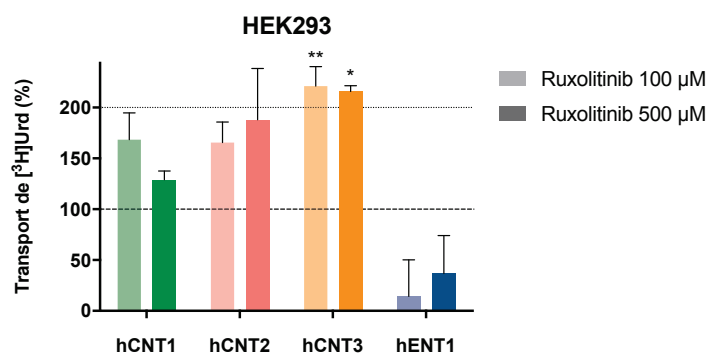


Figura 113. Interacció de ruxolitinib amb els transportadors de nucleòsids. Inhibició del transport d'uridina en presència de ruxolitinib a concentracions de 100 μM i 500 μM en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de pmol [^3H]uridina · mg $^{-1}$ proteïna · 30 s $^{-1}$ relativitzats al control en absència de ruxolitinib. Els valors mostrats corresponen exclusivament a la mesura del transport concentratiu resultant de la subtracció de la mesura del transport en medi amb presència de sodi (Na $^+$), necessari per possibilitar el transport concentratiu, i la mesura del transport equilibratiu i l'eventual unió inespecífica de substrat en medi amb absència de sodi i amb colina com a contraió per mantenir l'osmolaritat del medi. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de pmol [^3H]uridina · mg $^{-1}$ proteïna · 30 s $^{-1}$ correspon a 24,33 ± 5,15 per hCNT1; 34,99 ± 5,98 per hCNT2; 77,85 ± 13,10 per hCNT3 i 6,05 ± 1,34 per hENT1. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$ i ** $P \leq 0,01$.

4.2. Interacció de ruxolitinib amb el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1

En detectar inhibició en la translocació d'uridina a nivell del transportador hENT1 en presència de ruxolitinib en el medi, a continuació es van realitzar assaigs de *cis*-inhibició de transport d'uridina afegint un parell més de concentracions de ruxolitinib amb l'objectiu de determinar si existeix un comportament dependent de la concentració de fàrmac en quant a la inhibició del transport d'uridina i, eventualment en cas afirmatiu, extrapolar una aproximació del valor de IC $_{50}$. A més de les concentracions de ruxolitinib ja

testejades de 100 i 500 μM , van afegir-s'hi les concentracions de 10 μM i 50 μM (**Figura 114**).

En estudiar el transport d'uridina a través de hENT1 expressat a nivells basals en cèl·lules HEK293–pcDNA5 de manera endògena, els valors absoluts de picomols de substrat són molt menors als mateixos valors en avaluar processos de transport concentratiu i per aquesta raó els errors associats a aquests valors de transport equilibratiu són notablement majors en relació als valors obtinguts en si mateixos. Aquests errors traduïts als percentatges es mantenen de la mateixa forma al que s'ha comentat per a valors absoluts. No obstant, tot i tenir errors d'una dimensió considerable, els valors obtinguts sí que permeten fer-se una idea sobre el comportament cinètic de hENT1 en trobar ruxolitinib en el medi en quant a transport d'uridina es refereix. En base a les dades obtingudes, s'observa un canvi clar en la potència de la inhibició entre 50 μM i 100 μM , com si d'una espècie de llindar cinètic d'interacció entre 50 i 100 μM es tractés. A partir de 100 μM , això és 100 i 500 μM , la interacció de ruxolitinib es fa evident. En canvi, a concentracions més baixes, 10 i 50 μM , també existeix una petita baixada en la captació d'uridina per hENT1 que, tot i ser de molt baixa magnitud i amb un error experimental important – especialment a la concentració de 50 μM –, podria permetre la intuïció de, encara que realment petit, un cert efecte inhibitori de ruxolitinib al voltant d'un 20% per ambdues concentracions. A partir de la corba concentració-resposta el valor d'interacció cinètica IC_{50} extrapolat és $70,28 \pm 2,38 \mu\text{M}$ (**Figura 114**).

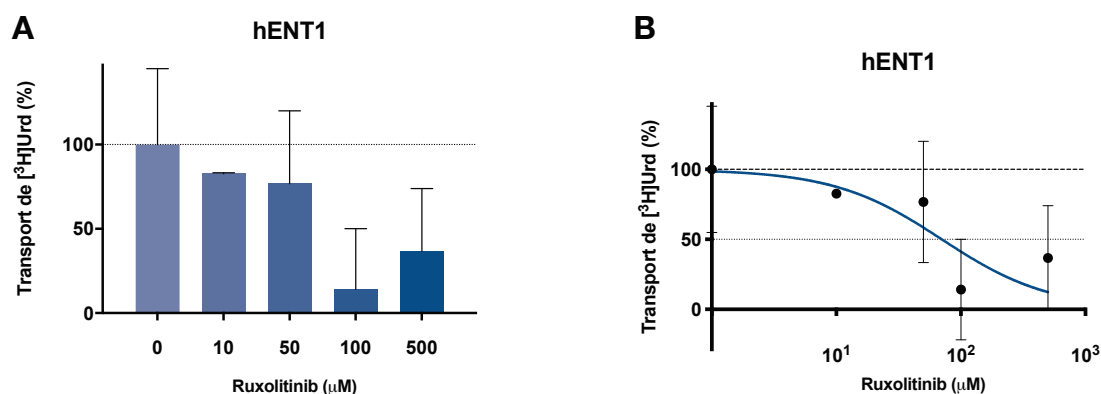


Figura 114. Interacció de ruxolitinib amb hENT1 (I). Inhibició del transport d'uridina en presència de ruxolitinib a concentracions de 10, 50, 100 i 500 μM en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de ruxolitinib. A la gràfica **A**, els percentatges estan representats en forma d'histograma. A la gràfica **B**, els valors de percentatge d'inhibició del transport d'uridina estan representats mitjançant una corba concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. En valors absoluts de transport d'uridina en termes de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{uridina} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ correspon a $6,05 \pm 1,34$ per hENT1. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No existeixen diferències estadísticament significatives.

Donat que a través de les dades obtingudes d'inhibició del transport d'uridina per ruxolitinib, sembla ser que l'únic transportador amb què interaccionaria seria hENT1, es van analitzar els valors de transport d'uridina a través d'hENT1 en cèl·lules amb expressió estable de cadascun dels transportadors concentratius; HEK293-hCNT1, HEK293-hCNT2 i HEK293-hCNT3. En interaccionar ruxolitinib preferentment amb hENT1, la mesura de transport en presència de cadascun dels transportadors concentratius sense possibilitat de completar el procés de translocació del substrat permetria extrapolar si ruxolitinib interacciona amb algun dels tres transportadors concentratius, o bé descartar totalment qualsevol possibilitat d'interacció de ruxolitinib amb cap d'ells (**Figura 115**).

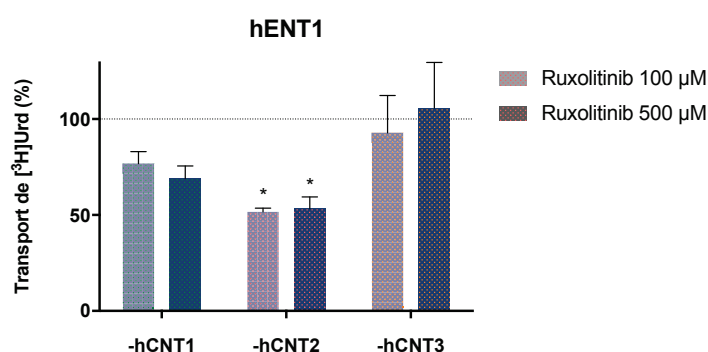


Figura 115. Interacció de ruxolitinib amb hCNT1, hCNT2, o hCNT3; i hENT1. Inhibició del transport d'uridina a través d'hENT1 en presència de ruxolitinib a concentracions de 100 μM i 500 μM en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritjada corresponen als valors de pmol [³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ relativitzats al control en absència de ruxolitinib. Els valors mostrats corresponen al transport equilibratiu sense sostreure possibles unions inespecífiques. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de pmol [³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ correspon a 15,59 ± 0,85 en cèl·lules HEK293-hCNT1; 21,88 ± 3,73 en cèl·lules HEK293-hCNT2 i 21,87 ± 2,45 en cèl·lules HEK293-hCNT3. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve expressada com * P ≤ 0,05.

4.3. Interacció de ruxolitinib amb el transportador de cations orgànics hOCT1

A més dels transportadors de nucleòsids, també es va estudiar mitjançant assaigs de transport de *cis*-inhibició la possible interacció de ruxolitinib amb el transportador de cations orgànics hOCT1, que té capacitat de translocar alguns anàlegs de nucleòsids, com lamivudina, i altres antimetabòlits d'àcids nucleics, com bendamustina. En aquest cas, van utilitzar-se 1-metil-4-fenilpiridini (MPP⁺) com a substrat i *N*-metil-*D*-glucamina (NMDG) com a medi de transport. Els experiments de transport es van realitzar en cèl·lules HEK293-hOCT1, és a dir, cèl·lules HEK293 modificades genèticament per a l'expressió estable del transportador hOCT1. La concentració de 1-metil-4-fenilpiridini (MPP⁺) utilitzada fou de 1 μM i l'activitat radioactiva de substrat marcat radioisotòpicament

($[^3\text{H}]\text{MPP}^+$) fou de $1 \mu\text{Ci mL}^{-1}$. En aquest cas el temps d'exposició al medi de transport amb el substrat i ruxolitinib a la concentració corresponent fou de 15 segons (**Figura 116**).

En cèl·lules HEK293–hOCT1 s'observa un cert grau d'inhibició en certa mesura. Per un costat, la inhibició del transport de MPP^+ resultant com a conseqüència de la presència de ruxolitinib no es podria arribar a considerar gaire significativa donat que a la major concentració utilitzada ($500 \mu\text{M}$) el grau d'inhibició ni tan sols arriba a sobrepassar el 50%. En canvi, per l'altre costat, aquest efecte inhibitori de ruxolitinib sobre el transport a través d'hOCT1, tot i ser de baixa magnitud, presenta un comportament clarament dependent de la concentració de ruxolitinib. El valor de IC_{50} de la inhibició del transport de MPP^+ a través d'hOCT1 per part de ruxolitinib va resultar ser de $512,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (**Figura 116**).

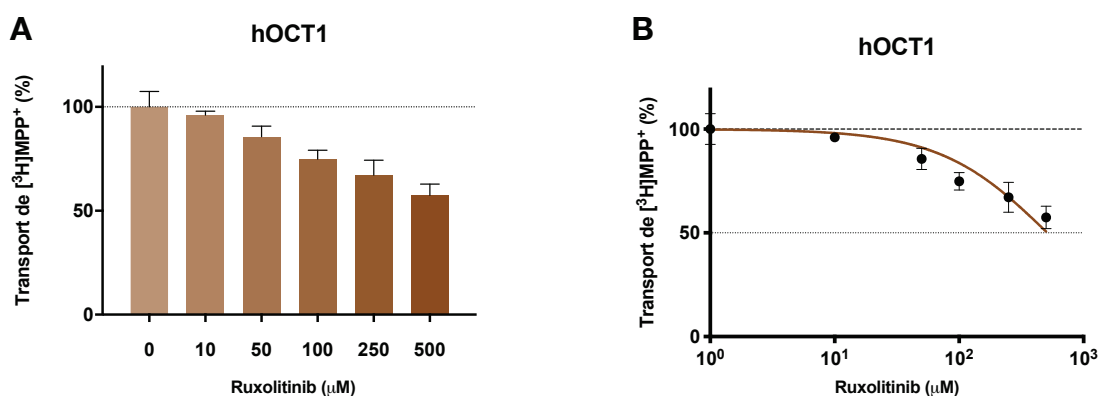


Figura 116. Interacció de ruxolitinib amb hOCT1. Inhibició del transport de 1-metil-4-fenilpiridini (MPP^+) en presència de ruxolitinib a concentracions de 10, 50, 100, 250 i $500 \mu\text{M}$ en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport de MPP^+ tritiat corresponen als valors de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{MPP}^+ \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 15 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de ruxolitinib. A la gràfica **A**, els percentatges estan representats en forma d'histograma. A la gràfica **B**, els valors de percentatge d'inhibició del transport de MPP^+ estan representats mitjançant una corba concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. En valors absoluts de transport d'uridina en termes de $\text{pmol } [^3\text{H}]\text{MPP}^+ \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 15 \text{ s}^{-1}$ correspon a $11,36 \pm 2,96$. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quadruplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No existeixen diferències estadísticament significatives.

4.4. Efecte de ruxolitinib i la seva combinació amb dipiridamol sobre el transport mitjançant pels transportadors hCNT1, hCNT3 i hENT1

Donat que el transportador amb el qual principalment semblaria interaccionar ruxolitinib en base als resultats obtinguts fins el moment era hENT1, van portar-se a terme assaigs de transport d'uridina de *cis*-inhibició en cèl·lules HEK293–pcDNA5, HEK293–hCNT1 i HEK293–hCNT3 amb ruxolitinib a una única concentració ($100 \mu\text{M}$) i amb dipiridamol $10 \mu\text{M}$, ja sigui aquest tot sol o en combinació amb ruxolitinib. A partir d'aquests experiments, es va buscar la comparació de l'efecte inhibitori sobre hENT1 de ruxolitinib amb l'efecte

d'inhibició àmpliament conegut dut a terme per dipiridamol; i a més, si fos el cas, trobar indicis de sinèrgia entre els dos fàrmacs. Aquests experiments de transport amb ruxolitinib i dipiridamol es van portar a terme en cèl·lules HEK293–pcDNA5 per estudiar l'efecte únicament sobre hENT1; i en cèl·lules HEK293–hCNT1 i HEK293–hCNT3 amb l'objectiu d'elucidar qualsevol efecte que pogués tenir lloc a nivell de transport concentratiu tant a nivell d'hCNT1 com d'hCNT3 com a conseqüència de la presència o bé de ruxolitinib o de la combinació de ruxolitinib i dipiridamol (**Figures 117–119**).

En cèl·lules HEK293–hCNT1 l'augment en la captació d'uridina degut a ruxolitinib a una concentració de 100 μM és estadísticament significativament menor a l'augment produït per dipiridamol 10 μM . En tant que és conegut que en el cas de dipiridamol l'augment en la quantitat intracel·lular d'uridina no és degut a una inducció a través del transport mitjançat per hCNT1 sinó per un acúmul intracel·lular d'uridina produït pel bloqueig d'hENT1 impedit el seu eflux, a partir d'aquests resultats es pot inferir que l'efecte de ruxolitinib en hCNT1 no seria degut a una inducció del transportador hCNT1, sinó a la inhibició d'hENT1 impedit d'aquesta manera la sortida d'uridina de la cèl·lula. Respecte a la combinació de ruxolitinib i dipiridamol, aquesta no presenta cap diferència ni amb només dipiridamol ni amb únicament ruxolitinib. Per tant, almenys en quant a l'augment de captació d'uridina en presència d'hCNT1 degut a l'acúmul de nucleòsid produït pel bloqueig del seu eflux a nivell d'hENT1, no semblaria haver-hi cap fenomen ni de sinèrgia ni de competència mútua. En quant als valors de captació d'uridina únicament a través d'hENT1 en cèl·lules HEK293–hCNT1 – és a dir, en medi de transport sense sodi i amb colina com a contraió substituït –, s'observa un petit percentatge d'inhibició a les tres condicions experimentals (dipiridamol, ruxolitinib i dipiridamol + ruxolitinib). El valor en percentatge no és molt notable en correspondre el valor de 100% de transport d'uridina del control a un nombre de picomols d'uridina ja petit de per si mateix i per aquesta raó la diferència deguda a la inhibició del transport a través d'hENT1 és petita, essent molt probablement el romanent de transport d'uridina observat corresponent a unions inespecífiques. Tot i així, i fins i tot no havent-hi diferències estadísticament significatives respecte el control, existeix cert grau d'inhibició per a totes tres condicions experimentals. En canvi, els valors són molt similars entre les tres condicions, donant a entendre que l'efecte resultant de ruxolitinib 100 μM sobre el transport d'uridina mitjançant hENT1 amb presència d'hCNT1 sense capacitat de translocació en el sistema és del mateix ordre de magnitud a l'efecte resultant de dipiridamol 10 μM . En presència d'ambdues molècules no s'observa cap diferència en l'efecte resultant en comparació amb l'ús de cap de les dues per separat (**Figura 117**).

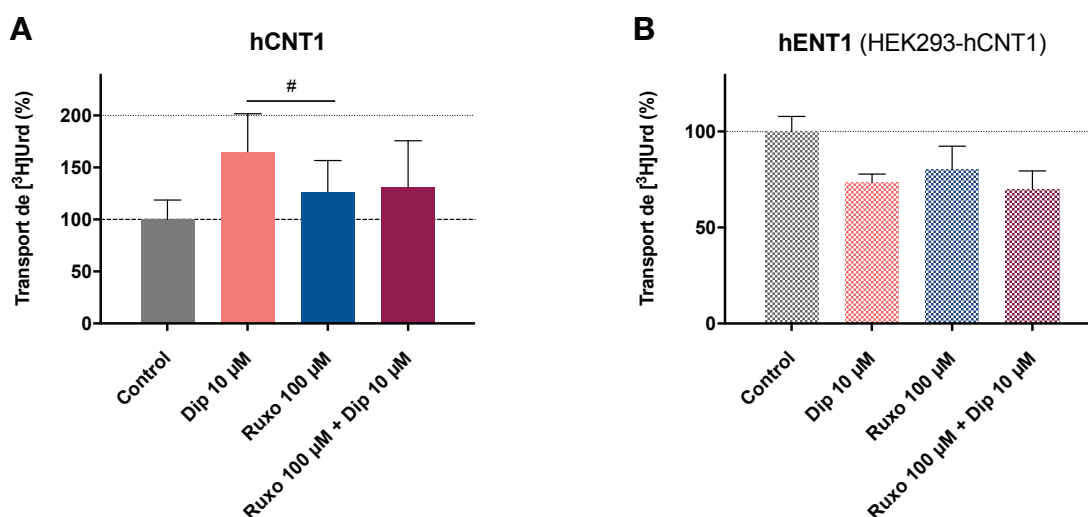


Figura 117. Interacció de ruxolitinib amb hCNT1. Inhibició del transport d'uridina en cèl·lules HEK293-hCNT1 a través d'hCNT1 (panell **A**) i hENT1 (panell **B**) en presència de dipiridamol 10 μM, ruxolitinib 100 μM o la combinació d'ambdós en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de pmol ³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ relativitzats al control en absència de ruxolitinib i dipiridamol. A la gràfica **A** es mostren els valors de transport d'uridina mitjançat per hCNT1 resultants de la resta del transport total (hCNT1 + hENT1) amb medi de transport amb ió sodi i tan sols el transport equilibratiu (hENT1) en medi de transport sense sodi i amb colina com a ió substituït. En valors absoluts de 100% de transport d'uridina en termes de pmol ³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ correspon a 29,86 ± 2,54 per hCNT1 i 18,55 ± 6,85 per hENT1. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en triplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística ve expressada com # P ≤ 0,05.

Igual que amb hCNT1, també s'observa un increment en la captació intracel·lular d'uridina a través de hCNT3 en presència tant de dipiridamol 10 μM com de ruxolitinib 100 μM i la combinació d'ambdós fàrmacs (**Figura 118**).

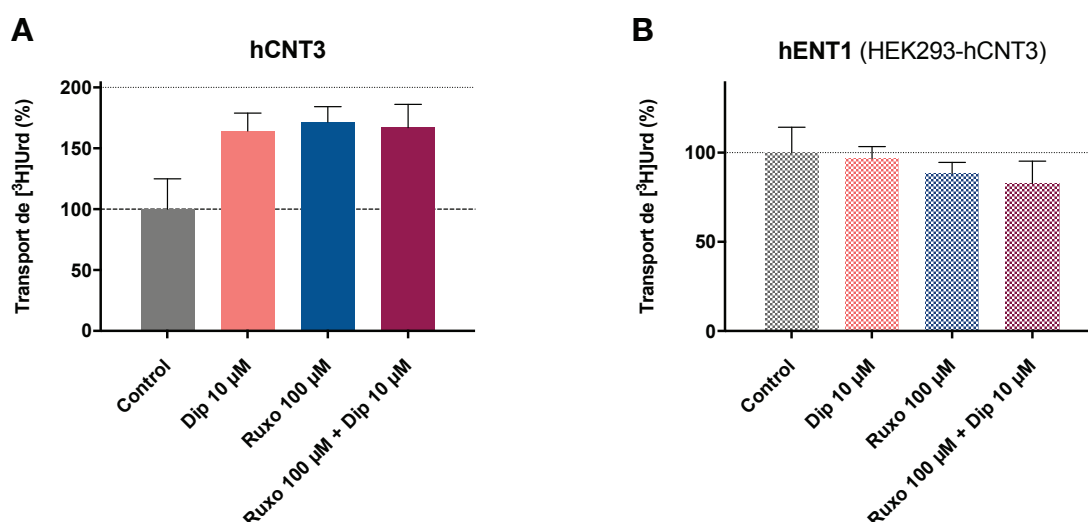


Figura 118. Interacció de ruxolitinib amb hCNT3. Inhibició del transport d'uridina en cèl·lules HEK293-hCNT3 a través d'hCNT3 (panell **A**) i hENT1 (panell **B**) en presència de dipiridamol 10 μM, ruxolitinib 100 μM o la combinació d'ambdós en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de pmol ³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ relativitzats al control en absència de ruxolitinib i dipiridamol. A la gràfica **A** es mostren els valors de transport d'uridina mitjançat per hCNT3 resultants de la resta del transport total (hCNT3 + hENT1) amb medi de transport amb ió sodi i únicament el transport equilibratiu (hENT1) en medi de transport sense sodi i amb colina com a ió substituït. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de pmol ³H]uridina · mg⁻¹ proteïna · 30 s⁻¹ correspon a

60,53 ± 20,38 per hCNT3 i 27,44 ± 8,35 per hENT1. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en triplicats. Els experiments es van portar a terme n = 6. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. No existeixen diferències estadísticament significatives.

En últim lloc, es van realitzar els mateixos assaigs de transport en cèl·lules HEK293-pcDNA5 amb l'objectiu d'avaluar l'efecte de ruxolitinib en la funció de transport d'hENT1 en comparació amb l'efecte inhibitori conegut de dipiridamol, així com per determinar l'existència d'algun fenomen de competència o sinèrgia entre ambdós en quant a la seva unió a hENT1 es refereix. En aquest cas existeix inhibició significativa del transport d'uridina mitjançat per hENT1 en presència de dipiridamol 10 µM, de ruxolitinib 100 µM i també com a resultat de l'exposició a la combinació de dipiridamol 10 µM i ruxolitinib 100 µM. Les tres condicions experimentals presenten diferències estadísticament significatives respecte el control. En el cas dels fàrmacs individuals (dipiridamol 10 µM per una banda i ruxolitinib 100 µM per l'altra), el fenomen d'inhibició és al voltant del 50%. Per a la combinació de dipiridamol 10 µM i ruxolitinib 100 µM la inhibició és lleugerament superior al 50%, situant-se en aproximadament un 70% d'inhibició. No obstant, no existeixen diferències estadísticament significatives entre ninguna de les tres condicions experimentals amb fàrmac entre elles (**Figura 119**).

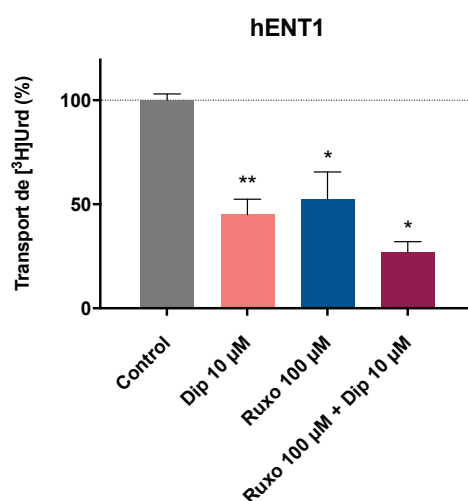


Figura 119. Interacció de ruxolitinib amb hENT1 (II). Inhibició del transport d'uridina en cèl·lules HEK293-pcDNA5 a través d'hENT1 en presència de dipiridamol 10 µM, ruxolitinib 100 µM o la combinació d'ambdós en el medi de transport. Els valors de percentatge de transport d'uridina tritiada corresponen als valors de pmol $^3\text{H}[\text{Urd}] \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ relativitzats al control en absència de ruxolitinib i dipiridamol. En valors absoluts el 100% de transport d'uridina en termes de pmol $^3\text{H}[\text{Urd}] \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïna} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$ correspon a 28,10 ± 5,38. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en triplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana ± error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada amb el símbol * per diferències entre qualsevol de les tres condicions experimentals amb algun dels dos fàrmacs o els dos respecte el control. La significació estadística està expressada com * $P \leq 0,05$ i ** $P \leq 0,01$.

5. Efecte de ruxolitinib en combinació amb altres fàrmacs anàlegs de nucleòsids

Una vegada comprovat i confirmat l'efecte inhibitori de ruxolitinib sobre el transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1, es van dissenyar experiments de viabilitat cel·lular amb ruxolitinib en combinació amb gemcitabina. Es va escollir gemcitabina com a fàrmac a utilitzar a les combinacions amb ruxolitinib en tant que gemcitabina es tracta d'un anàleg de nucleòsid la biodisponibilitat i l'accés a la cèl·lula del qual depenen tant de transportadors concentratius, hCNT1 i hCNT3, com de transportadors equilibratius, hENT1. Es van portar a terme assaigs de viabilitat cel·lular amb concentracions creixents de gemcitabina (0,1 – 10 μM) i absència o presència d'una concentració fixa de ruxolitinib (100 μM). Aquests experiments de citotoxicitat foren realitzats en cèl·lules HEK293–pcDNA5, HEK293–hCNT1 i HEK293–hCNT3 (**Figures 120–124**).

En cèl·lules HEK293–pcDNA5, en què l'únic transportador de nucleòsids present és hENT1, la presència de ruxolitinib confereix resistència al tractament amb gemcitabina. Aquest fenomen de resistència a gemcitabina és manifest a concentracions de gemcitabina de 0,5 μM i 1 μM . Una concentració de gemcitabina de 0,1 μM és encara massa petita i no produeix cap efecte sobre la viabilitat cel·lular. Per tant, a aquesta concentració qualsevol possible efecte de ruxolitinib sobre gemcitabina no seria detectable. A l'altre extrem, a concentracions de 5 i 10 μM de gemcitabina, l'efecte ja és molt pronunciat i la mort cel·lular és pràcticament del 100% tant amb ruxolitinib com sense aquest. A concentracions intermèdies de gemcitabina de 0,5 i 1 μM ; ruxolitinib 100 μM atenua l'efecte citotòxic de gemcitabina. Donat que en aquest cas hENT1 és l'únic mecanisme d'entrada a la cèl·lula disponible per a gemcitabina, ruxolitinib inhibeix la translocació de gemcitabina mitjançada per hENT1, reduint d'aquesta manera el seu accés al citoplasma i disminuint, per tant, el seu efecte farmacològic. Els valors de IC_{50} per gemcitabina en cèl·lules HEK293–pcDNA5 foren $0,64 \pm 0,001 \mu\text{M}$ per a la condició control i $2,04 \pm 0,001 \mu\text{M}$ per a la condició amb ruxolitinib 100 μM (**Figura 120**).

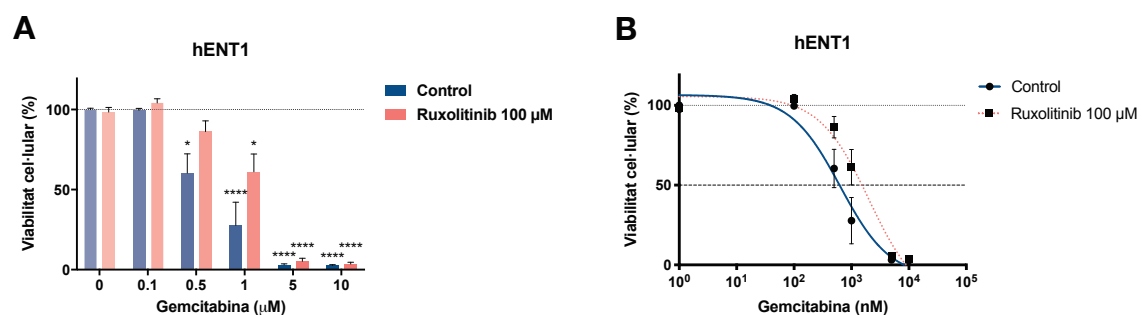


Figura 120. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hENT1. Viabilitat cel·lular de cèl·lules HEK293–pcDNA5 després del tractament

amb concentracions creixents de gemcitabina (0,1 – 10 μM) i ruxolitinib 100 μM . Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de gemcitabina (0,1 – 10 μM) i el seu control respectiu (control o ruxolitinib 100 μM) (0 μM). La significació estadística ve expressada com * $P \leq 0,05$; i **** $P \leq 0,0001$.

En cèl·lules HEK293–hCNT1 tot just no s'aprecia diferència de l'efecte farmacològic de gemcitabina com a conseqüència de la presència de ruxolitinib 100 μM a cap de les concentracions de gemcitabina. Tot i així, a concentracions de gemcitabina de 0,5, 1 i 5 μM s'intueix una lleugeríssima disminució en la viabilitat cel·lular a la condició amb ruxolitinib respecte el control. Aquest fet es nota fins i tot lleugerament més quan la concentració de gemcitabina és 5 μM . En analitzar les corbes concentració-resposta es pot observar un petit desplaçament cap a l'esquerra de la corba amb ruxolitinib. Els valors de IC_{50} obtinguts per a gemcitabina en cèl·lules HEK293–hCNT1 foren $9,63 \pm 1,25 \mu\text{M}$ per a la condició control; i $4,94 \pm 1,29 \mu\text{M}$ per a la condició amb ruxolitinib 100 μM (**Figura 121**).

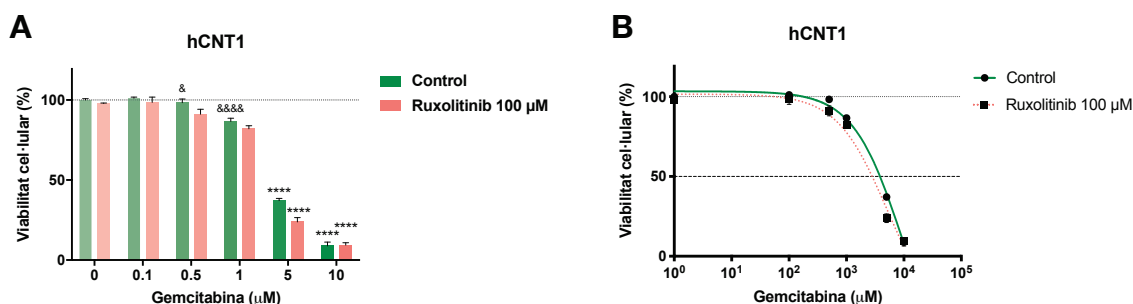


Figura 121. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hCNT1. Viabilitat cel·lular de cèl·lules HEK293–hCNT1 després del tractament amb concentracions creixents de gemcitabina (0,1 – 10 μM) i ruxolitinib 100 μM . Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de gemcitabina (0,1 – 10 μM) i el seu control respectiu (control o ruxolitinib 100 μM) (0 μM); i amb el símbol & per diferències respecte a la mateixa condició en cèl·lules HEK293–pcDNA5. La significació estadística ve expressada com & $P \leq 0,05$; **** $P \leq 0,0001$ i &&&& $P \leq 0,0001$.

En cèl·lules HEK293–hCNT3 s'observa exactament el fenomen contrari al que té lloc en cèl·lules HEK293–pcDNA5 amb hCNT1 com únic transportador disponible per gemcitabina. És a dir, amb hCNT3 té lloc el mateix efecte sensibilitzador per part de ruxolitinib sobre l'efecte que gemcitabina exerceix sobre les cèl·lules que s'intueix mínimament amb hCNT1, però de forma molt més intensa i amb valors de modulació de l'efecte de gemcitabina per part de

ruxolitinib molt importants i clarament detectables. Aquesta conjuntura probablement sigui deguda a la major eficiència i capacitat de translocació de hCNT3 en comparació amb hCNT1. Amb hCNT3 s'observen diferències importants de viabilitat cel·lular a concentracions de gemcitabina de 0,5; 1 i 5 μM ; essent estadísticament significatives en 1 μM . La corba concentració-resposta amb ruxolitinib 100 μM està notablement desplaçada cap a l'esquerra respecte la corba control. Les constants de IC_{50} per a gemcitabina en cèl·lules HEK293-hCNT3 foren $4,59 \pm 0,002 \mu\text{M}$ per a la condició control; i $0,54 \pm 0,002 \mu\text{M}$ per a la condició amb ruxolitinib 100 μM (**Figura 122**).

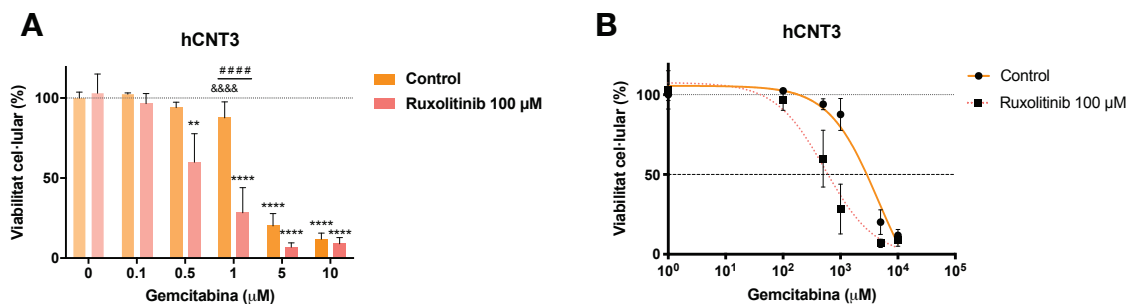


Figura 122. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hCNT3. Viabilitat cel·lular de cèl·lules HEK293-hCNT3 després del tractament amb concentracions creixents de gemcitabina (0,1 – 10 μM) i ruxolitinib 100 μM . Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. A la gràfica **A** els percentatges venen representats en forma d'histograma. A la gràfica **B** les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està representada mitjançant el símbol * per diferències entre cada concentració de gemcitabina (0,1 – 10 μM) i el seu control respectiu (control o ruxolitinib 100 μM) (0 μM); amb el símbol # per diferències entre la condició control i la condició amb ruxolitinib 100 μM , i el símbol & per diferències respecte la mateixa condició en cèl·lules HEK293-pcDNA5. La significació estadística ve expressada com ** $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$; ##### $P \leq 0,0001$ i &&&& $P \leq 0,0001$.

En aquesta figura es representen les mateixes dades exposades a les figures 120–122 disposades en corbes sigmoïdals concentració-resposta i disposant les dades en dues gràfiques en què en una es compara l'efecte de gemcitabina sobre la viabilitat cel·lular en la condició control entre els tres transportadors (hENT1, hCNT1 i hCNT3) i a l'altra es comparen els efectes per als tres transportadors en la condició amb ruxolitinib 100 μM . A la gràfica de l'esquerra, la corresponent a la condició control, gemcitabina és més eficaç en cèl·lules HEK293-pcDNA5 en què l'únic transportador disponible és hENT1. En cèl·lules HEK293-hCNT1 i HEK293-hCNT3 les cèl·lules són més resistents a gemcitabina en conviure simultàniament un mecanisme d'entrada (hCNT1 o hCNT3) i un mecanisme d'eflux (hENT1). En canvi, a la gràfica de la dreta, amb ruxolitinib 100 μM , la corba de hENT1 és desplaçada cap a la dreta respecte a la gràfica anterior en estar l'entrada de gemcitabina per hENT1 inhibida; i la corba d'hCNT3 és desplaçada en sentit contrari donat que el mecanisme d'eflux portat a terme per hENT1 ha deixat de funcionar. De fet, les corbes d'hCNT3

amb ruxolitinib 100 μM i hENT1 control són pràcticament coincidents. Posant el focus a les constants de IC_{50} aquest fet es confirma completament, donat que ambdós valors són pràcticament idèntics: $0,64 \pm 0,001 \mu\text{M}$ per hENT1–control; i $0,54 \pm 0,002 \mu\text{M}$ per hCNT3–ruxolitinib (**Figura 123**).

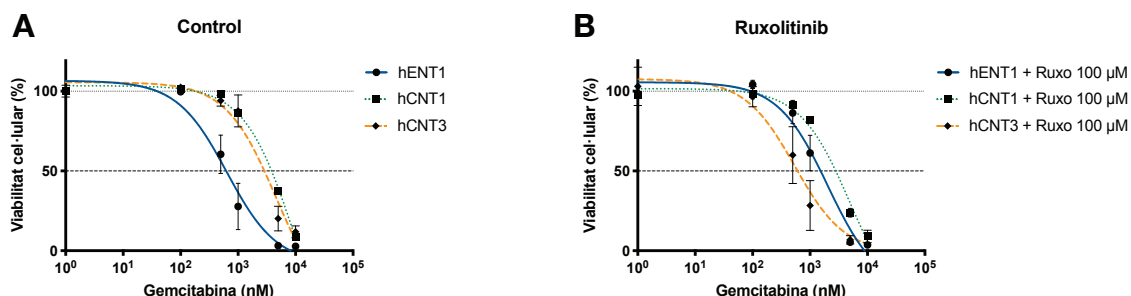


Figura 123. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hENT1, hCNT1 i hCNT3. Viabilitat cel·lular de cèl·lules HEK293-pcDNA5 (hENT1), HEK293-hCNT1 i HEK293-hCNT3 després del tractament amb concentracions creixents de gemcitabina (0,1 – 10 μM) (panell **A**) i ruxolitinib 100 μM (panell **B**). Els valors de viabilitat cel·lular venen representats en forma de percentatge en relació al control. En ambdues gràfiques les dades estan representades en forma de corbes concentració-resposta amb l'eix de les concentracions en escala logarítmica. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme $n = 3$.

Un cop obtingudes conclusions sobre la modulació que ruxolitinib té capacitat d'exercir sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell d'hENT1 i les seves implicacions amb altres transportadors com, sobretot, hCNT3; es van realitzar experiments de viabilitat cel·lular a més d'amb gemcitabina i ruxolitinib, amb dipiridamol. Es va avaluar la viabilitat cel·lular en resposta a les diferents possibles combinacions de dos fàrmacs (ruxolitinib + dipiridamol, ruxolitinib + gemcitabina, i gemcitabina + dipiridamol) i també en resposta a la combinació triple (ruxolitinib + gemcitabina + dipiridamol). En aquest cas, no es van utilitzar diferents concentracions de gemcitabina, sinó que es va treballar amb una concentració fixa per a cadascun dels fàrmacs. Les concentracions utilitzades foren les següents: 100 μM per a ruxolitinib, 1 μM per a gemcitabina i 10 μM per a dipiridamol. En base a aquests experiments es va buscar confirmar les observacions realitzades als experiments anteriors i confirmar el mecanisme proposat per a ruxolitinib basat únicament en la inhibició d'hENT1. En cèl·lules HEK293-pcDNA5, amb hENT1 com únic transportador de nucleòsids, el tractament únicament amb dipiridamol 10 μM o ruxolitinib 100 μM no té cap efecte sobre la viabilitat cel·lular per si mateix. L'efecte de gemcitabina és l'esperable en quant a mort cel·lular es refereix. La combinació de gemcitabina 1 μM tant amb dipiridamol 10 μM com amb ruxolitinib 100 μM cursa amb una reversió completa, en el primer cas, i atenuació, en el segon, de l'efecte citotòxic de gemcitabina. La combinació de gemcitabina amb ambdós inhibidors dona lloc al mateix efecte al que s'observa únicament amb dipiridamol. En cèl·lules HEK293-hCNT3, en canvi, s'observa un patró de viabilitats cel·lulars totalment diferent al que s'observa en cèl·lules HEK293-

pcDNA5 (hENT1). En cèl·lules amb hCNT3 i hENT1, el tractament únicament amb gemcitabina 1 μM no dona lloc a mort cel·lular donat que tan aviat com gemcitabina entra per hCNT3, és expulsada per hENT1. Per aquesta mateixa raó, quan es combina gemcitabina tant amb dipiridamol com amb ruxolitinib, l'efecte citotòxic de gemcitabina es fa patent de forma dramàtica, arribant a valors de mort cel·lular clarament superiors en els tres casos (a les combinacions amb ruxolitinib i amb dipiridamol, i la combinació d'ambdós). Tant en hENT1 (panell **A**) com en hCNT3 (panell **B**) l'efecte de ruxolitinib 100 μM sobre gemcitabina és d'una intensitat menor a l'efecte exercit per dipiridamol. En ambdós casos no s'aprecia *a priori* cap indicatiu de possible sinèrgia a la combinació triple (**Figura 124**).

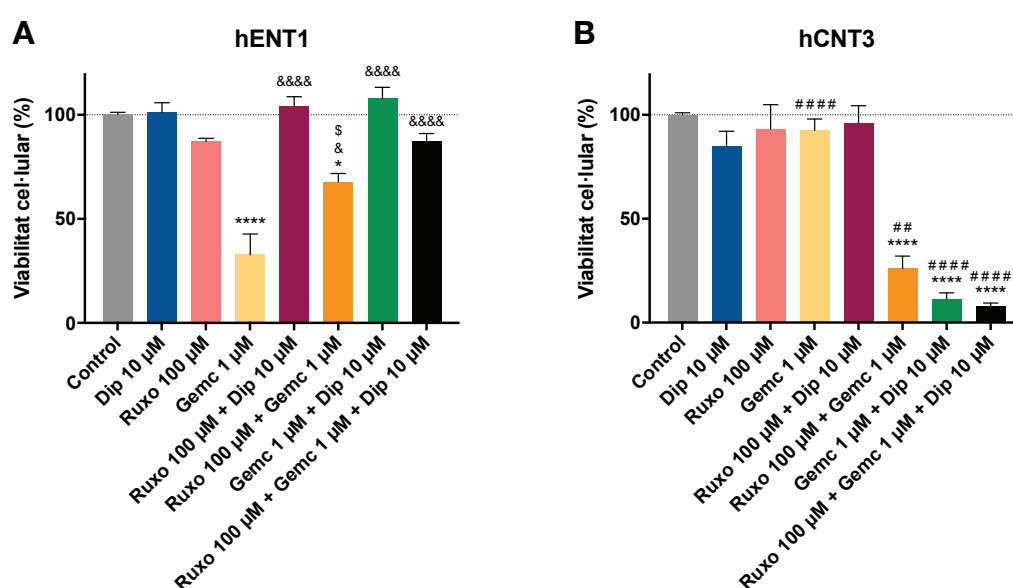


Figura 124. Efecte modulador de ruxolitinib sobre l'efecte farmacològic de gemcitabina a nivell de la seva translocació per hENT1 i/o hCNT3. Viabilitat cel·lular de cèl·lules HEK293-pcDNA5 (hENT1, panell **A**) i HEK293-hCNT3 (hCNT3, panell **B**) després del tractament amb dipiridamol 10 μM , ruxolitinib 100 μM , gemcitabina 1 μM i les seves combinacions. Els valors de viabilitat cel·lular estan representats en forma de percentatge en relació al control. Les rèpliques experimentals a cada experiment independent es van realitzar en quintuplicats. Els experiments es van portar a terme n = 3. Els valors mostrats corresponen a la mitjana \pm error estàndard. L'anàlisi estadística es va desenvolupar mitjançant la prova ANOVA unidireccional de comparacions múltiples de Tukey. La significació estadística està expressada amb el símbol * per diferències en relació al control; el símbol # per diferències amb hENT1; el símbol & per diferències en relació al tractament amb només gemcitabina; i el símbol \$ per diferències respecte el tractament únicament amb ruxolitinib. La significació estadística està expressada com * $P \leq 0,05$; & $P \leq 0,05$; \$ $P \leq 0,05$; # $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$ i #### $P \leq 0,0001$.

6. Modelatge de ruxolitinib amb els transportadors de nucleòsids per acoblament molecular (*molecular docking*)

Es van realitzar simulacions d'acoblament molecular del fàrmac ruxolitinib amb els transportadors de nucleòsids, el concentratiu de *Vibrio cholerae* (vcCNT) i l'equilibratiu 1 d'humans (hENT1). La molècula de ruxolitinib utilitzada com a lligand es va obtenir a partir de l'estructura **4U5J** en què ruxolitinib es troba complexat amb la proteïna c-Src. La molècula de ruxolitinib utilitzada per a l'acoblament molecular es mostra a la **Figura 125**.

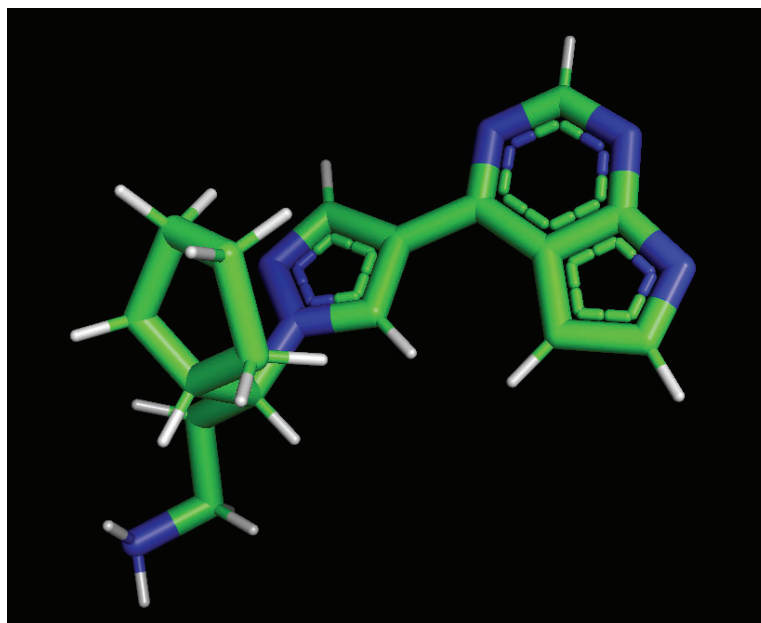


Figura 125. Molècula de ruxolitinib. Molècula del fàrmac ruxolitinib aïllada a partir de l'estructura **4U5J** en què es troba complexat amb c-Src visualitzada mitjançant PyMOL.

6.1. Acoblament molecular de ruxolitinib amb el transportador concentratiu de nucleòsids de *Vibrio cholerae* (vcCNT)

En el model que es presenta a continuació es mostra la no-interacció de ruxolitinib amb el transportador concentratiu de nucleòsids vcCNT. Es mostra el model obtingut a títol il·lustratiu en què s'aprecia com ruxolitinib queda fora de l'estructura de vcCNT. Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5cadC a hENT1 de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -6,79 \text{ kcal mol}^{-1}$ (**Figura 126**).

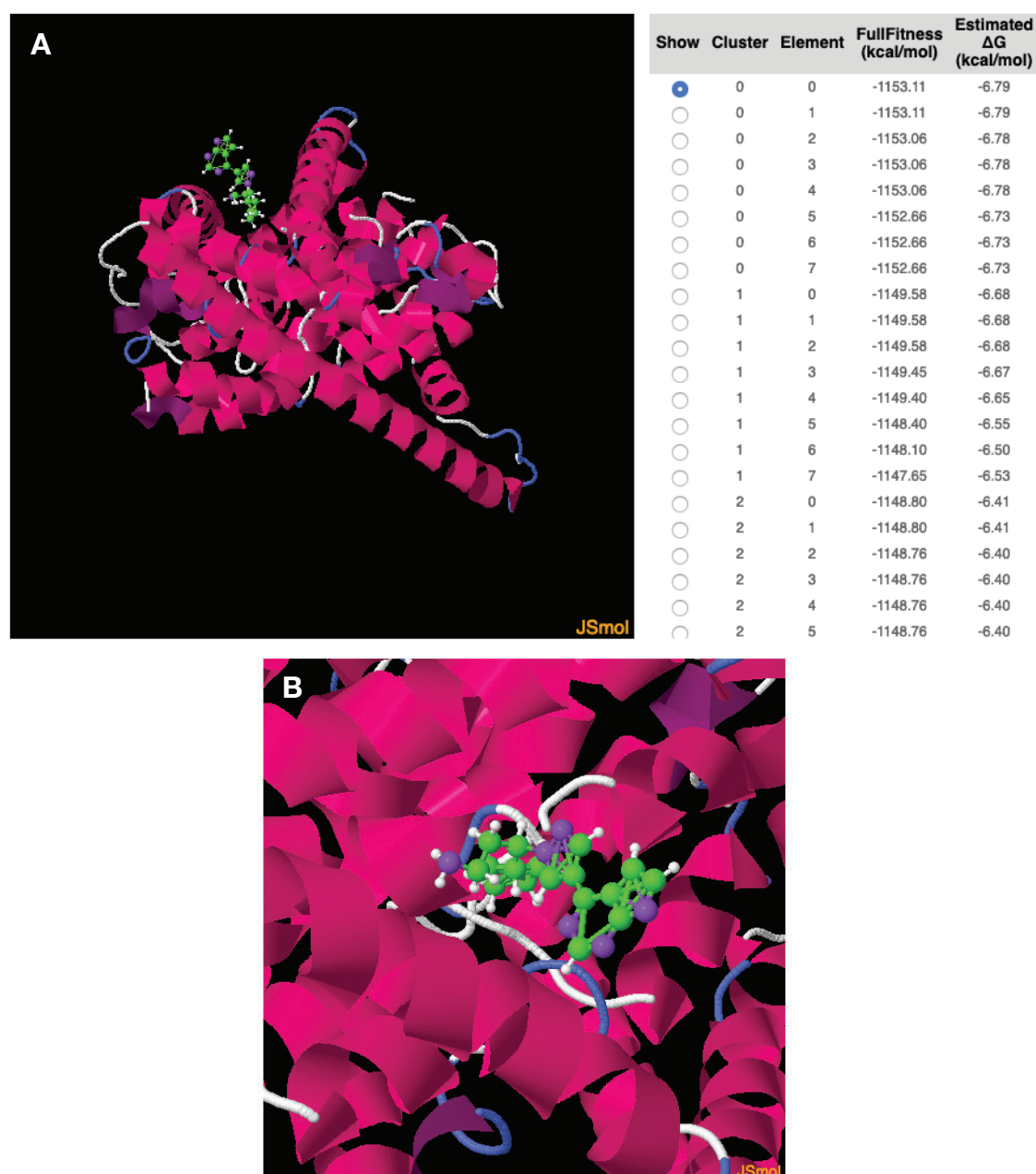


Figura 126. Acoblament molecular entre ruxolitinib i vcCNT. Visualització del model corresponent a l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre ruxolitinib i el transportador vcCNT. **(A)** Visualització global del model de l'acoblament molecular entre ruxolitinib i vcCNT en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(B)** visualització propera del lligand (ruxolitinib) i de l'entorn més proper de vcCNT a nivell d'estructura secundària.

6.2. Acoblament molecular de ruxolitinib amb el transportador equilibratiu de nucleòsids 1 humà (hENT1)

A diferència del que succeeix amb vcCNT, ruxolitinib sí que interactua amb el transportador hENT1, encara que ho faci envers dominis d'una part externa de la proteïna. Es pot concloure això a partir dels valors d'energia lliure de Gibbs obtinguts per als múltiples conformers que són sensiblement inferiors

als obtinguts per a vcCNT, al voltant d'aproximadament 1 kcal de diferència. Es mostra l'estat conformacional de l'acoblament molecular de 5cadC a hENT1 de menor energia lliure de Gibbs (ΔG^0) que en aquest cas és $\Delta G^0_{\min} = -7,77$ kcal mol⁻¹ (**Figura 127**).

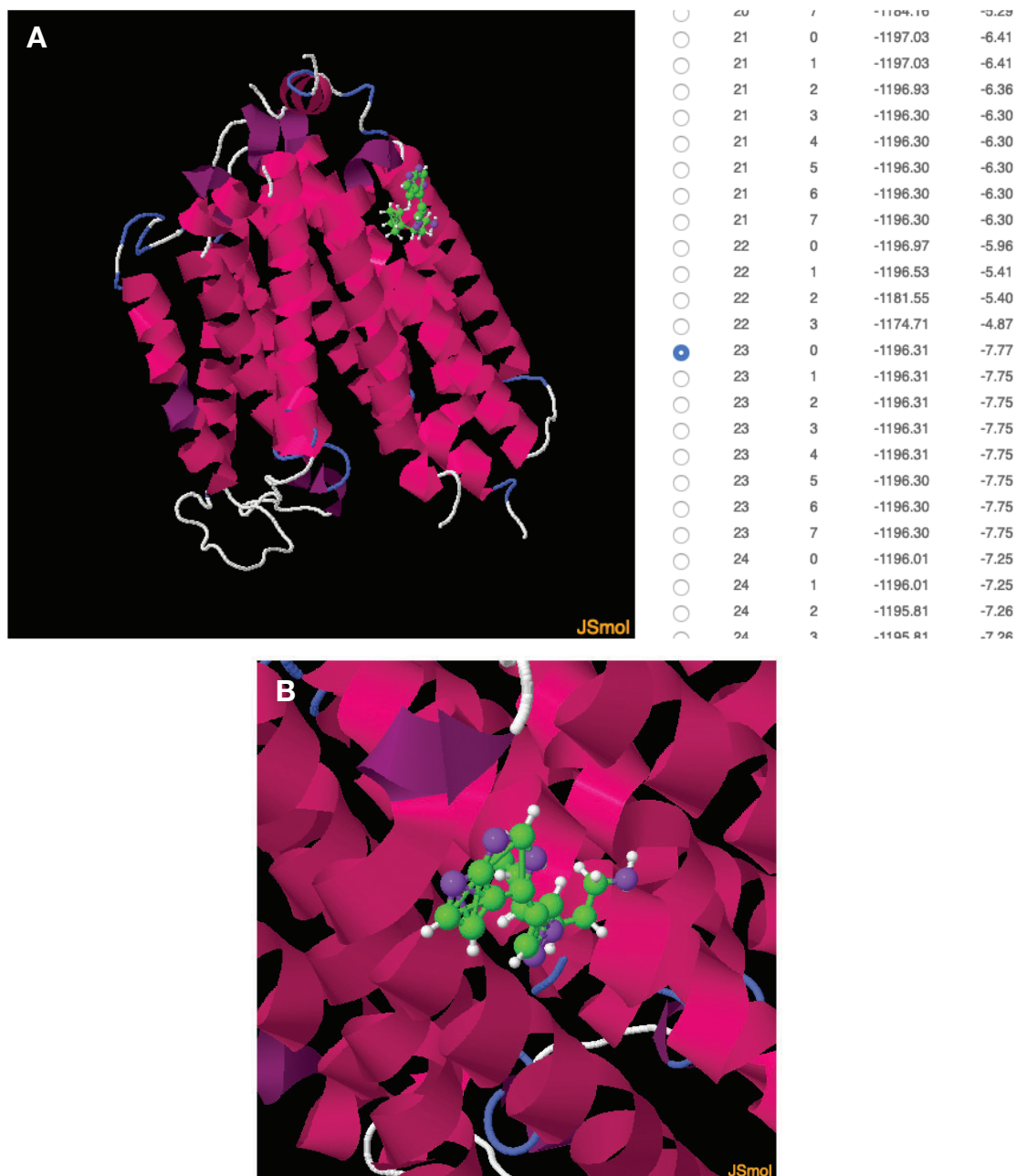


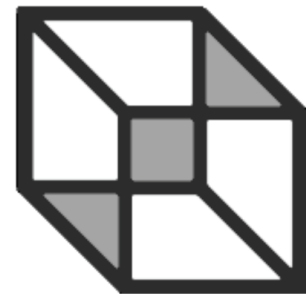
Figura 127. Acoblament molecular entre ruxolitinib i hENT1. Visualització del model corresponent a l'estat conformacional més estable termodinàmicament a partir de l'acoblament molecular entre ruxolitinib i el transportador hENT1. **(A)** Visualització global del model de l'acoblament molecular entre ruxolitinib i hENT1 en la conformació de mínima energia lliure de Gibbs, **(B)** visualització propera del lligand (ruxolitinib) i de l'entorn més proper de hENT1 a nivell d'estructura secundària.

6.3. Termodinàmica de la interacció entre ruxolitinib i els transportadors de nucleòsids a partir d'acoblament molecular

A continuació es mostren de forma conjunta els valors d'energia lliure de Gibbs (ΔG^0) dels estats conformacionals termodinàmicament més estables i més afavorits – és a dir, els corresponents a valors mínims d'energia lliure de Gibbs (ΔG^0_{\min}) – de les interaccions de ruxolitinib amb el transportador concentratiu de nucleòsids de *Vibrio cholerae* (vcCNT) i amb el transportador equilibratiu de nucleòsids humà 1 (hENT1) a partir dels models obtinguts per acoblament molecular lligand–proteïna (**Taula 50**).

ΔG^0_{\min} (kcal mol ⁻¹)	vcCNT	hENT1
ruxolitinib	- 6.79	- 7.77

Taula 50. Termodinàmica de la interacció entre ruxolitinib i els transportadors de nucleòsids. Valors mínims d'energia lliure de Gibbs (ΔG^0_{\min}) en kcal mol⁻¹ per a cadascuna de les interaccions de ruxolitinib amb els transportadors vcCNT i hENT1.



Discussió

Discussió

En base als resultats obtinguts en aquest treball pel que fa a la interacció entre els nucleòsids naturals no canònics o modificats epigenèticament, també denominats “nucleòsids epigenètics” (Zauri *et al.*, 2015), amb els transportadors de nucleòsids, tot semblaria indicar que la naturalesa química de l'entorn general al voltant de la posició 4 de la nucleobase pirimidínica, en quant a densitat electrònica es refereix, és rellevant en el reconeixement del nucleòsid per part del transportador. En aquest punt, és raonable pensar que, si el grup funcional de la posició 4 de la pirimidina es comporta com a donador de ponts d'hidrogen (grup amino, concretament d'anilina, com es dona en el cas dels nucleòsids de citosina), la interacció amb el transportador es veu facilitada (**Figura 44A–C**); per altra banda, si el grup funcional en aquesta mateixa posició es comporta com un acceptor de ponts d'hidrogen (grup cetona, com és el cas dels nucleòsids d'uracil), el reconeixement per part del transportador es veu dificultat (**Figura 44D**). Això porta a pensar que la part estructural del lloc de reconeixement dels transportadors hCNT1 i hCNT3 per la pirimidina del nucleòsid probablement consti d'algun residu aminoacídic amb una cadena lateral que es comportaria més aviat com un acceptor de ponts d'hidrogen que no pas com un donador (Arimany-Nardi *et al.*, 2017). A més, no només la posició 4 sembla ser important en la interacció entre nucleòsid i transportador, sinó que a més el substituent present a la posició 5 de la pirimidina sembla ser igualment essencial en la capacitat de reconeixement del nucleòsid per part del transportador. D'aquesta manera, s'observa el mateix ordre d'afinitats en funció del substituent a la posició 5 tant en el cas d'hCNT1 (**Figura 46**) com el d'hCNT3 (**Figura 47**) (**Taula 48**) (Pastor-Anglada *et al.*, 2018). En tant que el substituent en aquesta posició es tracti d'un grup formil la interacció es veu clarament potenciada. Per tant, la manera en com afecta el comportament químic del substituent de la posició 5 de la pirimidina és similar al fenomen que succeeix amb el grup funcional de la posició 4 de la nucleobase, encara que, en aquest cas, en sentit contrari. En el cas del substituent a la posició 5, si el grup funcional es comporta com a acceptor de ponts d'hidrogen, com és el cas del grup formil (concretament a nivell dels dos parells d'electrons no enllaçants de l'àtom d'oxigen), la interacció es veu facilitada (**Figures 46C i 47C**). En canvi, si aquest grup funcional actua com a donador de ponts d'hidrogen, com succeeix en el cas del grup hidroximetil (particularment l'hidrogen que forma part del grup hidroxil), la capacitat de reconeixement del transportador pel nucleòsid es veu perjudicada (**Figures 46B i 47B**). Adoptant una perspectiva més general, és possible que els nucleòsids naturals

modificats epigenèticament, efectivament, siguin reconeguts per alguns dels transportadors concentratius de nucleòsids (**Figures 38, 41 i 44**). A més, també és possible plantejar tant el fet que els transportadors concentratius que interaccionen amb ells són els que podria esperar-se en un principi en base a l'especificitat de nucleobase que presenten els diversos transportadors de nucleòsids, com que els diferents ordres de magnitud d'afinitat d'aquests transportadors per aquests compostos també són els que podria esperar-se d'entrada en base a les diverses afinitats que presenten ambdós transportadors pels nucleòsids endògens canònics (**Young et al., 2013**). Els diferents determinants estructurals presents en els diversos nucleòsids epigenètics estudiats permeten obtenir almenys una idea sobre les característiques fonamentals de la naturalesa de l'entorn químic del lloc de reconeixement dels transportadors concentratius de nucleòsids. En el cas d'hCNT2, les consideracions que es deriven dels resultats obtinguts en quant a la interacció dels nucleòsids epigenètics amb aquest transportador són, en part, el que podria arribar a esperar-se i, per un altre costat, força curioses en el cas d'algun dels nucleòsids en concret, particularment 5fdC (**Figures 38C i 41**). Per als nucleòsids 5mdC, 5hmdC i 5hmdU la forma en com no es veu alterat el transport d'uridina a través d'hCNT2 té lloc segons el que s'esperaria sobretot per als nucleòsids de citidina 5mdC i 5hmdC i no tant per al d'uridina 5hmdU (**Figures 38C i 41**).

Pel que respecta al reconeixement molecular dels nucleòsids epigenètics per part del transportador hENT1, el grup funcional de la posició 4 de la pirimidina també té rellevància en la interacció. Això portaria a pensar que la presència a la posició 4 d'un grup funcional anilina, el cas de 5hmdC, un donador de ponts d'hidrogen, no afavoreix el reconeixement de la molècula per part del transportador. En canvi, aquestes mateixes dades suggereixen que una cetona a la posició 4, com en el cas de 5hmdU, podria ser important en la interacció del nucleòsid amb hENT1. Això s'explica també per la diferència d'afinitat d'hENT1 pels nucleòsids canònics respectius, uridina i citidina (**Pastor-Anglada et al., 2018**). Mentre que per uridina hENT1 presenta una constant d'afinitat $K_M = 240 \mu\text{M}$, per citidina presenta una afinitat molt menor, $K_M = 580 \mu\text{M}$. Aquestes afirmacions explicarien que no s'observin canvis amb 5hmdC, però sí amb 5hmdU, encara que aquests siguin diferents segons la concentració en el cas de l'últim (**Figura 39**). La disparitat d'efectes respecte la translocació de substrat de forma dependent amb la concentració podria atribuir-se a dos factors: el primer, degut a la variació del gradient de concentració de nucleòsid entre el medi intracel·lular i el medi extracel·lular en introduir un nucleòsid estructuralment molt semblant al mateix substrat, prenent aquest factor una especial rellevància en tractar-se de transport

equilibratiu; i el segon, el que es deuria a la competència entre els dos nucleòsids d'uridina entre ells mateixos, uridina i 5hmdU. D'aquesta forma, cobraria sentit la hipòtesi que en afegir una concentració més baixa de 5hmdU (100 μ M) augmenta considerablement el transport d'uridina degut a l'augment de la concentració extracel·lular de nucleòsids d'uridina en el seu conjunt (és a dir, uridina i 5hmdU conjuntament). En tenir major afinitat el mateix substrat, uridina, que l'inhibidor, 5hmdU, el que succeeix en lloc d'una inhibició del transport d'uridina a través d'hENT1 per un fenomen de competència és una potenciació del pas d'uridina mitjançat per hENT1, que en aquest cas concret actua equilibrant les concentracions intracel·lular i extracel·lular de nucleòsids d'uridina en el seu conjunt sense tenir en compte quin d'ells està translocant preferentment. A més baixa concentració de 5hmdU (100 μ M), hENT1 aparentment presenta una major afinitat per uridina que per 5hmdU i, per aquesta raó, la captació d'uridina es veu considerablement augmentada. En canvi, a una concentració molt major de 5hmdU (500 μ M), aquest fenomen s'inverteix i en trobar-se 5hmdU en molta més proporció respecte la concentració extracel·lular d'uridina, és 5hmdU la molècula que s'uneix prioritàriament amb hENT1 inhibint molt considerablement l'entrada d'uridina a través d'aquest transportador (**Figura 39**).

A partir dels resultats obtinguts per al transport mitjançant per hENT1 en línies cel·lulars amb sobreexpressió estable dels diversos transportadors concentratius de nucleòsids se'n desprenen diverses observacions (**Figura 40**). A més del fet que els nucleòsids 5-hidroximetilats no semblen afectar el transport d'uridina a través d'hENT1, poden derivar-se'n diverses consideracions a partir de la presència simultània d'hENT1 i d'algun dels tres transportadors concentratius a nivells d'expressió elevats en el sistema en absència de transport concentratiu. En primer lloc, destaca el valor de transport d'uridina a través d'hENT1 observat en cèl·lules amb expressió estable d'hCNT1 i en presència de 5hmdC a una concentració de 500 μ M. En aquest cas, sorprèn el terç d'inhibició existent en el transport d'uridina respecte tant el valor observat en les mateixes cèl·lules a una concentració de 5hmdC de 100 μ M com respecte el valor corresponent a 5hmdC 500 μ M en la línia cel·lular control HEK293-pcDNA5 sense hCNT1, ambdues sense inhibició de la captació d'uridina a nivell d'hENT1. Aquest fenomen presumiblement podria ser degut a la unió de 5hmdC a hCNT1 sense necessitat de ser translocat per aquest, donat que podria ser dependent tant de la presència abundant d'hCNT1 en el sistema com de l'exposició a una concentració elevada de 5hmdC (500 μ M). Aquest fet en concret en què un substrat s'uneix al transportador sense necessitat d'ésser translocat, podria mantenir certa relació amb el possible rol d'hCNT1 com a transceptor posant en relleu aquesta vessant no translocadora d'aquestes proteïnes (**Perez-Torras et**

al., 2013). El mecanisme concret d'aquest possible fenomen no resultaria ser trivial tenint en compte el sentit en el que té lloc el transport d'uridina. Per una banda, podria dir-se que simplement una alta concentració d'un altre nucleòsid de pirimidina, en aquest cas 5hmdC, inhibiria l'entrada d'uridina a través d'hENT1 per un mecanisme de competència sense cap necessitat que intervingués hCNT1 en cap moment, però llavors hauria d'observar-se el mateix en cèl·lules HEK293-pcDNA5 sense hCNT1. Per un altre costat, podria reconèixer-se que l'efecte és efectivament atribuïble a hCNT1 d'una o altra manera però que senzillament es tractaria d'un canvi en el balanç entre els nivells extracel·lulars i intracel·lulars de nucleòsids. No obstant, en aquest supòsit, el que hauria d'estar succeint seria un augment en l'entrada d'uridina i en cap cas una disminució. A més, en l'hipotètic cas en què el que s'esperés fos una inhibició en lloc d'una potenciació del transport d'uridina a causa d'un augment de 5hmdC disponible en el medi extracel·lular – probablement per una possible saturació de la unió a hCNT1 en utilitzar una concentració tan elevada –, aquesta inhibició hauria d'observar-se també en absència d'hCNT1 tant a la concentració de 100 μ M com 500 μ M. En definitiva, podria suggerir-se que existeix un efecte de 5hmdC en la translocació d'uridina mitjançada per hENT1 i que aquest es dona únicament quan hCNT1 és present en el sistema i a la concentració de 5hmdC més alta de les dues avaluades. L'única hipòtesi mecanística conceptualment factible i consistent que expliqui el fenomen observat en base als resultats obtinguts consistiria en un desplaçament parcial de citidina per la seva unió a hCNT1 i hCNT3, augmentant d'aquesta manera els nivells extracel·lulars de citidina. L'augment de citidina extracel·lular disponible implicaria un augment del gradient de concentració d'aquest nucleòsid i, per tant, un increment de la seva entrada a l'interior cel·lular a través d'hENT1 en detriment de la captació d'uridina. Aquest augment en la captació d'uridina per hENT1 possiblement sigui degut a un augment de la concentració d'uridina extracel·lular disponible pel desplaçament d'aquesta de la seva unió a hCNT2 per part de 5mdC o 5fdC. Per tant, encara que pugui resultar sorprenent, aquests resultats suggereixen que determinats nucleòsids de pirimidina diferents d'uridina podrien ser reconeguts per hCNT2 (**Figura 40**).

En aquest sentit, i respecte de la interacció amb hCNT2, com a conseqüència de la presència de 5hmdC a 500 μ M apareixeria un desequilibri en el gradient de concentració de nucleòsids de pirimidina encara major que quan la concentració de 5hmdC és 100 μ M. Per aquesta raó, en aquest cas podria esperar-se que l'augment en la captació d'uridina per part d'hCNT2 fos encara més gran amb una major concentració extracel·lular de nucleòsids pirimidínics en el seu conjunt. En canvi, aquesta possibilitat no es dona i el transport d'uridina es manté igual. Una hipòtesi factible és que la 5hmdC a una concentració de 500 μ M sí sigui un bon competidor d'uridina pel lloc d'unió a

substrat d'hCNT2 i que estigui tenint lloc una major entrada d'ambdós nucleòsids, però en una major proporció de 5hmdC respecte el total de nucleòsids de pirimidina, fet que implicaria una menor translocació d'uridina. En definitiva, com a resultat d'un major desequilibri del gradient de concentració de nucleòsids de pirimidina s'esperaria un augment encara major en el transport d'uridina en primer lloc; i, en segon lloc, en interaccionar 5hmdC amb hCNT2, i eventualment ser transportat, es preveuria una disminució en la translocació d'uridina a través d'hCNT2 en favor del transport del propi inhibidor, la 5hmdC. Com a resultat d'una combinació d'ambdós, l'entrada d'uridina mitjançada per hCNT2 es mantindria en els mateixos nivells respecte el control. El fet que la 5hmdC pogués interaccionar amb hCNT2 implicaria que hCNT2, a més d'uridina, podria reconèixer nucleòsids derivats de citidina. Quan el nucleòsid epigenètic utilitzat com inhibidor és la 5fdC, la translocació de substrat per part d'hCNT2 es veu inhibida en tots els casos, independentment del tipus estructural de la nucleobase del nucleòsid utilitzat com a substrat i amb independència de la concentració d'inhibidor. Això portaria a pensar que l'afectació en el transport de substrat per part de l'inhibidor no seria deguda tant a canvis en la concentració extracel·lular de nucleòsids d'un o altre tipus sinó més aviat a la interacció directa del propi nucleòsid epigenètic amb hCNT2. A més, la inhibició del transport d'uridina a través d'hCNT2 no només es dona en els quatre casos, sinó que a més és fins i tot major quan el substrat és adenosina. La idea que un nucleòsid derivat de citidina, la 5fdC, pugui interaccionar amb hCNT2 inclús a concentracions de l'ordre de 100 μM , a més de resultar com a mínim sorprenent, resultaria totalment nou. Tot i així, en cap cas s'hauria d'ignorar que aquests experiments de *cis*-inhibició de transport de nucleòsids no són més que una mesura indirecta de la interacció de molècules amb els transportadors i que, encara que és veritat que permeten fer-se una idea sobre si és possible o no que una determinada molècula interaccioni amb un transportador en particular, no permeten assegurar amb rotunditat que aquesta molècula estigui sent translocada per aquest transportador de forma inequívoca. Per exemple, el cas oposat en què sí que podria assegurar-se directament la translocació de substrat en lloc de realitzar assaigs de *cis*-inhibició consistiria en la determinació de la translocació de glucosa a través de transportadors específics mitjançant la combinació de la utilització de glucosa marcada radioisotòpicament i la determinació d'un metabòlit derivat de producció necessàriament intracel·lular, com és el cas de la glucosa-6-fosfat. En el cas que ens ocupa, aquest abordatge metodològic no fou possible degut a la no disposició dels nucleòsids epigenètics marcats radioisotòpicament ells mateixos. Per aquesta raó, es va utilitzar en el seu lloc el substrat natural endogen marcat radioisotòpicament i la realització d'experiments de *cis*-inhibició, tot i premetre només la possibilitat d'inferir el grau d'interacció de la

molècula amb el transportador de manera indirecta. En últim lloc, contràriament al que es va observar amb 5fdC, 5hmdU dona lloc a un clar augment en la translocació de substrat en tots els casos i de forma molt més pronunciada quan el substrat utilitzat és adenosina i la concentració de 5hmdU és 500 μM . Quan el substrat és uridina, l'increment en la translocació de substrat possiblement es degui a la mateixa causa que en el cas de 5hmdC 100 μM amb uridina. És a dir, l'increment en la concentració extracel·lular de nucleòsids de pirimidina, concretament de nucleòsids d'uridina, provoca una major captació d'aquests nucleòsids per part del transportador. En no ser la 5hmdU un bon competidor amb uridina pel lloc d'unió a substrat del transportador, el nucleòsid translocat preferentment per hCNT2 és uridina inclús forçant el sistema amb una concentració 500 μM d'inhibidor competidor. Quan el substrat utilitzat és adenosina, la captació de substrat és potenciada per la presència de 5hmdU de forma directament proporcional a la concentració de 5hmdU. A una concentració de 500 μM de 5hmdU, la translocació d'adenosina es triplica. Existiria, d'aquesta manera, un fenomen d'activació del transport d'adenosina per hCNT2 per part de 5hmdU. A la vista dels resultats obtinguts, no seria descartable pensar que hCNT2 tingués diferents llocs d'unió per adenosina i 5hmdU, essent adenosina el substrat i 5hmdU un activador al·lostèric (**Figura 41**).

Les dades de transport d'uridina són consistents amb els resultats obtinguts en el transport d'adenosina per hENT1. En ambdós casos, una reducció de la concentració extracel·lular d'adenosina donaria lloc a una disminució en el gradient de concentració d'adenosina que resultaria en una menor activitat balancejadora d'hENT1. En el cas de 5hmdU, com s'ha exposat prèviament, aquesta podria facilitar al·lostèricament la unió d'adenosina a hCNT2 tot i no arribar a completar el cicle de translocació donant lloc a una disminució de l'adenosina extracel·lular disponible. La possibilitat d'activació al·lostèrica de la translocació de substrat no es troba descrita en el cas dels transportadors de nucleòsids, però sí que existeixen exemples d'aquest mecanisme d'activació en altres transportadors com, per exemple, és el cas de transportadors del neurotransmissor serotonina (**Tanaka et al., 2014**). En el cas de la 5hmdU, en tractar-se d'un nucleòsid derivat d'uridina, el seu reconeixement per part d'hCNT2 és previsible. En canvi, en el cas de la 5fdC, tot i poder inferir una possible interacció del nucleòsid amb hCNT2 contra tot pronòstic en tractar-se d'un nucleòsid derivat de citidina, la inhibició de la captació d'adenosina en presència de 5fdC pot atribuir-se a la interacció de la 5fdC amb hENT1 (**Figura 42**).

Es confirmen així les diferents consideracions estructurals esmentades anteriorment: 1) els nucleòsids de citidina interaccionen millor amb els transportadors que els nucleòsids d'uridina, i 2) el grup funcional a la posició 5 de la pirimidina resulta clau en la interacció essent el substituent formil el que més l'afavoreix i el grup hidroximetil el que més la dificulta. L'atenuació de la capacitat inhibidora de 5fdC sobre hENT1 deguda a la presència d'hCNT3 podria indicar que, almenys en el cas d'hCNT3, podria tenir lloc un cert grau d'interacció del nucleòsid epigenètic amb el transportador concentratiu sense necessitat de consumir el cicle complet de translocació, retirant així una part de 5fdC disponible per hENT1 i relaxant la inhibició del pas d'uridina a través d'hENT1. Per tant, una possibilitat seria que 5fdC sí que interaccionés amb els transportadors concentratius de nucleòsids – tal i com s'ha suggerit amb anterioritat – inclús sense arribar a consumir el cicle complet de translocació com a conseqüència de l'absència de sodi, però que al seu torn hENT1 presentaria una afinitat tan elevada per 5fdC en comparació amb els demés nucleòsids que l'efecte que tindria la seva unió al transportador concentratiu en qüestió quedaria totalment emmascarat per la pròpia interacció amb hENT1 i tan sols s'intuiria mínimament en el cas d'hCNT3, que dels tres transportadors concentratius és el transportador que presenta una major afinitat per 5fdC. La interacció i el transport de 5fdC a través d'hENT1 probablement siguin tan importants que fins i tot el canvi observat en cèl·lules HEK293–hCNT3, tot i arribar a ser apreciable, és de molt baixa magnitud. Els nucleòsids 5hmdC i 5hmdU presenten pocs canvis sobre l'activitat d'hENT1 en funció de la presència dels diferents transportadors concentratius. En el cas de 5hmdU s'observa una lleugera diferència en cèl·lules HEK293–hCNT2, fet que resulta lògic tenint en compte que hCNT2 uneix i transporta uridina. En aquest cas, la 5hmdU competiria amb la uridina per la seva unió a hCNT2 desplaçant-la i augmentant la seva concentració extracel·lular i, per tant, atenuant l'acció equilibrativa d'hENT1 respecte els nivells d'uridina. Per altra banda, la 5hmdC sí que produeix canvis en el transport d'uridina per hENT1 que, a més, es donen en presència de qualsevol dels tres transportadors concentratius. Aquest punt, que resulta del tot raonable per hCNT1 i hCNT3, és més difícilment explicable per hCNT2. No obstant, una vegada s'ha suggerit la possible capacitat d'hCNT2 per unir 5fdC, no seria descartable que succeís quelcom semblant amb 5hmdC, encara que en menor mesura (**Figures 44–45**).

Les dades obtinguts a partir de les corbes d'inhibició i d'interacció cinètica realitzades pels nucleòsids epigenètics reflecteixen la importància de la naturalesa química del substituent a la posició 5 de la pirimidina d'aquests nucleòsids en la interacció amb hCNT1 (**Figura 46**). Concretament, sembla ser que el comportament que adopta aquest grup funcional en l'establiment o no establiment de ponts d'hidrogen amb el lloc de reconeixement del

transportador resultaria ser determinant en la interacció (Zhang *et al.*, 2003; Vickers *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006). D'aquesta manera, si el substituent es comporta com un acceptor de ponts d'hidrogen (els parells d'electrons no enllaçants de l'àtom d'oxigen del grup formil en el cas de 5fdC), la interacció amb el transportador es veu molt afavorida; en canvi, si, pel contrari, el substituent es comporta com un donador de ponts d'hidrogen (l'àtom d'hidrogen pertanyent al grup hidroxil en el cas de 5hmdC i 5hmdU), la interacció amb el transportador es torna més costosa termodinàmicament (**Figura 46**). En haver-se obtingut les corbes d'afinitat a partir de concentracions situades en el rang de IC_{50} , aquestes proporcionen una idea fiable i precisa de l'afinitat tant d'hCNT1 com d'hCNT3 per la 5fdC. Tot i així, afirmar que, a diferència del que succeeix amb els demés nucleòsids epigenètics i amb els nucleòsids naturals canònics, hCNT1 presentaria més afinitat per la 5fdC que hCNT3, resultaria com a mínim precipitat, donat que els dos valors de K_i són molt propers, podent arribar a considerar-se fins i tot equivalents. Per tant, més enllà del fet que 5fdC interaccioni millor amb hCNT1 que amb hCNT3, contràriament al que podria anticipar-se, la importància d'aquest fet podria residir més bé en que, en primer lloc, la interacció d'ambdós transportadors amb la 5fdC està enormement afavorida a nivell termodinàmic, i en segon lloc, que aquesta interacció pugui haver arribat a un llindar d'afavoriment termodinàmic arribant a igualar l'ordre de magnitud de les constants d'inhibició d'aquest compost en concret per ambdós transportadors. La idea d'aquesta espècie d'hipotètic llindar termodinàmic es veu reforçada en comparar els valors obtinguts de K_i dels tres nucleòsids epigenètics restants amb hCNT1 i hCNT3. En els tres casos, l'afinitat per hCNT3 és notablement major que per hCNT1. No obstant, l'ordre d'afinitats entre ells per cada transportador es manté igual. La 5hmdU és el nucleòsid pitjor reconegut per hCNT3 i la 5mdC i la 5hmdC presenten una K_i del mateix ordre de magnitud, essent l'afinitat lleugerament major per la 5mdC que per la 5hmdC (**Figura 47**). Coherentment amb els resultats obtinguts a partir dels assaigs de *cis*-inhibició dels nucleòsids epigenètics amb hCNT1, les dades que deriven de les corbes d'afinitat tan sols presenten constants d'interacció per als nucleòsids 5mdC i 5fdC, no així per als derivats hidroximetilats, 5hmdC i 5hmdU, que *a priori* no interaccionarien amb aquest transportador (**Figura 48**).

Pel que fa a l'efecte dels nucleòsids epigenètics en absència d'activitat citidina desaminasa es van observar efectes dispars i curiosos en els diferents casos. En quant al nucleòsid 5hmdC, tal i com ja estava descrit anteriorment, no resulta en un efecte citotòxic en absència de la seva conversió a 5hmdU per part de CDA (Zauri *et al.*, 2015). Per contra, el tractament de cèl·lules sense CDA amb 5hmdC resulta en una estimulació de la proliferació i

del creixement cel·lulars que podria ser deguda a una major taxa d'incorporació de 5hmdC en la síntesi de DNA a la replicació i, per tant, en una disminució dels nivells de metilació de DNA que a nivell de promotors i potenciadors transcripcionals pot ocasionar regulació positiva de gens proproliferatius (**Figura 49**). En canvi, en el cas de 5fdC s'observa l'efecte contrari. A més, també resulta sorprenent i interessant el fet que el transportador amb què s'observa un major efecte d'inhibició del creixement sigui hCNT2 (**Lang et al., 2004**). Dels quatre transportadors avaluats, per al que menys podria esperar-se capacitat de translocació d'un nucleòsid de citidina seria hCNT2, la selectivitat estructural del qual es restringeix a nucleòsids de purina i a uridina (**Young et al., 2013**). Per aquesta raó, no només resulta curiós que s'observi una contribució d'hCNT2 a l'efecte de 5fdC, sinó que a més sigui el transportador que, amb molta diferència, més potenciï aquest efecte. Una qüestió interessant que es derivaria d'aquesta informació consisteix en conèixer si aquest efecte atribuïble únicament a 5fdC també es mantindria en presència de CDA o si bé seria diferent en presència d'aquesta activitat enzimàtica i amb la producció de 5fdU podent ser emmascarat per aquest darrer a concentracions notablement menors de 5fdC (**Zauri et al., 2015**). També podria ser rellevant farmacològicament conèixer si, en cas que es tractés de dos mecanismes farmacològics diferents en absència i en presència de CDA, la diferent contribució de cadascun dels transportadors de nucleòsids en l'acció de la 5fdC seria la mateixa o semblant per ambdós mecanismes, o bé seria totalment diferent en cadascun dels dos casos. Aquesta informació, que es presenta en el transcurs d'aquest treball, podria proporcionar informació d'especial interès que permetria obtenir algunes idees sobre els mecanismes d'acció d'aquest nucleòsid epigenètic i del paper dels transportadors de nucleòsids en la seva biodisponibilitat (**Figura 50**).

En tractar les cèl·lules amb activitat CDA amb 5hmdC es podria esperar un efecte molt major que permetés afirmar amb claredat que la 5hmdC no és únicament capaç d'inhibir el creixement cel·lular per inhibició de la proliferació cel·lular per aturada del cicle cel·lular, com succeeix en el cas de 5mdC, sinó que és capaç de matar-les. Per contra, en no superar un llindar d'un màxim d'aproximadament el 25% d'inhibició del creixement cel·lular, els resultats obtinguts no permeten ni tan sols fer-se una idea sobre si la disminució del creixement cel·lular és deguda a la mort de les cèl·lules o bé a la inhibició de la proliferació cel·lular o un altre mecanisme diferent al mecanisme de toxicitat cel·lular (**Figura 54**). Com ja s'ha afirmat amb anterioritat, és conegut i està demostrat que la 5hmdC en presència d'activitat citidina desaminasa, i en conseqüència el seu derivat desaminat 5hmdU, és citotòxic (**Zauri et al., 2015**). Per tant, una hipòtesi plausible derivada d'aquest resultat consistiria en

què l'efecte citotòxic podria estar determinat pel seu accés a l'interior de la cèl·lula requerint així algun mecanisme d'entrada en particular, com pot ser el cas d'algun o diversos dels transportadors de nucleòsids (**Figura 55**). En canvi, en el cas de la 5fdC, no només es posa de relleu que és altament tòxic per les cèl·lules i que CDA és essencial per a que aquesta toxicitat tingui lloc, sinó que, a més, o bé la 5fdC no requereix cap mecanisme de transport específic per assolir l'interior cel·lular i exercir el seu mecanisme d'acció, o bé aquestes cèl·lules, tant HEK293-pcDNA5 com TFK-1, ja disposen de forma endògena d'un mecanisme de translocació específic capaç de reconèixer i captar 5fdC. Tant la línia cel·lular HEK293-pcDNA5 com la línia cel·lular TFK-1 expressen endògenament nivells basals del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1. En aquest treball s'ha demostrat que la 5fdC presenta una clara preferència per interaccionar amb hENT1. Probablement, aquestes dues conjuntures suggereixin de forma més o menys clara que hENT1 podria ser un magnífic candidat com a mecanisme de translocació preferent per la captació del nucleòsid epigenètic 5fdC per part de les cèl·lules (**Figura 56**).

En quant al paper específic dels diversos transportadors de nucleòsids en l'efecte citotòxic dels nucleòsids epigenètics mitjançat per CDA mitjançant les dades obtingudes a partir dels estudis de viabilitat cel·lular es confirmen les observacions realitzades als estudis d'interacció (**Figures 57–68**). En el cas de la 5mdC, s'observa efecte citostàtic degut a la seva conversió a desoxitimidina per la CDA en presència d'hENT1 (**Figures 57A–B,E–F, 61A–B,E–F i 65A–B,E–F**) i, sobretot, d'hCNT1 (**Figura 57C–D**). En canvi, en presència d'hCNT2 (**Figura 61C–D**) i d'hCNT3 (**Figura 65C–D**) no només no es veu afavorida l'acció citostàtica de la 5mdC, sinó que és contrarestada. Per a la 5hmdC, els resultats obtinguts mostren una correlació clara i específica entre la seva activitat citotòxica i la dependència respecte les activitats enzimàtica CDA i transportadora hCNT1 (**Figura 58**). En aquest cas, l'especificitat respecte al transportador hCNT1 esdevé singular i evident en contraposició als altres transportadors, hCNT2 (**Figura 62**) i hCNT3 (**Figura 66**). En canvi, l'activitat citotòxica del nucleòsid 5fdC no està lligada a cap transportador concentratiu en primera instància, sinó al transportador equilibratiu hENT1 (**Figures 59, 63 i 67**). Tot i així, els transportadors concentratius no semblen contrarestar l'activitat de la 5fdC, tal i com succeeix en el cas de la 5hmdC i els transportadors hCNT2 i hCNT3; sinó que semblen tenir certa capacitat de transport de 5fdC però de forma totalment secundària i subjugada a l'activitat principal portada a terme per hENT1 (**Figures 59C–F, 63C–F i 67C–F**).

És possible que pugui existir un cert fenomen de translocació de 5mdC per part d'hENT1 tant en cèl·lules HEK293-pcDNA5 com en cèl·lules TFK-1. En cèl·lules HEK293-pcDNA5 s'observa un petit efecte de disminució de la

viabilitat cel·lular a la concentració més alta avaluada (500 μ M) en presència de CDA que és aproximadament d'un 20–25%. La petita magnitud d'aquest efecte podria atribuir-se a diferents factors. En primer lloc, podria atribuir-se a l'efecte no citotòxic propi de la 5mdC i del seu derivat desaminat, desoxitimidina. Com s'ha exposat prèviament, la 5mdC en ser desaminada per citidina desaminasa és convertida a desoxitimidina que té la capacitat d'aturar el cicle cel·lular i, per tant, alentir la proliferació cel·lular i en conseqüència reduir el creixement cel·lular. En aquest cas, el creixement cel·lular no es veuria reduït per un efecte citocida, sinó que seria degut a un fre a la proliferació cel·lular. Per una altra banda, la petita magnitud de l'efecte de la 5mdC en presència de CDA, més enllà del mecanisme ja exposat, podria atribuir-se també a que, tot i ser transportat pel transportador hENT1, aquest transport de 5mdC mitjançant per hENT1 no es caracteritzés per una gran eficiència de translocació i per aquesta raó també el seu efecte farmacològic es veïés atenuat. En cèl·lules TFK-1 transfectades amb el vector buit control pcDNA3 s'observa la mateixa tendència en la viabilitat cel·lular que la que s'observa en cèl·lules HEK293–pcDNA5. En aquest cas, és cert que en cèl·lules TFK-1 control (pcDNA3) el tractament amb 5mdC dona lloc a una inhibició del creixement cel·lular de fins aproximadament un 20–25% a la concentració més elevada de nucleòsid epigenètic (500 μ M). A més, en comparar les quatre corbes de viabilitat cel·lular en cèl·lules TFK-1 (pcDNA3, hCNT1, hCNT2 i hCNT3) és curiós comprovar com s'aprecia una certa contribució en la captació de 5mdC a la cèl·lula per part dels transportadors concentratius amb capacitat per translocar nucleòsids de pirimidina, hCNT1 i hCNT3; essent sengles contribucions pràcticament iguals fet que es tradueix en que ambdues corbes són pràcticament coincidents; i per altra banda, aquesta contribució no és present a les cèl·lules que només tenen hENT1 o hENT1 i hCNT2, donat que hCNT2 no té capacitat de transport de nucleòsids de citidina i per tant no seria esperable translocació de 5mdC mitjançada per hCNT2. Curiosament, les corbes de pcDNA3 i hCNT2 resulten també ser coincidents (**Figura 69**).

Encara que es tracti d'una petita proporció del nucleòsid epigenètic 5hmdC total disponible en el medi, en disposar les cèl·lules TFK-1 de nivells basals de CDA molt elevats, tot el nucleòsid 5hmdC que accediria al citoplasma seria ràpida i eficientment convertit a 5hmdU per l'activitat CDA donant lloc a l'efecte observat de disminució de la viabilitat cel·lular. Una altra observació que es derivaria d'aquest resultat és la viabilitat cel·lular de les cèl·lules TFK-1 transfectades amb hCNT1 en resposta a 5hmdC. Com s'ha esmentat abans, 5hmdC seria translocada amb una especificitat i una eficiència molt elevades per part del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 en cèl·lules HEK293–hCNT1. En canvi, en aquest cas, la disminució de la viabilitat cel·lular en cèl·lules TFK-1 transfectades amb hCNT1 només arriba a fregar el 50% a una concentració 500 μ M de 5hmdC. Aquest fet podria

explicar-se pels nivells de proteïna hCNT1 presents en unes i altres cèl·lules. En el cas de cèl·lules HEK293-hCNT1, en tractar-se d'una línia cel·lular genèticament modificada per a la sobreexpressió estable del transportador hCNT1, els nivells d'aquest a la membrana plasmàtica són molt més alts que els nivells d'hCNT1 presents a la membrana de cèl·lules TFK-1 com a resultat d'una sobreexpressió transitòria i molt menys eficient en quant al procés de transfecció es refereix (**Figura 70**).

En quant a la 5fdC, resulta almenys curiós el desplaçament entre les quatre corbes concentració-resposta en cèl·lules TFK-1. En ser hENT1 el transportador majoritàriament responsable de la translocació de 5fdC, les quatre corbes responen a un perfil molt similar, encara que alhora s'observa un cert desplaçament entre les diverses corbes que podrien respondre a la contribució de cadascun dels transportadors concentratius de nucleòsids al transport de 5fdC suplementari a la captació majoritària portada a terme per hENT1. En primer lloc, l'ordre de magnitud de les diferències entre les diverses corbes corrobora que la contribució d'hENT1 a la biodisponibilitat de 5fdC seria sens dubte el mecanisme prioritari. En segon lloc, el fet que les corbes concentració-resposta de les cèl·lules amb presència d'algun dels transportadors concentratius de nucleòsids estiguin totes desplaçades cap a l'eix d'ordenades, és a dir, que cadascun dels transportadors concentratius sensibilitzi lleugerament les cèl·lules al tractament amb 5fdC de forma suplementària al mecanisme de captació principal mitjançat per hENT1, semblaria indicar que tots els transportadors concentratius de nucleòsids (hCNT1, hCNT2 i hCNT3) també podrien posseir una capacitat de translocar 5fdC *per sé*. Tot i tractar-se d'un nucleòsid de citidina, aquest fet no resultaria *a priori* sorprenent en base a les dades presentades i comentades anteriorment en què fins i tot el transportador específic de purines hCNT2 es mostra com un candidat a interaccionar amb i/o transportar 5fdC. En últim lloc, resulta també curiós i en concordança amb el que podria pressuposar-se *a priori*, l'ordre del grau de sensibilització de les cèl·lules TFK-1 en funció del transportador concentratiu amb què es transfecten. En aquest cas, hCNT3 és el transportador que més sensibilitza les cèl·lules a 5fdC, donat que és el transportador que presenta un major espectre d'especificitat estructural de nucleòsids i que té una major afinitat pels nucleòsids i, per tant, una major eficiència de translocació. A continuació, el següent transportador en grau de sensibilització a 5fdC és hCNT1, que és l'altre transportador a més d'hCNT3 que té capacitat de reconeixement i de translocació de nucleòsids de pirimidina, entre els què s'inclouen els nucleòsids de citidina com és el cas de 5fdC. Més enllà d'hCNT3 i hCNT1, el següent transportador concentratiu que també sensibilitzaria les cèl·lules TFK-1 al tractament amb 5fdC tot i que en menor mesura que els dos transportadors esmentats anteriorment, seria

hCNT2. Tot i això, hCNT2 també contribuiria a l'augment de la biodisponibilitat i a la sensibilització a l'efecte citocida per part de la 5fdC, per sobre de les cèl·lules control transfectades amb el vector buit pcDNA3 i tan sols la participació d'hENT1. Aquestes consideracions es confirmen amb claredat en obtenir i comparar els diferents valors de IC_{50} en tots els casos (**Figura 71**).

Les dades obtingudes per la 5fdC en absència de CDA podrien portar a pensar en una hipòtesi alternativa, tot i que no exclouent, d'un altre mecanisme d'acció propi del nucleòsid 5fdC sense necessitat d'experimentar cap conversió estructural, química o enzimàtica prèvia i diferent del mecanisme d'acció citotòxic ja conegut per al seu producte de desaminació, 5fdU. Una possibilitat podria ser la de pressuposar que el nucleòsid 5fdC posseeixi *per sé* un mecanisme d'acció propi, ja sigui d'inducció de citotoxicitat o d'aturada de la proliferació cel·lular, que tingués lloc en una escala de magnitud molt menor al fenomen de citotoxicitat induït per la 5fdU i que l'esmentat fenomen sigui emmascarat precisament per aquest darrer; però que en realitat es tracti de dos mecanismes bioquímics diferents i independents que estiguin convivint de forma simultània (**Figura 75–76**).

A partir de les dades obtingudes, es podria formular la hipòtesi que hCNT3, tot i no translocar 5fdC, tingués una certa capacitat d'unió d'aquest nucleòsid retirant-lo així de la seva disponibilitat respecte el seu accés a hENT1 per ser transportat per aquest, o el que és el mateix, hCNT3 podria segrestar 5fdC sense translocar-la limitant així el seu accés a hENT1 per, en aquest cas sí, portar-ne a terme la seva internalització (**Figura 79**).

En presència d'hCNT3 i en absència d'hENT1 els valors de viabilitat cel·lular són clarament inferiors als mateixos valors observats en cèl·lules HEK293–pcDNA5 amb hENT1 inhibït amb dipiridamol. D'aquesta forma, aquestes dades semblarien indicar que el transportador concentratiu hCNT3 sí que estaria implicat també en la translocació i la internalització del nucleòsid epigenètic 5fdC. Per tant, la hipòtesi més plausible del que podria estar succeïnt en incrementar la viabilitat cel·lular amb la presència simultània dels transportadors hCNT3 i hENT1 és que hCNT3 estigués transportant molt eficientment 5fdC cap a l'interior cel·lular i que com a conseqüència lògica d'aquest procés i donada la seva alta afinitat pel nucleòsid, el transportador hENT1 estigués bombejant-lo de tornada cap a l'exterior cel·lular amb una eficiència molt elevada (**Figura 80**).

A concentracions més elevades de 5fdC, s'observa un fenomen curiós que manté una certa analogia entre el que s'estableix amb el nucleòsid 5hmdC, hCNT1, CDA i hOCT1 (**Figures 73–74**) i el que s'observa en aquest cas amb el nucleòsid 5fdC, hENT1, CDA i hOCT1. Aquest fet té lloc particularment a una concentració de 5fdC de 10 μ M, en què la viabilitat

cel·lular resulta ser més elevada en absència de CDA que en presència d'aquest enzim. A partir d'aquestes dades podria desprendre's una hipòtesi en què ambdós nucleòsids epigenètics, 5hmdC i 5fdC, podrien dur a terme un cert efecte farmacològic per si mateixos sense necessitat de ser convertits als seus derivats d'uridina per part de l'activitat enzimàtica citidina desaminasa, 5hmdU i 5fdU, respectivament; i que, mitjançant algun mecanisme desconegut, la proteïna hOCT1 contribuiria a potenciar o induir aquest efecte (**Figura 81**).

En quant al creixement i morfologia cel·lulars, s'observa un efecte de disminució en el creixement cel·lular – probablement degut a una reducció en la proliferació cel·lular – i, per una altra banda, que la proporció de cèl·lules aturades en el transcurs del cicle cel·lular tingui lloc únicament en cèl·lules que tenen hCNT1 i CDA alhora, i en canvi això no succeeix en cèl·lules amb tan sols una d'aquestes dues proteïnes o cap de les dues. En tant que hCNT1 és un transportador especialitzat en el transport de nucleòsids de pirimidina, entre els nucleòsids que aquest transportador transloca preferentment s'hi troben citidina i uridina, així com altres nucleòsids propers estructuralment a aquests. Una hipòtesi factible consistiria en que el desequilibri generat entre nivells intracel·lulars de nucleòsids i nucleòtids de pirimidina i de purina podria donar lloc a una desregulació de l'avenç del cicle cel·lular. A més, aquest efecte podria veure's accentuat de forma crítica com a conseqüència de l'activitat citidina desaminasa que seria responsable de la conversió de la citidina intracel·lular a uridina. Per tant, la detenció del cicle cel·lular en cèl·lules que posseeixen simultàniament hCNT1 i CDA podria atribuir-se a un increment marcat dels nivells d'uridina intracel·lular. Sense cap mena de dubte, aquest efecte independent del tractament amb 5fdC observat a temps zero del tractament probablement faci més complicada l'anàlisi de l'efecte derivat del mecanisme d'acció citotòxica de 5fdC en presència de CDA i la seva eventual potenciació o atenuació per part d'hCNT1 (**Figures 91–92**). Per tant, en base a aquestes imatges, no és possible suggerir a quins factors concrets són degudes aquestes diferències, que podrien ser conseqüència o bé d'algun efecte causat per 5fdC mitjançant per hCNT1 o per hENT1, o per ambdós amb contribucions diverses de cadascun d'ells, o bé no guardar cap relació amb l'aplicació del nucleòsid epigenètic i que es degués únicament a la presència conjunta de CDA i hCNT1. En qualsevol cas, tant si es tractés d'una possibilitat com de l'altra o fins i tot d'una combinació d'ambdues, no és possible determinar de quina d'elles es tractaria concretament ni quina d'elles predominaria en cas de convivència simultània de més d'un mecanisme d'acció (**Figura 91**).

L'observació microscòpica i la posterior anàlisi visual de les cèl·lules HEK293–hCNT2 esdevé especialment rellevant a l'hora d'avaluar els efectes derivats del tractament amb 5fdC tant en el creixement i la mort cel·lulars com en la morfologia de les cèl·lules i el possible rol que pugui exercir el transportador hCNT2 en aquests. En aquest treball es presenten evidències, o almenys indicis d'evidències, de què el nucleòsid pirimidínic derivat de citidina 5fdC podria ser reconegut i fins i tot translocat pel transportador específic de nucleòsids de purina hCNT2. Tal i com és conegut, el transportador concentratiu de nucleòsids hCNT2 presenta selectivitat i especificitat pel reconeixement i la translocació de nucleòsids purínics (adenosina i guanosina) i, a més, pel reconeixement i la translocació d'uridina, però en cap cas per citidina ni timidina (Young *et al.*, 2013). Per tant, el simple fet que la 5fdC pogués arribar a ser reconeguda i transportada per hCNT2 resultaria a més de sorprenent, quelcom molt nou. En cas de donar-se, això implicaria que la presència del grup formil en el substituent de la posició 5 de l'anell de pirimidina actuaria a mode de determinant estructural amb caràcter autosuficient per convertir un nucleòsid *a priori* irreconeixible per part d'hCNT2, citidina, en un nucleòsid que podria ser substrat del cicle complet de translocació d'aquest transportador. Partint de la base que, tot i tractar-se d'un nucleòsid pirimidínic, la uridina sí que és tant reconeguda com transportada per hCNT2 i la citidina no. El determinant estructural que les diferencia entre elles és el grup funcional del carboni 4 de l'anell de pirimidina (un grup cetona en el cas d'uridina – és a dir, un acceptor de ponts d'hidrogen a nivell dels dos parells d'electrons no enllaçants en orbitals π de l'àtom d'oxigen amb hibridació sp^2 –; i un grup amino, més concretament de tipus anilina, en el cas de citidina – en altres paraules, un donador de ponts d'hidrogen a nivell dels dos àtoms d'hidrogen enllaçats a l'àtom de nitrogen que posseeix un estat intermedi d'hibridació entre sp^3 i sp^2 en trobar-se el parell d'electrons no enllaçant compromès amb la densitat electrònica del sistema π de l'heterocicle aromàtic de la pirimidina per un fenomen de tautomeria de tipus amino-imino). La presència d'un grup cetona supletori en el cas de 5fdC (el grup cetona pertanyent al grup formil del substituent a la posició 5) podria actuar com a subrogat del grup cetona de la posició 4 de l'anell de pirimidina del nucleòsid d'uridina. Per tant, d'aquesta forma es possibilita l'establiment dels ponts d'hidrogen necessaris per a que tingui lloc el reconeixement molecular entre el nucleòsid 5fdC i el lloc d'unió del transportador hCNT2 (Figures 93–95).

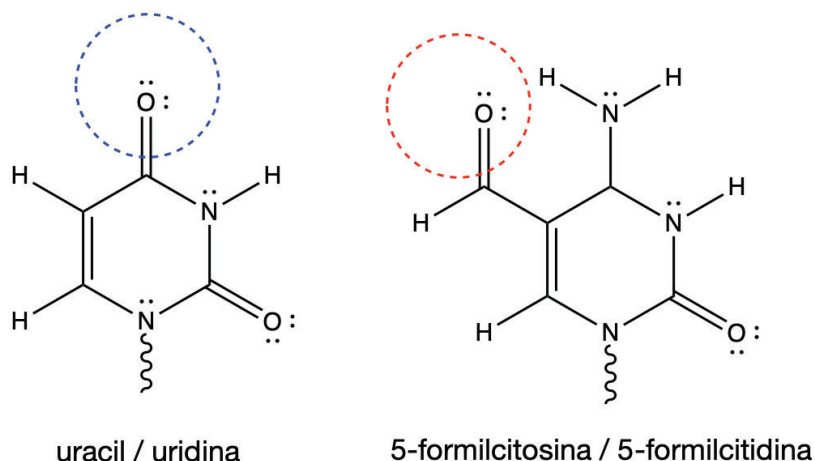


Figura 128. Parentesc estructural de les cetones d'uridina i 5fdC en el reconeixement molecular per hCNT2. Analogia i reciprocitat dels grups cetona de la posició 4 d'uridina o uracil i del grup formil de la posició 5 de 5fdC en relació al reconeixement molecular de sengles nucleòsids per part del transportador concentratiu de nucleòsids específic de purines hCNT2.

En últim terme, en relació al transportador hOCT1, podria inferir-se que o bé no existeix un efecte directe d'hOCT1 sobre la citotoxicitat exercida per la 5fdC després de la seva conversió al seu metabòlit actiu per part de CDA o bé si existeix algun tipus d'efecte, aquest no té lloc de forma directa sobre el mecanisme d'acció del propi nucleòsid sinó sobre la seva translocació mitjançada per hENT1. En tant que en base al que s'observa sense inhibició d'hENT1 amb dipiridamol (**Figura 100**) es podria suggerir que hOCT1 efectivament podria exercir algun tipus d'efecte en l'activitat de 5fdC donat que és realment diferent a allò que s'observa en cèl·lules HEK293-pcDNA5 (**Figura 88**) en què no hi ha ni molt menys una mortalitat cel·lular tan pronunciada com en presència d'hOCT1. Considerant conjuntament aquestes diverses observacions, podria pressuposar-se que hOCT1 podria arribar a afectar d'alguna forma l'efecte citotòxic de 5fdC però no de forma directa i sí de manera indirecta a nivell del seu transport a través d'hENT1 (**Figures 99–100**).

Pel que fa al ruxolitinib, en base als resultats obtinguts, en principi es pot afirmar que no inhibeix la captació d'uridina per part de cap dels tres transportadors concentratius de nucleòsids i que, per tant, tampoc interaccionaria amb cap d'ells. Per una altra banda, en el cas del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1 sí que s'observa un fenomen d'inhibició pronunciada tot i no ser estadísticament significativa. L'exposició a ruxolitinib a les concentracions indicades produeix una reducció en la captació d'uridina d'aproximadament un 50% com a mínim. Per tant, en el cas d'hENT1 sí que es podria pensar que el ruxolitinib interaccionaria d'alguna manera amb aquest

transportador. En ser tots els valors de transport d'uridina notablement superiors al control sense ruxolitinib en el cas dels transportadors concentratius, podrien elaborar-se dues hipòtesis diferents. La primera consistiria en una inducció del transport d'uridina a través d'hCNT1, hCNT2 i hCNT3 en presència de ruxolitinib per algun tipus d'interacció al·lostèrica d'aquest amb cadascun dels transportadors en qüestió, provocant una estimulació del transport de nucleòsid en lloc d'un fenomen d'inhibició. La segona es basaria en un augment dels nivells intracel·lulars d'uridina no degut a una inducció del transport concentratiu, sinó degut a una inhibició del seu eflux a través d'hENT1. Segons els resultats obtinguts, la realitat correspondria més aviat a la segona proposta i no pas a la primera. Les dades de transport obtingudes per a hENT1 en cèl·lules HEK293-pcDNA5 reforcen la idea que l'augment de la quantitat d'uridina intracel·lular en cèl·lules HEK293-hCNT1, HEK293-hCNT2 i HEK293-hCNT3 en presència de ruxolitinib no seria deguda a una inducció del transport concentratiu sinó a la inhibició de la sortida de la uridina translocada prèviament pel transportador concentratiu i, consegüentment, la seva acumulació intracel·lular (**Figura 113**).

Si el ruxolitinib interaccionés amb algun transportador concentratiu de nucleòsids amb major o menor afinitat, en quedar el fàrmac unit al transportador concentratiu en qüestió una part del ruxolitinib disponible en el medi de transport deixa d'estar disponible per a la seva interacció amb hENT1 i, per tant, per a la inhibició del pas d'uridina a través d'hENT1, revertint els valors de captació d'aquesta fins arribar a prop dels valors de la condició control sense ruxolitinib. Els valors d'inhibició del transport d'uridina mitjançat per hENT1 en presència de ruxolitinib 100 μM i 500 μM són sensiblement menors (és a dir, els valors de captació d'uridina són majors) en cèl·lules HEK293-hCNT1, HEK293-hCNT2 i HEK293-hCNT3 que en cèl·lules HEK293-pcDNA5. Per tant, tot i probablement no ser una interacció molt evident podria existir algun tipus d'interacció, en algun cas mínima, en un altre inexistent i un altre més notòria, del ruxolitinib amb els transportadors concentratius de nucleòsids. El cas més evident sembla ser el d'hCNT3, donat que en cèl·lules HEK293-hCNT3 el transport d'uridina a través d'hENT1 en exposició a concentracions de ruxolitinib de 100 i 500 μM és del 100% en comparació al control sense ruxolitinib. Això podria portar a pensar que en tenir hCNT3 capacitat d'unió al ruxolitinib, aquest el retiraria del medi impedit l'accés d'hENT1 al ruxolitinib i quedant, d'aquesta forma, la funció transportadora d'hENT1 inalterada en quant a translocació d'uridina es refereix. En el cas d'hCNT1 això no és tan evident com en el d'hCNT3. Tot i així, existeix una certa restauració del transport d'uridina mitjançat per hENT1 tot i haver-hi ruxolitinib 100 μM o 500 μM en el medi de transport i tot i no arribar a un 100% de reversió total de la inhibició del transport com sí que succeeix amb hCNT3. Això semblaria indicar que també el ruxolitinib podria arribar a interaccionar

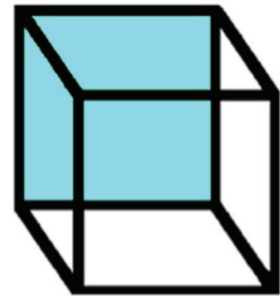
fins a cert punt amb hCNT1 però no d'una forma tan evident com podria succeir amb hCNT3. Pel contrari, el transportador amb el que menys tindria lloc aquest fenomen d'atenuació de la inhibició d'hENT1 per part del ruxolitinib a causa de la unió d'aquest al transportador concentratiu i la seva conseqüent retirada per esdevenir accessible a hENT1, seria hCNT2. En cèl·lules HEK293–hCNT2 la inhibició de la translocació d'uridina mitjançada per hENT1 és de l'ordre del 50% per ambdues concentracions de ruxolitinib, només que en aquest cas amb un error molt menor i a més amb diferències estadísticament significatives respecte el control sense ruxolitinib, fet que reforça la idea que en presència d'hCNT2 l'efecte inhibitori del ruxolitinib sobre hENT1 té lloc independentment de hCNT2. En altres paraules, la inhibició d'hENT1 per part del ruxolitinib roman de forma totalment impassible a la presència abundant d'hCNT2 a la membrana plasmàtica de les cèl·lules, fet que semblaria indicar que no existeix cap mena de reconeixement molecular del ruxolitinib per part d'hCNT2. En definitiva, l'ordre de preferència del ruxolitinib per la seva interacció amb els diversos transportadors de nucleòsids vindria a ser el següent: hENT1 > hCNT3 > hCNT1 > hCNT2; essent una interacció molt potent en el cas d'hENT1 i virtualment inexistent en el cas d'hCNT2 (**Figura 115**).

En presència d'hCNT3 l'efecte d'augment dels nivells intracel·lulars d'uridina com a conseqüència de la seva translocació per part d'hCNT3 no és degut a un procés d'inducció d'aquest transportador per part de dipiridamol o ruxolitinib, sinó que seria el bloqueig de l'eflux d'uridina a nivell d'hENT1 produït precisament per dipiridamol o per ruxolitinib, o per ambdós, el que donaria lloc a l'acumulació intracel·lular del nucleòsid. Front aquest fenomen d'acumulació, el transportador concentratiu en qüestió, en aquest cas hCNT3, segueix fent la seva tasca, concentrar nucleòsid al citoplasma independentment de si aquest és acumulat o no i amb independència de quant nucleòsid s'acumula. No existeixen diferències en quant a l'augment d'uridina intracel·lular acumulada per hCNT3 en funció de si el fàrmac utilitzat és dipiridamol, ruxolitinib o tots dos junts. Pel que fa al transport d'uridina per hENT1 en presència d'hCNT3 sense capacitat de translocació a les cèl·lules, és a dir, analitzant únicament les dades de transport amb medi de transport sense sodi i amb colina, no s'observen diferències en cap cas, ni entre els tres tractaments ni tampoc amb el control (**Figura 118**).

En cèl·lules que tenen hENT1 com únic mecanisme de transport de gemcitabina, cèl·lules HEK293–pcDNA5, el tractament amb ruxolitinib els confereix resistència a la gemcitabina a nivell del bloqueig del seu pas mitjançat per hENT1 (**Figura 120**). En canvi, a diferència del que succeeix amb hENT1, el ruxolitinib sensibilitza les cèl·lules amb hCNT1 al tractament amb

gemcitabina. En aquest cas hENT1 en lloc d'actuar com a únic mecanisme d'entrada de gemcitabina, actua com a mecanisme compensatori de sortida de la gemcitabina que és prèviament internalitzada més eficientment per hCNT1. Per tant, aquest fenomen de sensibilització probablement es podria deure a que en inhibir el ruxolitinib la sortida de gemcitabina a través d'hENT1, els nivells de gemcitabina al citoplasma són més elevats i dona lloc a una intensificació en el seu efecte farmacològic de mort cel·lular (**Figura 121**). En un sistema on conviuen els transportadors hCNT3 i hENT1, el ruxolitinib exerceix un important fenomen de potenciació sobre l'efecte farmacològic de la gemcitabina. Igual que es suggereix amb hCNT1, només que aquí d'una forma molt més clara, el ruxolitinib inhibiria la sortida de la gemcitabina prèviament interioritzada per hCNT3 resultant en una acumulació intracel·lular de gemcitabina que suposa un efecte de mort cel·lular molt més pronunciat que en absència de ruxolitinib (**Figura 122**).

La interacció del ruxolitinib amb el transportador equilibratiu hENT1 descrita en aquest treball permet obrir un ventall de noves possibilitats d'abordatge terapèutic basades en la combinació del ruxolitinib amb fàrmacs que utilitzin aquest transportador, ja sigui com a via d'entrada o, sobretot, com a mecanisme de sortida resultant en l'aparició de fenòmens de resistència al tractament (**Molina-Arcas et al., 2006; Jordheim et al., 2013**). La combinació del ruxolitinib amb fàrmacs antileucèmics pot resultar de gran interès en teràpia hematooncològica en tant que no només podria potenciar el mecanisme d'acció farmacològica primari de l'anticancerós en qüestió que té la mort de les cèl·lules tumorals proliferatives com a diana terapèutica (**Robak, 2011**), sinó que, a més, permetria reduir la producció de noves cèl·lules sanguínies a nivell de la inhibició de la via de senyalització JAK-STAT portada a terme pel propi ruxolitinib (**Quintas-Cardama et al., 2010b**).

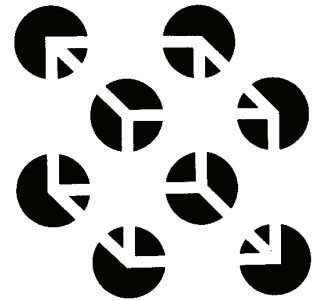


Conclusions

Conclusions

1. Els nucleòsids naturals no canònics, o nucleòsids epigenètics, interaccionen amb els transportadors de nucleòsids, de tal forma que aquests darrers són determinants en la biodisponibilitat i l'acció farmacològica dels primers.
2. L'entorn químic generat al voltant del substituent de la posició 5 dels nucleòsids epigenètics determina el seu reconeixement per part dels transportadors de nucleòsids.
3. Els nucleòsids epigenètics són millor reconeguts per hCNT3 que per hCNT1, els nucleòsids epigenètics de citosina són millor reconeguts que els d'uracil, i els nucleòsids formilats interaccionen millor que els nucleòsids hidroximetilats.
4. Existeixen dues associacions nucleòsid epigenètic – transportador de nucleòsids preferents clares i evidents: 5hmdC i hCNT1, i 5fdC i hENT1.
5. Per primera vegada, es descriu la interacció d'un nucleòsid de citosina, 5fdC, amb el transportador específic de purines hCNT2. Aquest reconeixement molecular inèdit podria donar-se com a conseqüència del reconeixement de la cetona del grup formil de 5fdC que actuaria com a determinant estructural substituït de la cetona de la posició 4 de la uridina, que sí és reconeguda per hCNT2.
6. Existeix la possibilitat que la 5fdC sigui activa farmacològicament mitjançant un mecanisme d'acció alternatiu independent de l'activitat citidina desaminasa a concentracions més altes.
7. El transportador de cations orgànics hOCT1 podria jugar un paper important, mitjançant algun mecanisme encara desconegut, en l'acció farmacològica de la 5hmdC mitjançada per hCNT1 i de la 5fdC mitjançada per hENT1, ambdues en presència de citidina desaminasa.
8. Es proposen possibles mecanismes d'interacció dels nucleòsids 5mdC, 5hmdC, 5fdC, 5cadC i 5hmdU amb els transportadors de nucleòsids vcCNT i hENT1 a nivell de sengles determinants estructurals a escala molecular.

9. El ruxolitinib és reconegut molecularment i interacciona amb el transportador de nucleòsids hENT1; en canvi, no interacciona els transportadors hCNT1, hCNT2, hCNT3 i hOCT1.
10. El ruxolitinib modula de manera dual l'activitat farmacològica de la gemcitabina mitjançant la inhibició d'hENT1: induint resistència al tractament en cèl·lules amb hENT1 com únic sistema de transport i potenciant-la en cèl·lules amb altres vies d'entrada de gemcitabina com hCNT1 o hCNT3.
11. El ruxolitinib i el dipiridamol no tenen capacitat d'actuar de forma sinèrgica en quant al blocatge d'hENT1.
12. Es proposa un model molecular d'interacció entre el ruxolitinib i el transportador de nucleòsids hENT1.



Referències

A

- Abbracchio, M. P., & Burnstock, G. (1998). Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*, 78(2), 113-145. doi:10.1254/jjp.78.113
- Abdulla, P., & Coe, I. R. (2007). Characterization and functional analysis of the promoter for the human equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 26(1), 99-110. doi:10.1080/15257770601052331
- Abebe, W., & Mustafa, S. J. (1998). A1 adenosine receptor-mediated Ins(1,4,5)P3 generation in allergic rabbit airway smooth muscle. *Am J Physiol*, 275(5), L990-997. doi:10.1152/ajplung.1998.275.5.L990
- Acimovic, Y., & Coe, I. R. (2002). Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 19(12), 2199-2210. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a004044
- Ackley, M. A., Governo, R. J., Cass, C. E., Young, J. D., Baldwin, S. A., & King, A. E. (2003). Control of glutamatergic neurotransmission in the rat spinal dorsal horn by the nucleoside transporter ENT1. *J Physiol*, 548(Pt 2), 507-517. doi:10.1113/jphysiol.2002.038091
- Adjei, A. A., & Yamamoto, S. (1995). A dietary nucleoside-nucleotide mixture inhibits endotoxin-induced bacterial translocation in mice fed protein-free diet. *J Nutr*, 125(1), 42-48. doi:10.1093/jn/125.1.42
- Agarwal, R. P., & Olivero, O. A. (1997). Genotoxicity and mitochondrial damage in human lymphocytic cells chronically exposed to 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine. *Mutat Res*, 390(3), 223-231. doi:10.1016/s1383-5718(97)00014-4
- Agarwal, R. P., Robison, B., & Parks, R. E., Jr. (1978). Nucleoside diphosphokinase from human erythrocytes. *Methods Enzymol*, 51, 376-386. doi:10.1016/s0076-6879(78)51051-3
- Aguayo, C., Casado, J., Gonzalez, M., Pearson, J. D., Martin, R. S., Casanello, P., . . . Sobrevia, L. (2005). Equilibrative nucleoside transporter 2 is expressed in human umbilical vein endothelium, but is not involved in the inhibition of adenosine transport induced by hyperglycaemia. *Placenta*, 26(8-9), 641-653. doi:10.1016/j.placenta.2004.10.006
- Ahlin, G., Chen, L., Lazorova, L., Chen, Y., Ianculescu, A. G., Davis, R. L., . . . Artursson, P. (2011). Genotype-dependent effects of inhibitors of the organic cation transporter, OCT1: predictions of metformin interactions. *Pharmacogenomics J*, 11(6), 400-411. doi:10.1038/tpj.2010.54
- Ahluwalia, A., Yan, P., Hurteau, J. A., Bigsby, R. M., Jung, S. H., Huang, T. H., & Nephew, K. P. (2001). DNA methylation and ovarian cancer. I. Analysis of CpG island hypermethylation in human ovarian cancer using differential methylation hybridization. *Gynecol Oncol*, 82(2), 261-268. doi:10.1006/gyno.2001.6291
- Airaksinen, A., Pariente, N., Menendez-Arias, L., & Domingo, E. (2003). Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology*, 311(2), 339-349. doi:10.1016/s0042-6822(03)00144-2
- Aird, K. M., & Zhang, R. (2015). Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and cancer. *Cancer Lett*, 356(2 Pt A), 204-210. doi:10.1016/j.canlet.2014.01.017
- Al Safarjalani, O. N., Naguib, F. N., & El Kouni, M. H. (2003). Uptake of nitrobenzylthioinosine and purine beta-L-nucleosides by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(10), 3247-3251. doi:10.1128/aac.47.10.3247-3251.2003
- Alberge, J. B., Magrangeas, F., Wagner, M., Denie, S., Guerin-Charbonnel, C., Campion, L., . . . Serandour, A. A. (2020). DNA hydroxymethylation is associated with disease severity and persists at enhancers of oncogenic regions in multiple myeloma. *Clin Epigenetics*, 12(1), 163. doi:10.1186/s13148-020-00953-y
- Alvarado, Y., Kantarjian, H. M., Cortes, J. E., Apostolidou, E., Bivins, C., & Giles, F. J. (2002). Troxacitabine activity in extramedullary myeloid leukemia. *Hematology*, 7(3), 179-185. doi:10.1080/1024533021000008155

- An, J., Gonzalez-Avalos, E., Chawla, A., Jeong, M., Lopez-Moyado, I. F., Li, W., . . . Rao, A. (2015). Acute loss of TET function results in aggressive myeloid cancer in mice. *Nat Commun*, 6, 10071. doi:10.1038/ncomms10071
- An, S., Kumar, R., Sheets, E. D., & Benkovic, S. J. (2008). Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science*, 320(5872), 103-106. doi:10.1126/science.1152241
- Anderson, C. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., Cass, C. E., & Parkinson, F. E. (1999). Distribution of mRNA encoding a nitrobenzylthioinosine-insensitive nucleoside transporter (ENT2) in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 70(2), 293-297. doi:10.1016/s0169-328x(99)00164-3
- Anderson, C. M., Xiong, W., Geiger, J. D., Young, J. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Parkinson, F. E. (1999). Distribution of equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporters (ENT1) in brain. *J Neurochem*, 73(2), 867-873. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0730867.x
- Anderson, C. M., Xiong, W., Young, J. D., Cass, C. E., & Parkinson, F. E. (1996). Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 42(2), 358-361. doi:10.1016/s0169-328x(96)00244-6
- Anderson, P. L., Kakuda, T. N., & Lichtenstein, K. A. (2004). The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clin Infect Dis*, 38(5), 743-753. doi:10.1086/381678
- Angelakos, E. T., & Glassman, P. M. (1961). Cardiovascular action of adenosine and other nucleosides. *Proc Soc Exp Biol Med*, 106, 762-763. doi:10.3181/00379727-106-26467
- Angus, S. P., Wheeler, L. J., Ranmal, S. A., Zhang, X., Markey, M. P., Mathews, C. K., & Knudsen, E. S. (2002). Retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. *J Biol Chem*, 277(46), 44376-44384. doi:10.1074/jbc.M205911200
- Aran, J. M., & Plagemann, P. G. (1992). Nucleoside transport-deficient mutants of PK-15 pig kidney cell line. *Biochim Biophys Acta*, 1110(1), 51-58. doi:10.1016/0005-2736(92)90293-u
- Arastu-Kapur, S., Arendt, C. S., Purnat, T., Carter, N. S., & Ullman, B. (2005). Second-site suppression of a nonfunctional mutation within the *Leishmania donovani* inosine-guanosine transporter. *J Biol Chem*, 280(3), 2213-2219. doi:10.1074/jbc.M408224200
- Arimany-Nardi, C., Claudio-Montero, A., Viel-Oliva, A., Schmidtke, P., Estarellas, C., Barril, X., . . . Pastor-Anglada, M. (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(6), 1980-1987. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00085
- Arimany-Nardi, C., Errasti-Murugarren, E., Minuesa, G., Martinez-Picado, J., Gorboulev, V., Koepsell, H., & Pastor-Anglada, M. (2014). Nucleoside transporters and human organic cation transporter 1 determine the cellular handling of DNA-methyltransferase inhibitors. *Br J Pharmacol*, 171(16), 3868-3880. doi:10.1111/bph.12748
- Arimany-Nardi, C., Minuesa, G., Keller, T., Erkizia, I., Koepsell, H., Martinez-Picado, J., & Pastor-Anglada, M. (2016). Role of Human Organic Cation Transporter 1 (hOCT1) Polymorphisms in Lamivudine (3TC) Uptake and Drug-Drug Interactions. *Front Pharmacol*, 7, 175. doi:10.3389/fphar.2016.00175
- Arner, E. S., & Eriksson, S. (1995). Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther*, 67(2), 155-186. doi:10.1016/0163-7258(95)00015-9
- Arner, E. S., Flygar, M., Bohman, C., Wallstrom, B., & Eriksson, S. (1988). Deoxycytidine kinase is constitutively expressed in human lymphocytes: consequences for compartmentation effects, unscheduled DNA synthesis, and viral replication in resting cells. *Exp Cell Res*, 178(2), 335-342. doi:10.1016/0014-4827(88)90403-x
- Arner, E. S., Spasokoukotskaja, T., Juliusson, G., Liliemark, J., & Eriksson, S. (1994). Phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine (CdA) in extracts of peripheral blood

- mononuclear cells of leukaemic patients. *Br J Haematol*, 87(4), 715-718. doi:10.1111/j.1365-2141.1994.tb06728.x
- Austin, W. R., Armijo, A. L., Campbell, D. O., Singh, A. S., Hsieh, T., Nathanson, D., . . . Radu, C. G. (2012). Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *J Exp Med*, 209(12), 2215-2228. doi:10.1084/jem.20121061
- Avery, T. L., Rehg, J. E., Lumm, W. C., Harwood, F. C., Santana, V. M., & Blakley, R. L. (1989). Biochemical pharmacology of 2-chlorodeoxyadenosine in malignant human hematopoietic cell lines and therapeutic effects of 2-bromodeoxyadenosine in drug combinations in mice. *Cancer Res*, 49(18), 4972-4978.
- Avramis, V. I., Wiersma, S., Krailo, M. D., Ramilo-Torno, L. V., Sharpe, A., Liu-Mares, W., . . . Sato, J. K. (1998). Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of fludarabine and cytosine arabinoside administered as loading boluses followed by continuous infusions after a phase I/II study in pediatric patients with relapsed leukemias. The Children's Cancer Group. *Clin Cancer Res*, 4(1), 45-52.
- Axelrad, J. E., Roy, A., Lawlor, G., Korelitz, B., & Lichtiger, S. (2016). Thiopurines and inflammatory bowel disease: Current evidence and a historical perspective. *World J Gastroenterol*, 22(46), 10103-10117. doi:10.3748/wjg.v22.i46.10103
- Aymerich, I., Duflot, S., Fernandez-Veledo, S., Guillen-Gomez, E., Huber-Ruano, I., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2005). The concentrative nucleoside transporter family (SLC28): new roles beyond salvage? *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 1), 216-219. doi:10.1042/BST0330216
- Aymerich, I., Foufelle, F., Ferre, P., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2006). Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *J Cell Sci*, 119(Pt 8), 1612-1621. doi:10.1242/jcs.02865
- Aymerich, I., Pastor-Anglada, M., & Casado, F. J. (2004). Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. *J Gen Physiol*, 124(5), 505-512. doi:10.1085/jgp.200409086

B

- Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Burgess, H. E., Iurlaro, M., Reik, W., . . . Balasubramanian, S. (2015). 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nat Chem Biol*, 11(8), 555-557. doi:10.1038/nchembio.1848
- Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., & Balasubramanian, S. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat Chem*, 6(12), 1049-1055. doi:10.1038/nchem.2064
- Badagnani, I., Chan, W., Castro, R. A., Brett, C. M., Huang, C. C., Stryke, D., . . . Giacomini, K. M. (2005). Functional analysis of genetic variants in the human concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3; SLC28A3). *Pharmacogenomics J*, 5(3), 157-165. doi:10.1038/sj.tpj.6500303
- Bai, L., Yamaguchi, M., Tatsumi, M., Kon, K., & Brautigam, M. (1998). Mechanisms responsible for resistance of sublines derived from leukemia cell lines to an antitumor agent 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124(7), 367-373. doi:10.1007/s004320050185
- Baldwin, S. A., Beal, P. R., Yao, S. Y., King, A. E., Cass, C. E., & Young, J. D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*, 447(5), 735-743. doi:10.1007/s00424-003-1103-2
- Baldwin, S. A., Mackey, J. R., Cass, C. E., & Young, J. D. (1999). Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today*, 5(5), 216-224. doi:10.1016/S1357-4310(99)01459-8
- Baldwin, S. A., Yao, S. Y., Hyde, R. J., Ng, A. M., Foppolo, S., Barnes, K., . . . Young, J. D. (2005). Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside

- transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem*, 280(16), 15880-15887. doi:10.1074/jbc.M414337200
- Balnave, K., Neill, J. D., Russell, C. J., Harron, D. W., Leahey, W. J., Wilson, R., & Shanks, R. G. (1981). Observation on the efficacy and pharmacokinetics of betaxolol (SL 75212), a cardioselective beta-adrenoceptor blocking drug. *Br J Clin Pharmacol*, 11(2), 171-180. doi:10.1111/j.1365-2125.1981.tb01121.x
- Balon, T. W., & Nadler, J. L. (1994). Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* (1985), 77(6), 2519-2521. doi:10.1152/jappl.1994.77.6.2519
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21(3), 381-395. doi:10.1038/cr.2011.22
- Bardeleben, C., Sharma, S., Reeve, J. R., Bassilian, S., Frost, P., Hoang, B., . . . Lichtenstein, A. (2013). Metabolomics identifies pyrimidine starvation as the mechanism of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-ribose-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther*, 12(7), 1310-1321. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-1042
- Bardenheuer, W., Lehmborg, K., Rattmann, I., Brueckner, A., Schneider, A., Sorg, U. R., . . . Flasshove, M. (2005). Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*, 19(12), 2281-2288. doi:10.1038/sj.leu.2403977
- Bareyt, S., & Carell, T. (2008). Selective detection of 5-methylcytosine sites in DNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(1), 181-184. doi:10.1002/anie.200702159
- Barfeld, S. J., Fazli, L., Persson, M., Marjavaara, L., Urbanucci, A., Kaukoniemi, K. M., . . . Mills, I. G. (2015). Myc-dependent purine biosynthesis affects nucleolar stress and therapy response in prostate cancer. *Oncotarget*, 6(14), 12587-12602. doi:10.18632/oncotarget.3494
- Barnes, K., Dobrzynski, H., Foppolo, S., Beal, P. R., Ismat, F., Scullion, E. R., . . . Baldwin, S. A. (2006). Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ Res*, 99(5), 510-519. doi:10.1161/01.RES.0000238359.18495.42
- Bartlett, G. R., & Bucolo, G. (1968). The metabolism of ribonucleoside by the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta*, 156(2), 240-253. doi:10.1016/0304-4165(68)90253-5
- Bartrons, R., Van Schaftingen, E., & Hers, H. G. (1984). The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. A cyclic AMP-mediated effect. *Biochem J*, 218(1), 157-163. doi:10.1042/bj2180157
- Baukrowitz, T., & Fakler, B. (2000). KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem*, 267(19), 5842-5848. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01672.x
- Becker, S., Schneider, C., Crisp, A., & Carell, T. (2018). Non-canonical nucleosides and chemistry of the emergence of life. *Nat Commun*, 9(1), 5174. doi:10.1038/s41467-018-07222-w
- Bednarczyk, D., Ekins, S., Wikel, J. H., & Wright, S. H. (2003). Influence of molecular structure on substrate binding to the human organic cation transporter, hOCT1. *Mol Pharmacol*, 63(3), 489-498. doi:10.1124/mol.63.3.489
- Belt, J. A., Marina, N. M., Phelps, D. A., & Crawford, C. R. (1993). Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Adv Enzyme Regul*, 33, 235-252. doi:10.1016/0065-2571(93)90021-5
- Ben-Sahra, I., Howell, J. J., Asara, J. M., & Manning, B. D. (2013). Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*, 339(6125), 1323-1328. doi:10.1126/science.1228792
- Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S. J. H., Asara, J. M., & Manning, B. D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*, 351(6274), 728-733. doi:10.1126/science.aad0489

- Benitah, S. A., Bracken, A., Dou, Y., Huangfu, D., Ivanova, N., Koseki, H., . . . Xu, G. L. (2014). Stem cell epigenetics: looking forward. *Cell Stem Cell*, 14(6), 706-709. doi:10.1016/j.stem.2014.05.011
- Bester, A. C., Roniger, M., Oren, Y. S., Im, M. M., Sarni, D., Chaoat, M., . . . Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell*, 145(3), 435-446. doi:10.1016/j.cell.2011.03.044
- Bhalla, K., Nayak, R., & Grant, S. (1984). Isolation and characterization of a deoxycytidine kinase-deficient human promyelocytic leukemic cell line highly resistant to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res*, 44(11), 5029-5037.
- Bhutia, Y. D., Hung, S. W., Patel, B., Lovin, D., & Govindarajan, R. (2011). CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 71(5), 1825-1835. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2736
- Bianchi, V., & Spychala, J. (2003). Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem*, 278(47), 46195-46198. doi:10.1074/jbc.R300032200
- Bicket, A., & Coe, I. R. (2016). N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function. *Biosci Rep*, 36(4). doi:10.1042/BSR20160063
- Bicket, A., Mehrabi, P., Naydenova, Z., Wong, V., Donaldson, L., Stagljar, I., & Coe, I. R. (2016). Novel regulation of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) by receptor-stimulated Ca²⁺-dependent calmodulin binding. *Am J Physiol Cell Physiol*, 310(10), C808-820. doi:10.1152/ajpcell.00243.2015
- Billam, M., Sobolewski, M. D., & Davidson, N. E. (2010). Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 120(3), 581-592. doi:10.1007/s10549-009-0420-3
- Bjelland, S., Eide, L., Time, R. W., Stote, R., Eftedal, I., Volden, G., & Seeberg, E. (1995). Oxidation of thymine to 5-formyluracil in DNA: mechanisms of formation, structural implications, and base excision by human cell free extracts. *Biochemistry*, 34(45), 14758-14764. doi:10.1021/bi00045a017
- Blaschke, K., Ebata, K. T., Karimi, M. M., Zepeda-Martinez, J. A., Goyal, P., Mahapatra, S., . . . Ramalho-Santos, M. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 500(7461), 222-226. doi:10.1038/nature12362
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633-1649. doi:10.1002/pmic.200300771
- Bochtler, M., Kolano, A., & Xu, G. L. (2017). DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *Bioessays*, 39(1), 1-13. doi:10.1002/bies.201600178
- Bofill, M., Fairbanks, L. D., Ruckemann, K., Lipman, M., & Simmonds, H. A. (1995). T-lymphocytes from AIDS patients are unable to synthesize ribonucleotides de novo in response to mitogenic stimulation. Impaired pyrimidine responses are already evident at early stages of HIV-1 infection. *J Biol Chem*, 270(50), 29690-29697.
- Bogdanovic, O., Smits, A. H., de la Calle Mustienes, E., Tena, J. J., Ford, E., Williams, R., . . . Lister, R. (2016). Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet*, 48(4), 417-426. doi:10.1038/ng.3522
- Boleti, H., Coe, I. R., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (1997). Molecular identification of the equilibrative NBMPR-sensitive (es) nucleoside transporter and demonstration of an equilibrative NBMPR-insensitive (ei) transport activity in human erythroleukemia (K562) cells. *Neuropharmacology*, 36(9), 1167-1179. doi:10.1016/s0028-3908(97)00136-6
- Bolze, A., Abhyankar, A., Grant, A. V., Patel, B., Yadav, R., Byun, M., . . . Casanova, J. L. (2012). A mild form of SLC29A3 disorder: a frameshift deletion leads to the paradoxical translation of an otherwise noncoding mRNA splice variant. *PLoS One*, 7(1), e29708. doi:10.1371/journal.pone.0029708

- Bone, D. B., Robillard, K. R., Stolk, M., & Hammond, J. R. (2007). Differential regulation of mouse equilibrative nucleoside transporter 1 (mENT1) splice variants by protein kinase CK2. *Mol Membr Biol*, 24(4), 294-303. doi:10.1080/09687860701210617
- Boorstein, R. J., Chiu, L. N., & Teebor, G. W. (1992). A mammalian cell line deficient in activity of the DNA repair enzyme 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase is resistant to the toxic effects of the thymidine analog 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine. *Mol Cell Biol*, 12(12), 5536-5540. doi:10.1128/mcb.12.12.5536
- Booth, M. J., Branco, M. R., Ficzc, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., & Balasubramanian, S. (2012). Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science*, 336(6083), 934-937. doi:10.1126/science.1220671
- Booth, M. J., Raiber, E. A., & Balasubramanian, S. (2015). Chemical methods for decoding cytosine modifications in DNA. *Chem Rev*, 115(6), 2240-2254. doi:10.1021/cr5002904
- Bostick, M., Kim, J. K., Esteve, P. O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, 317(5845), 1760-1764. doi:10.1126/science.1147939
- Bouchard, J., & Momparler, R. L. (1983). Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase. *Mol Pharmacol*, 24(1), 109-114.
- Bouffard, D. Y., & Momparler, R. L. (1995). Comparison of the induction of apoptosis in human leukemic cell lines by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and cytosine arabinoside. *Leuk Res*, 19(11), 849-856. doi:10.1016/0145-2126(95)00067-4
- Boyle, D. L., Kowaluk, E. A., Jarvis, M. F., Lee, C. H., Bhagwat, S. S., Williams, M., & Firestein, G. S. (2001). Anti-inflammatory effects of ABT-702, a novel non-nucleoside adenosine kinase inhibitor, in rat adjuvant arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(2), 495-500.
- Brast, S., Grabner, A., Sucic, S., Sitte, H. H., Hermann, E., Pavenstadt, H., . . . Ciarimboli, G. (2012). The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization. *FASEB J*, 26(3), 976-986. doi:10.1096/fj.11-180679
- Brazauskas, P., & Kriaucionis, S. (2014). DNA modifications: Another stable base in DNA. *Nat Chem*, 6(12), 1031-1033. doi:10.1038/nchem.2115
- Brett, C. M., Washington, C. B., Ott, R. J., Gutierrez, M. M., & Giacomini, K. M. (1993). Interaction of nucleoside analogues with the sodium-nucleoside transport system in brush border membrane vesicles from human kidney. *Pharm Res*, 10(3), 423-426. doi:10.1023/a:1018948608211
- Brockman, R. W., Schabel, F. M., Jr., & Montgomery, J. A. (1977). Biologic activity of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine, a metabolically stable analog of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine. *Biochem Pharmacol*, 26(22), 2193-2196. doi:10.1016/0006-2952(77)90275-1
- Brown, N. C., & Reichard, P. (1969). Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J Mol Biol*, 46(1), 39-55. doi:10.1016/0022-2836(69)90056-4
- Brown, N. C., & Reichard, P. (1969). Ribonucleoside diphosphate reductase. Formation of active and inactive complexes of proteins B1 and B2. *J Mol Biol*, 46(1), 25-38. doi:10.1016/0022-2836(69)90055-2
- Brueckner, B., Kuck, D., & Lyko, F. (2007). DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J*, 13(1), 17-22. doi:10.1097/PPO.0b013e31803c7245
- Buel, G. R., Kim, S. G., & Blenis, J. (2013). mTORC1 signaling aids in CADalyzing pyrimidine biosynthesis. *Cell Metab*, 17(5), 633-635. doi:10.1016/j.cmet.2013.04.018
- Buj, R., & Aird, K. M. (2018). Deoxyribonucleotide Triphosphate Metabolism in Cancer and Metabolic Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 177. doi:10.3389/fendo.2018.00177
- Bulter, T., & Elling, L. (1999). Enzymatic synthesis of nucleotide sugars. *Glycoconj J*, 16(2), 147-159. doi:10.1023/a:1026444726698

- Burnstock, G. (1997). The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*, 36(9), 1127-1139. doi:10.1016/s0028-3908(97)00125-1
- Burnstock, G. (2009). Purinergic regulation of vascular tone and remodelling. *Auton Autacoid Pharmacol*, 29(3), 63-72. doi:10.1111/j.1474-8673.2009.00435.x
- Busch, A. E., Karbach, U., Miska, D., Gorboulev, V., Akhoundova, A., Volk, C., . . . Koepsell, H. (1998). Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharmacol*, 54(2), 342-352. doi:10.1124/mol.54.2.342
- Buxton, D. B., Fisher, R. A., Robertson, S. M., & Olson, M. S. (1987). Stimulation of glycogenolysis and vasoconstriction by adenosine and adenosine analogues in the perfused rat liver. *Biochem J*, 248(1), 35-41. doi:10.1042/bj2480035
- Bzowska, A., Kulikowska, E., & Shugar, D. (2000). Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 88(3), 349-425. doi:10.1016/s0163-7258(00)00097-8

C

- Cabrita, M. A., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (2002). Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem Cell Biol*, 80(5), 623-638. doi:10.1139/o02-153
- Cai, J., & Lee, C. W. (1996). Tamoxifen inhibits nitrobenzylthioinosine-sensitive equilibrative uridine transport in human MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J*, 320 (Pt 3), 991-995. doi:10.1042/bj3200991
- Camara, Y., Gonzalez-Vioque, E., Scarpelli, M., Torres-Torronteras, J., Caballero, A., Hirano, M., & Marti, R. (2014). Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet*, 23(9), 2459-2467. doi:10.1093/hmg/ddt641
- Camara, Y., Gonzalez-Vioque, E., Scarpelli, M., Torres-Torronteras, J., & Marti, R. (2013). Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to rescue mitochondrial DNA. *Drug Discov Today*, 18(19-20), 950-957. doi:10.1016/j.drudis.2013.06.009
- Cano-Soldado, P., Gorraitz, E., Errasti-Murugarren, E., Casado, F. J., Lostao, M. P., & Pastor-Anglada, M. (2012). Functional analysis of the human concentrative nucleoside transporter-1 variant hCNT1S546P provides insight into the sodium-binding pocket. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302(1), C257-266. doi:10.1152/ajpcell.00198.2011
- Cano-Soldado, P., Llorayoz, I. M., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., Martinez-Picado, J., Lostao, M. P., & Pastor-Anglada, M. (2004). Interaction of nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with the concentrative nucleoside transporter-1 (SLC28A1). *Antivir Ther*, 9(6), 993-1002.
- Cano-Soldado, P., Molina-Arcas, M., Alguero, B., Larrayoz, I., Lostao, M. P., Grandas, A., . . . Pastor-Anglada, M. (2008). Compensatory effects of the human nucleoside transporters on the response to nucleoside-derived drugs in breast cancer MCF7 cells. *Biochem Pharmacol*, 75(3), 639-648. doi:10.1016/j.bcp.2007.10.005
- Cano-Soldado, P., & Pastor-Anglada, M. (2012). Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. *Med Res Rev*, 32(2), 428-457. doi:10.1002/med.20221
- Cansev, M. (2006). Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain Res Rev*, 52(2), 389-397. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.05.001
- Cantor, J. R., & Sabatini, D. M. (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov*, 2(10), 881-898. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0345
- Caras, I. W., & Martin, D. W., Jr. (1988). Molecular cloning of the cDNA for a mutant mouse ribonucleotide reductase M1 that produces a dominant mutator phenotype in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 8(7), 2698-2704. doi:10.1128/mcb.8.7.2698

- Carell, T. (2015). DNA Repair. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54(51), 15330-15333. doi:10.1002/anie.201509770
- Carell, T., Brandmayr, C., Hienzsch, A., Muller, M., Pearson, D., Reiter, V., . . . Wagner, M. (2012). Structure and function of noncanonical nucleobases. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(29), 7110-7131. doi:10.1002/anie.201201193
- Carell, T., Kurz, M. Q., Müller, M., Rossa, M., & Spada, F. (2018). Non-canonical Bases in the Genome: The Regulatory Information Layer in DNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 57(16), 4296-4312. doi:10.1002/anie.201708228
- Cartee, L., & Kucera, G. L. (1998). Gemcitabine induces programmed cell death and activates protein kinase C in BG-1 human ovarian cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 41(5), 403-412. doi:10.1007/s002800050758
- Casado, F. J., Lostao, M. P., Aymerich, I., Larrayoz, I. M., Dufлот, S., Rodriguez-Mulero, S., & Pastor-Anglada, M. (2002). Nucleoside transporters in absorptive epithelia. *J Physiol Biochem*, 58(4), 207-216. doi:10.1007/BF03179858
- Casanello, P., Torres, A., Sanhueza, F., Gonzalez, M., Farias, M., Gallardo, V., . . . Sobrevia, L. (2005). Equilibrative nucleoside transporter 1 expression is downregulated by hypoxia in human umbilical vein endothelium. *Circ Res*, 97(1), 16-24. doi:10.1161/01.RES.0000172568.49367.f8
- Cass, C. E., Young, J. D., Baldwin, S. A., Cabrita, M. A., Graham, K. A., Griffiths, M., . . . Yao, S. Y. (1999). Nucleoside transporters of mammalian cells. *Pharm Biotechnol*, 12, 313-352. doi:10.1007/0-306-46812-3_12
- Catala, A., Pastor-Anglada, M., Caviedes-Cardenas, L., Malatesta, R., Rives, S., Vega-Garcia, N., . . . Fernandez-Calotti, P. (2016). FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia. *Oncotarget*, 7(31), 49786-49799. doi:10.18632/oncotarget.10448
- Cedar, H., & Bergman, Y. (2012). Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem*, 81, 97-117. doi:10.1146/annurev-biochem-052610-091920
- Chakravarthi, B. V., Goswami, M. T., Pathi, S. S., Dodson, M., Chandrashekar, D. S., Agarwal, S., . . . Varambally, S. (2017). Expression and Role of PAICS, a De Novo Purine Biosynthetic Gene in Prostate Cancer. *Prostate*, 77(1), 10-21. doi:10.1002/pros.23243
- Chaligne, R., Tonetti, C., Besancenot, R., Roy, L., Marty, C., Mossuz, P., . . . Giraudier, S. (2008). New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*, 22(8), 1557-1566. doi:10.1038/leu.2008.137
- Chandrasena, G., Giltay, R., Patil, S. D., Bakken, A., & Unadkat, J. D. (1997). Functional expression of human intestinal Na⁺-dependent and Na⁺-independent nucleoside transporters in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Pharmacol*, 53(12), 1909-1918. doi:10.1016/s0006-2952(97)00170-6
- Chang, C., Swaan, P. W., Ngo, L. Y., Lum, P. Y., Patil, S. D., & Unadkat, J. D. (2004). Molecular requirements of the human nucleoside transporters hCNT1, hCNT2, and hENT1. *Mol Pharmacol*, 65(3), 558-570. doi:10.1124/mol.65.3.558
- Chaudary, N., Naydenova, Z., Shuralyova, I., & Coe, I. R. (2004). The adenosine transporter, mENT1, is a target for adenosine receptor signaling and protein kinase Cepsilon in hypoxic and pharmacological preconditioning in the mouse cardiomyocyte cell line, HL-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 310(3), 1190-1198. doi:10.1124/jpet.104.067157
- Chaudary, N., Naydenova, Z., Shuralyova, I., & Coe, I. R. (2004). Hypoxia regulates the adenosine transporter, mENT1, in the murine cardiomyocyte cell line, HL-1. *Cardiovasc Res*, 61(4), 780-788. doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.031
- Chaudary, N., Shuralyova, I., Liron, T., Sweeney, G., & Coe, I. R. (2002). Transport characteristics of HL-1 cells: a new model for the study of adenosine physiology in cardiomyocytes. *Biochem Cell Biol*, 80(5), 655-665. doi:10.1139/o02-143
- Che, M., Nishida, T., Gatmaitan, Z., & Arias, I. M. (1992). A nucleoside transporter is functionally linked to ectonucleotidases in rat liver canalicular membrane. *J Biol Chem*, 267(14), 9684-9688.

- Che, M., Ortiz, D. F., & Arias, I. M. (1995). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na(+)-nucleoside cotransporter. *J Biol Chem*, 270(23), 13596-13599. doi:10.1074/jbc.270.23.13596
- Chen, C. C., Wang, K. Y., & Shen, C. K. (2013). DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *J Biol Chem*, 288(13), 9084-9091. doi:10.1074/jbc.M112.445585
- Chen, H., Kazemier, H. G., de Groote, M. L., Ruiters, M. H., Xu, G. L., & Rots, M. G. (2014). Induced DNA demethylation by targeting Ten-Eleven Translocation 2 to the human ICAM-1 promoter. *Nucleic Acids Res*, 42(3), 1563-1574. doi:10.1093/nar/gkt1019
- Chen, J., Guo, L., Zhang, L., Wu, H., Yang, J., Liu, H., . . . Pei, D. (2013). Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet*, 45(12), 1504-1509. doi:10.1038/ng.2807
- Chen, K., Zhang, J., Guo, Z., Ma, Q., Xu, Z., Zhou, Y., . . . Ci, W. (2016). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer. *Cell Res*, 26(1), 103-118. doi:10.1038/cr.2015.150
- Chen, K. C., Vannais, D. B., Jones, C., Patterson, D., & Davidson, J. N. (1989). Mapping of the gene encoding the multifunctional protein carrying out the first three steps of pyrimidine biosynthesis to human chromosome 2. *Hum Genet*, 82(1), 40-44. doi:10.1007/BF00288269
- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z., & Li, E. (2003). Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*, 23(16), 5594-5605. doi:10.1128/mcb.23.16.5594-5605.2003
- Cherry, C. L., & Wesselingh, S. L. (2003). Nucleoside analogues and HIV: the combined cost to mitochondria. *J Antimicrob Chemother*, 51(5), 1091-1093. doi:10.1093/jac/dkg203
- Chevaliez, S., Brillet, R., Lazaro, E., Hezode, C., & Pawlotsky, J. M. (2007). Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J Virol*, 81(14), 7732-7741. doi:10.1128/JVI.00382-07
- Chimploy, K., & Mathews, C. K. (2001). Mouse ribonucleotide reductase control: influence of substrate binding upon interactions with allosteric effectors. *J Biol Chem*, 276(10), 7093-7100. doi:10.1074/jbc.M006232200
- Chitrakar, I., Kim-Holzappel, D. M., Zhou, W., & French, J. B. (2017). Higher order structures in purine and pyrimidine metabolism. *J Struct Biol*, 197(3), 354-364. doi:10.1016/j.jsb.2017.01.003
- Choi, D. S., Cascini, M. G., Mailliard, W., Young, H., Paredes, P., McMahon, T., . . . Messing, R. O. (2004). The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat Neurosci*, 7(8), 855-861. doi:10.1038/nn1288
- Choi, D. S., Handa, M., Young, H., Gordon, A. S., Diamond, I., & Messing, R. O. (2000). Genomic organization and expression of the mouse equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter 1 (ENT1) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 277(1), 200-208. doi:10.1006/bbrc.2000.3665
- Chow, L., Lai, R., Dabbagh, L., Belch, A., Young, J. D., Cass, C. E., & Mackey, J. R. (2005). Analysis of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) protein in non-Hodgkin's lymphoma by immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 18(4), 558-564. doi:10.1038/modpathol.3800323
- Chu, S., Xiong, W., Zhang, D., Soylu, H., Sun, C., Albensi, B. C., & Parkinson, F. E. (2013). Regulation of adenosine levels during cerebral ischemia. *Acta Pharmacol Sin*, 34(1), 60-66. doi:10.1038/aps.2012.127
- Ciarimboli, G. (2008). Organic cation transporters. *Xenobiotica*, 38(7-8), 936-971. doi:10.1080/00498250701882482
- Cimmino, L., Dawlaty, M. M., Ndiaye-Lobry, D., Yap, Y. S., Bakogianni, S., Yu, Y., . . . Aifantis, I. (2015). TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy. *Nat Immunol*, 16(6), 653-662. doi:10.1038/ni.3148

- Clarke, M. L., Damaraju, V. L., Zhang, J., Mowles, D., Tackaberry, T., Lang, T., . . . Cass, C. E. (2006). The role of human nucleoside transporters in cellular uptake of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine and beta-D-arabinosylcytosine. *Mol Pharmacol*, 70(1), 303-310. doi:10.1124/mol.105.021543
- Cliffe, L. J., Hirsch, G., Wang, J., Ekanayake, D., Bullard, W., Hu, M., . . . Sabatini, R. (2012). JBP1 and JBP2 proteins are Fe²⁺/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases regulating hydroxylation of thymidine residues in trypanosome DNA. *J Biol Chem*, 287(24), 19886-19895. doi:10.1074/jbc.M112.341974
- Cliffe, S. T., Kramer, J. M., Hussain, K., Robben, J. H., de Jong, E. K., de Brouwer, A. P., . . . Buckley, M. F. (2009). SLC29A3 gene is mutated in pigmented hypertrichosis with insulin-dependent diabetes mellitus syndrome and interacts with the insulin signaling pathway. *Hum Mol Genet*, 18(12), 2257-2265. doi:10.1093/hmg/ddp161
- Coe, I., Zhang, Y., McKenzie, T., & Naydenova, Z. (2002). PKC regulation of the human equilibrative nucleoside transporter, hENT1. *FEBS Lett*, 517(1-3), 201-205. doi:10.1016/s0014-5793(02)02622-4
- Coe, I. R., Griffiths, M., Young, J. D., Baldwin, S. A., & Cass, C. E. (1997). Assignment of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) to 6p21.1-p21.2. *Genomics*, 45(2), 459-460. doi:10.1006/geno.1997.4928
- Cohen, A., Lee, J. W., & Gelfand, E. W. (1983). Selective toxicity of deoxyguanosine and arabinosyl guanine for T-leukemic cells. *Blood*, 61(4), 660-666.
- Collier, A. C., Coombs, R. W., Schoenfeld, D. A., Bassett, R. L., Timpone, J., Baruch, A., . . . Corey, L. (1996). Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med*, 334(16), 1011-1017. doi:10.1056/NEJM199604183341602
- Collins, K. D., & Stark, G. R. (1971). Aspartate transcarbamylase. Interaction with the transition state analogue N-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *J Biol Chem*, 246(21), 6599-6605.
- Condliffe, D., Wong, A., Troakes, C., Proitsi, P., Patel, Y., Chouliaras, L., . . . Lunnon, K. (2014). Cross-region reduction in 5-hydroxymethylcytosine in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging*, 35(8), 1850-1854. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.002
- Connolly, G. P., & Duley, J. A. (1999). Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. *Trends Pharmacol Sci*, 20(5), 218-225. doi:10.1016/s0165-6147(99)01298-5
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 38(2), 254-299. doi:10.1111/1574-6976.12065
- Coothankandaswamy, V., Elangovan, S., Singh, N., Prasad, P. D., Thangaraju, M., & Ganapathy, V. (2013). The plasma membrane transporter SLC5A8 suppresses tumour progression through depletion of survivin without involving its transport function. *Biochem J*, 450(1), 169-178. doi:10.1042/BJ20121248
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., . . . Bellacosa, A. (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 146(1), 67-79. doi:10.1016/j.cell.2011.06.020
- Craig, J. E., Zhang, Y., & Gallagher, M. P. (1994). Cloning of the nupC gene of *Escherichia coli* encoding a nucleoside transport system, and identification of an adjacent insertion element, IS 186. *Mol Microbiol*, 11(6), 1159-1168. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00392.x
- Crawford, C. R., Patel, D. H., Naeve, C., & Belt, J. A. (1998). Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line. *J Biol Chem*, 273(9), 5288-5293. doi:10.1074/jbc.273.9.5288
- Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., & Camaioni, E. (2001). Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev*, 21(2), 105-128. doi:10.1002/1098-1128(200103)21:2<105::aid-med1002>3.0.co;2-u

- Cronstein, B. N., Kramer, S. B., Weissmann, G., & Hirschhorn, R. (1983). Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med*, 158(4), 1160-1177. doi:10.1084/jem.158.4.1160
- Crossman, L. C., Druker, B. J., Deininger, M. W., Pirmohamed, M., Wang, L., & Clark, R. E. (2005). hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood*, 106(3), 1133-1134; author reply 1134. doi:10.1182/blood-2005-02-0694
- Crotty, S., & Andino, R. (2002). Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microbes Infect*, 4(13), 1301-1307. doi:10.1016/s1286-4579(02)00008-4
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y., Hong, Z., . . . Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med*, 6(12), 1375-1379. doi:10.1038/82191
- Cui, X. A., Agarwal, T., Singh, B., & Gupta, R. S. (2011). Molecular characterization of Chinese hamster cells mutants affected in adenosine kinase and showing novel genetic and biochemical characteristics. *BMC Biochem*, 12, 22. doi:10.1186/1471-2091-12-22
- Cunningham, J. T., Moreno, M. V., Lodi, A., Ronen, S. M., & Ruggero, D. (2014). Protein and nucleotide biosynthesis are coupled by a single rate-limiting enzyme, PRPS2, to drive cancer. *Cell*, 157(5), 1088-1103. doi:10.1016/j.cell.2014.03.052
- Curbo, S., Zhu, C., Johansson, M., Balzarini, J., & Karlsson, A. (2001). Dual mechanisms of 9-beta-D-arabinofuranosylguanine resistance in CEM T-lymphoblast leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(1), 40-45. doi:10.1006/bbrc.2001.5124
- Cusack, M., King, H. W., Spingardi, P., Kessler, B. M., Klose, R. J., & Kriaucionis, S. (2020). Distinct contributions of DNA methylation and histone acetylation to the genomic occupancy of transcription factors. *Genome Res*, 30(10), 1393-1406. doi:10.1101/gr.257576.119

D

- Dai, H. Q., Wang, B. A., Yang, L., Chen, J. J., Zhu, G. C., Sun, M. L., . . . Xu, G. L. (2016). TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating Lefty-Nodal signalling. *Nature*, 538(7626), 528-532. doi:10.1038/nature20095
- Damaraju, V. L., Damaraju, S., Young, J. D., Baldwin, S. A., Mackey, J., Sawyer, M. B., & Cass, C. E. (2003). Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. *Oncogene*, 22(47), 7524-7536. doi:10.1038/sj.onc.1206952
- Damaraju, V. L., Elwi, A. N., Hunter, C., Carpenter, P., Santos, C., Barron, G. M., . . . Cass, C. E. (2007). Localization of broadly selective equilibrative and concentrative nucleoside transporters, hENT1 and hCNT3, in human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(1), F200-211. doi:10.1152/ajprenal.00007.2007
- Damaraju, V. L., Mowles, D., Smith, K. M., Yao, S. Y., Young, J. D., Marquez, V. E., & Cass, C. E. (2011). Influence of sugar ring conformation on the transportability of nucleosides by human nucleoside transporters. *Chembiochem*, 12(18), 2774-2778. doi:10.1002/cbic.201100567
- Damaraju, V. L., Mowles, D., Yao, S., Ng, A., Young, J. D., Cass, C. E., & Tong, Z. (2012). Role of human nucleoside transporters in the uptake and cytotoxicity of azacitidine and decitabine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 31(3), 236-255. doi:10.1080/15257770.2011.652330
- Darnowski, J. W., Holdridge, C., & Handschumacher, R. E. (1987). Concentrative uridine transport by murine splenocytes: kinetics, substrate specificity, and sodium dependency. *Cancer Res*, 47(10), 2614-2619.

- De Clercq, E., & Holy, A. (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 4(11), 928-940. doi:10.1038/nrd1877
- De Koning, H. P., Al-Salabi, M. I., Cohen, A. M., Coombs, G. H., & Wastling, J. M. (2003). Identification and characterisation of high affinity nucleoside and nucleobase transporters in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 33(8), 821-831. doi:10.1016/s0020-7519(03)00091-2
- del Santo, B., Tarafa, G., Felipe, A., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2001). Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *J Hepatol*, 34(6), 873-880. doi:10.1016/s0168-8278(01)00036-8
- del Santo, B., Valdes, R., Mata, J., Felipe, A., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (1998). Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology*, 28(6), 1504-1511. doi:10.1002/hep.510280609
- Delhommeau, F., Jeziorowska, D., Marzac, C., & Casadevall, N. (2010). Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*, 91(2), 165-173. doi:10.1007/s12185-010-0530-z
- Delicado, E. G., Casillas, T., Sen, R. P., & Miras-Portugal, M. T. (1994). Evidence that adenine nucleotides modulate nucleoside-transporter function. Characterization of uridine transport in chromaffin cells and plasma membrane vesicles. *Eur J Biochem*, 225(1), 355-362. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.00355.x
- Denechaud, P. D., Fajas, L., & Giralt, A. (2017). E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 311. doi:10.3389/fendo.2017.00311
- Diallinas, G. (2017). Transceptors as a functional link of transporters and receptors. *Microb Cell*, 4(3), 69-73. doi:10.15698/mic2017.03.560
- Diasio, R. B., & Harris, B. E. (1989). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*, 16(4), 215-237. doi:10.2165/00003088-198916040-00002
- Didion, T., Regenber, B., Jorgensen, M. U., Kielland-Brandt, M. C., & Andersen, H. A. (1998). The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 27(3), 643-650. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00714.x
- Diehl, A. G., & Boyle, A. P. (2016). Deciphering ENCODE. *Trends Genet*, 32(4), 238-249. doi:10.1016/j.tig.2016.02.002
- Doehring, A., Hofmann, W. P., Schlecker, C., Zeuzem, S., Sarrazin, C., Berg, T., . . . Lotsch, J. (2011). Role of nucleoside transporters SLC28A2/3 and SLC29A1/2 genetics in ribavirin therapy: protection against anemia in patients with chronic hepatitis C. *Pharmacogenet Genomics*, 21(5), 289-296. doi:10.1097/FPC.0b013e32834412e7
- Donaton, M. C., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Zeebroeck, G., Crauwels, M., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 50(3), 911-929. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03732.x
- Dos Santos-Rodrigues, A., Grane-Boladeras, N., Bicket, A., & Coe, I. R. (2014). Nucleoside transporters in the purinome. *Neurochem Int*, 73, 229-237. doi:10.1016/j.neuint.2014.03.014
- Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol*, 10(2), 262-267. doi:10.1016/s0955-0674(98)80149-x
- Doyle, T. H., Mornex, F., & McKenna, W. G. (2001). The clinical implications of gemcitabine radiosensitization. *Clin Cancer Res*, 7(2), 226-228.
- Dragan, Y., Valdes, R., Gomez-Angelats, M., Felipe, A., Javier Casado, F., Pitot, H., & Pastor-Anglada, M. (2000). Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas. *Hepatology*, 32(2), 239-246. doi:10.1053/jhep.2000.9546
- Dresser, M. J., Xiao, G., Leabman, M. K., Gray, A. T., & Giacomini, K. M. (2002). Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharm Res*, 19(8), 1244-1247. doi:10.1023/a:1019870831174

- Drew, D., & Boudker, O. (2016). Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters. *Annu Rev Biochem*, 85, 543-572. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014520
- Drohat, A. C., & Coey, C. T. (2016). Role of Base Excision "Repair" Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA. *Chem Rev*, 116(20), 12711-12729. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00191
- Du, Q., Wang, Z., & Schramm, V. L. (2016). Human DNMT1 transition state structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(11), 2916-2921. doi:10.1073/pnas.1522491113
- Dubini, R. C. A., Schon, A., Muller, M., Carell, T., & Rovo, P. (2020). Impact of 5-formylcytosine on the melting kinetics of DNA by 1H NMR chemical exchange. *Nucleic Acids Res*, 48(15), 8796-8807. doi:10.1093/nar/gkaa589
- Duflot, S., Calvo, M., Casado, F. J., Enrich, C., & Pastor-Anglada, M. (2002). Concentrative nucleoside transporter (rCNT1) is targeted to the apical membrane through the hepatic transcytotic pathway. *Exp Cell Res*, 281(1), 77-85. doi:10.1006/excr.2002.5641
- Duflot, S., Riera, B., Fernandez-Veledo, S., Casado, V., Norman, R. I., Casado, F. J., . . . Pastor-Anglada, M. (2004). ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors. *Mol Cell Biol*, 24(7), 2710-2719. doi:10.1128/mcb.24.7.2710-2719.2004
- Dumontet, C., Fabianowska-Majewska, K., Mantincic, D., Callet Bauchu, E., Tigaud, I., Gandhi, V., . . . MacKey, J. (1999). Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br J Haematol*, 106(1), 78-85. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01509.x
- Dunwiddie, T. V., & Diao, L. (2000). Regulation of extracellular adenosine in rat hippocampal slices is temperature dependent: role of adenosine transporters. *Neuroscience*, 95(1), 81-88. doi:10.1016/s0306-4522(99)00404-2
- Duran, R. V., Oppliger, W., Robitaille, A. M., Heiserich, L., Skendaj, R., Gottlieb, E., & Hall, M. N. (2012). Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell*, 47(3), 349-358. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.043

E

- Eberhardy, S. R., & Farnham, P. J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem*, 276(51), 48562-48571. doi:10.1074/jbc.M109014200
- Eckford, P. D., & Sharom, F. J. (2009). ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev*, 109(7), 2989-3011. doi:10.1021/cr9000226
- Eda, H., Ura, M., K, F. O., Tanaka, Y., Miwa, M., & Ishitsuka, H. (1998). The antiproliferative activity of DMDC is modulated by inhibition of cytidine deaminase. *Cancer Res*, 58(6), 1165-1169.
- Edupuganti, R. R., Geiger, S., Lindeboom, R. G. H., Shi, H., Hsu, P. J., Lu, Z., . . . Vermeulen, M. (2017). N(6)-methyladenosine (m(6)A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis. *Nat Struct Mol Biol*, 24(10), 870-878. doi:10.1038/nsmb.3462
- El-Khateeb, E. A. (2010). The H syndrome. *Pediatr Dermatol*, 27(1), 65-68. doi:10.1111/j.1525-1470.2009.01076.x
- Eleftheriou, M., Pascual, A. J., Wheldon, L. M., Perry, C., Abakir, A., Arora, A., . . . Ruzov, A. (2015). 5-Carboxylcytosine levels are elevated in human breast cancers and gliomas. *Clin Epigenetics*, 7, 88. doi:10.1186/s13148-015-0117-x
- Elson, D., & Chargaff, E. (1952). On the desoxyribonucleic acid content of sea urchin gametes. *Experientia*, 8(4), 143-145. doi:10.1007/BF02170221
- Eltzschig, H. K., Abdulla, P., Hoffman, E., Hamilton, K. E., Daniels, D., Schonfeld, C., . . . Colgan, S. P. (2005). HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med*, 202(11), 1493-1505. doi:10.1084/jem.20050177

- Elwi, A. N., Damaraju, V. L., Baldwin, S. A., Young, J. D., Sawyer, M. B., & Cass, C. E. (2006). Renal nucleoside transporters: physiological and clinical implications. *Biochem Cell Biol*, 84(6), 844-858. doi:10.1139/o06-198
- Emmanuel, N., Ragunathan, S., Shan, Q., Wang, F., Giannakou, A., Huser, N., . . . Unsal-Kacmaz, K. (2017). Purine Nucleotide Availability Regulates mTORC1 Activity through the Rheb GTPase. *Cell Rep*, 19(13), 2665-2680. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.043
- Endres, C. J., Moss, A. M., Ke, B., Govindarajan, R., Choi, D. S., Messing, R. O., & Unadkat, J. D. (2009). The role of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in transport and metabolism of ribavirin by human and wild-type or Ent1-/- mouse erythrocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 329(1), 387-398. doi:10.1124/jpet.108.145854
- Endres, C. J., Sengupta, D. J., & Unadkat, J. D. (2004). Mutation of leucine-92 selectively reduces the apparent affinity of inosine, guanosine, NBMPR [S6-(4-nitrobenzyl)-mercaptapurine riboside] and dilazep for the human equilibrative nucleoside transporter, hENT1. *Biochem J*, 380(Pt 1), 131-137. doi:10.1042/BJ20031880
- Endres, C. J., & Unadkat, J. D. (2005). Residues Met89 and Ser160 in the human equilibrative nucleoside transporter 1 affect its affinity for adenosine, guanosine, S6-(4-nitrobenzyl)-mercaptapurine riboside, and dipyridamole. *Mol Pharmacol*, 67(3), 837-844. doi:10.1124/mol.104.008102
- Engel, K., & Wang, J. (2005). Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol*, 68(5), 1397-1407. doi:10.1124/mol.105.016832
- Engel, K., Zhou, M., & Wang, J. (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem*, 279(48), 50042-50049. doi:10.1074/jbc.M407913200
- Eriksson, S., Cederlund, E., Bergman, T., Jornvall, H., & Bohman, C. (1991). Characterization of human deoxycytidine kinase. Correlation with cDNA sequences. *FEBS Lett*, 280(2), 363-366. doi:10.1016/0014-5793(91)80332-w
- Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K., & Eklund, H. (2002). Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell Mol Life Sci*, 59(8), 1327-1346. doi:10.1007/s00018-002-8511-x
- Erpapazoglou, Z., Froissard, M., Nondier, I., Lesuisse, E., Haguener-Tsapis, R., & Belgareh-Touze, N. (2008). Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic*, 9(8), 1372-1391. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00766.x
- Errasti-Murugarren, E., Cano-Soldado, P., Pastor-Anglada, M., & Casado, F. J. (2008). Functional characterization of a nucleoside-derived drug transporter variant (hCNT3C602R) showing altered sodium-binding capacity. *Mol Pharmacol*, 73(2), 379-386. doi:10.1124/mol.107.041848
- Errasti-Murugarren, E., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2010). Different N-terminal motifs determine plasma membrane targeting of the human concentrative nucleoside transporter 3 in polarized and nonpolarized cells. *Mol Pharmacol*, 78(5), 795-803. doi:10.1124/mol.110.065920
- Errasti-Murugarren, E., Diaz, P., Godoy, V., Riquelme, G., & Pastor-Anglada, M. (2011). Expression and distribution of nucleoside transporter proteins in the human syncytiotrophoblast. *Mol Pharmacol*, 80(5), 809-817. doi:10.1124/mol.111.071837
- Errasti-Murugarren, E., Fernandez-Calotti, P., Veyhl-Wichmann, M., Diepold, M., Pinilla-Macua, I., Perez-Torras, S., . . . Pastor-Anglada, M. (2012). Role of the transporter regulator protein (RS1) in the modulation of concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia. *Mol Pharmacol*, 82(1), 59-67. doi:10.1124/mol.111.076992
- Errasti-Murugarren, E., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2009). A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum. *FASEB J*, 23(1), 172-182. doi:10.1096/fj.08-113902

- Errasti-Murugarren, E., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2010). The human concentrative nucleoside transporter-3 C602R variant shows impaired sorting to lipid rafts and altered specificity for nucleoside-derived drugs. *Mol Pharmacol*, 78(2), 157-165. doi:10.1124/mol.110.063552
- Errasti-Murugarren, E., & Pastor-Anglada, M. (2010). Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics*, 11(6), 809-841. doi:10.2217/pgs.10.70
- Errasti-Murugarren, E., Pastor-Anglada, M., & Casado, F. J. (2007). Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs. *J Physiol*, 582(Pt 3), 1249-1260. doi:10.1113/jphysiol.2007.130138
- Esposito, F., Corona, A., & Tramontano, E. (2012). HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions. *Mol Biol Int*, 2012, 586401. doi:10.1155/2012/586401
- Evans, D. R., & Guy, H. I. (2004). Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem*, 279(32), 33035-33038. doi:10.1074/jbc.R400007200
- Ewald, B., Sampath, D., & Plunkett, W. (2008). Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene*, 27(50), 6522-6537. doi:10.1038/onc.2008.316
- Ezzat, W. R., & Lauth, W. W. (1987). Hepatic arterial pressure-flow autoregulation is adenosine mediated. *Am J Physiol*, 252(4 Pt 2), H836-845. doi:10.1152/ajpheart.1987.252.4.H836

F

- Fabianowska-Majewska, K., & Wyczechowska, D. (1996). 2-Chloro-2'-deoxyadenosine (2CdA) biochemical aspects of antileukemic efficacy. *Acta Pol Pharm*, 53(4), 231-239.
- Fairman, J. W., Wijerathna, S. R., Ahmad, M. F., Xu, H., Nakano, R., Jha, S., . . . Dealwis, C. G. (2011). Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nat Struct Mol Biol*, 18(3), 316-322. doi:10.1038/nsmb.2007
- Fallahi, N., Broad, R. M., Jin, S., & Fredholm, B. B. (1996). Release of adenosine from rat hippocampal slices by nitric oxide donors. *J Neurochem*, 67(1), 186-193. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.67010186.x
- Farias, M., Puebla, C., Westermeier, F., Jo, M. J., Pastor-Anglada, M., Casanello, P., & Sobrevia, L. (2010). Nitric oxide reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving transcription factor complex hCHOP-C/EBPalpha in human umbilical vein endothelial cells from gestational diabetes. *Cardiovasc Res*, 86(1), 45-54. doi:10.1093/cvr/cvp410
- Farinelli, P., Perera, A., Arango-Gonzalez, B., Trifunovic, D., Wagner, M., Carell, T., . . . Ekstrom, P. A. (2014). DNA methylation and differential gene regulation in photoreceptor cell death. *Cell Death Dis*, 5, e1558. doi:10.1038/cddis.2014.512
- Farre, X., Guillen-Gomez, E., Sanchez, L., Hardisson, D., Plaza, Y., Lloberas, J., . . . Pastor-Anglada, M. (2004). Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *Int J Cancer*, 112(6), 959-966. doi:10.1002/ijc.20524
- Farrell, J. J., Elsalem, H., Garcia, M., Lai, R., Ammar, A., Regine, W. F., . . . Mackey, J. R. (2009). Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 136(1), 187-195. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.067
- Feinberg, A. P., & Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 143-153. doi:10.1038/nrc1279

- Felice, M. R., De Domenico, I., Li, L., Ward, D. M., Bartok, B., Musci, G., & Kaplan, J. (2005). Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. *J Biol Chem*, 280(23), 22181-22190. doi:10.1074/jbc.M414663200
- Felipe, A., Ferrer-Martinez, A., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (1997). Expression of sodium-dependent purine nucleoside carrier (SPNT) mRNA correlates with nucleoside transport activity in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 233(2), 572-575. doi:10.1006/bbrc.1997.6498
- Felipe, A., Valdes, R., Santo, B., Lloberas, J., Casado, J., & Pastor-Anglada, M. (1998). Na⁺-dependent nucleoside transport in liver: two different isoforms from the same gene family are expressed in liver cells. *Biochem J*, 330 (Pt 2), 997-1001. doi:10.1042/bj3300997
- Fernandez-Calotti, P., Casulleras, O., Antolin, M., Guarner, F., & Pastor-Anglada, M. (2016). Galectin-4 interacts with the drug transporter human concentrative nucleoside transporter 3 to regulate its function. *FASEB J*, 30(2), 544-554. doi:10.1096/fj.15-272773
- Fernandez-Calotti, P., & Pastor-Anglada, M. (2010). All-trans-retinoic acid promotes trafficking of human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) to the plasma membrane by a TGF-beta1-mediated mechanism. *J Biol Chem*, 285(18), 13589-13598. doi:10.1074/jbc.M109.055673
- Fernandez-Calotti, P. X., Lopez-Guerra, M., Colomer, D., & Pastor-Anglada, M. (2012). Enhancement of fludarabine sensitivity by all-trans-retinoic acid in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*, 97(6), 943-951. doi:10.3324/haematol.2011.051557
- Fernandez-Veledo, S., Huber-Ruano, I., Aymerich, I., Dufлот, S., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2006). Bile acids alter the subcellular localization of CNT2 (concentrative nucleoside cotransporter) and increase CNT2-related transport activity in liver parenchymal cells. *Biochem J*, 395(2), 337-344. doi:10.1042/BJ20051232
- Fernandez-Veledo, S., Jover, R., Casado, F. J., Gomez-Lechon, M. J., & Pastor-Anglada, M. (2007). Transcription factors involved in the expression of SLC28 genes in human liver parenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 353(2), 381-388. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.021
- Fernandez-Veledo, S., Valdes, R., Wallenius, V., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2004). Up-regulation of the high-affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter concentrative nucleoside transporter 1 by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in liver parenchymal cells. *J Hepatol*, 41(4), 538-544. doi:10.1016/j.jhep.2004.06.008
- Ferreira, C. G., Tolis, C., & Giaccone, G. (1999). p53 and chemosensitivity. *Ann Oncol*, 10(9), 1011-1021. doi:10.1023/a:1008361818480
- Ferrer-Martinez, A., Felipe, A., Nicholson, B., Casado, J., Pastor-Anglada, M., & McGivan, J. (1995). Induction of the high-affinity Na⁺-dependent glutamate transport system XAG by hypertonic stress in the renal epithelial cell line NBL-1. *Biochem J*, 310 (Pt 2), 689-692. doi:10.1042/bj3100689
- Fideu, M. D., & Miras-Portugal, M. T. (1992). Long term regulation of nucleoside transport by thyroid hormone (T3) in cultured chromaffin cells. *Neurochem Res*, 17(11), 1099-1104. doi:10.1007/BF00967287
- Fideu, M. D., & Miras-Portugal, M. T. (1993). Steroid-induced inhibition of adenosine transport in cultured chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol*, 13(5), 493-502. doi:10.1007/BF00711458
- Figuroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., . . . Melnick, A. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 18(6), 553-567. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015
- Fischer, B., Yefidoff, R., Major, D. T., Rutman-Halili, I., Shneyvays, V., Zinman, T., . . . Shainberg, A. (1999). Characterization of "mini-nucleotides" as P2X receptor agonists in rat cardiomyocyte cultures. An integrated synthetic, biochemical, and theoretical study. *J Med Chem*, 42(14), 2685-2696. doi:10.1021/jm990085i

- Flanagan, S. A., Gandhi, V., Secrist, J. A., 3rd, & Meckling, K. A. (2003). The novel nucleoside transport system exhibited by NB4 cells, *csg*, transports deoxyguanosine analogues, including ara-G. *Biochem Pharmacol*, 66(5), 733-737. doi:10.1016/s0006-2952(03)00393-9
- Flanagan, S. A., & Meckling-Gill, K. A. (1997). Characterization of a novel Na⁺-dependent, guanosine-specific, nitrobenzylthioinosine-sensitive transporter in acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem*, 272(29), 18026-18032. doi:10.1074/jbc.272.29.18026
- Floyd, E. E., & Jones, M. E. (1985). Isolation and characterization of the orotidine 5'-monophosphate decarboxylase domain of the multifunctional protein uridine 5'-monophosphate synthase. *J Biol Chem*, 260(16), 9443-9451.
- Fontenelle, L. J., & Henderson, J. F. (1969). An enzymatic basis for the inability of erythrocytes to synthesize purine ribonucleotides de novo. *Biochim Biophys Acta*, 177(1), 175-176. doi:10.1016/0304-4165(69)90085-3
- Forsberg, H., & Ljungdahl, P. O. (2001). Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 40(2), 91-109. doi:10.1007/s002940100244
- Fotoohi, A. K., Lindqvist, M., Peterson, C., & Albertioni, F. (2006). Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines. *Biochem Biophys Res Commun*, 343(1), 208-215. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.134
- Fourouclas, N., Li, J., Gilby, D. C., Campbell, P. J., Beer, P. A., Boyd, E. M., . . . Bench, A. J. (2008). Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders. *Haematologica*, 93(11), 1635-1644. doi:10.3324/haematol.13043
- Fowler, J. D., Brown, J. A., Johnson, K. A., & Suo, Z. (2008). Kinetic investigation of the inhibitory effect of gemcitabine on DNA polymerization catalyzed by human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, 283(22), 15339-15348. doi:10.1074/jbc.M800310200
- Franklin, R. E., & Gosling, R. G. (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171(4356), 740-741. doi:10.1038/171740a0
- Franzolin, E., Pontarin, G., Rampazzo, C., Miazzi, C., Ferraro, P., Palumbo, E., . . . Bianchi, V. (2013). The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(35), 14272-14277. doi:10.1073/pnas.1312033110
- Freathy, C., Brown, D. G., Roberts, R. A., & Cain, K. (2000). Transforming growth factor-beta(1) induces apoptosis in rat FaO hepatoma cells via cytochrome c release and oligomerization of Apaf-1 to form an approximately 700-kd apoptosome caspase-processing complex. *Hepatology*, 32(4 Pt 1), 750-760. doi:10.1053/jhep.2000.18329
- French, J. B., Zhao, H., An, S., Niessen, S., Deng, Y., Cravatt, B. F., & Benkovic, S. J. (2013). Hsp70/Hsp90 chaperone machinery is involved in the assembly of the purinosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(7), 2528-2533. doi:10.1073/pnas.1300173110
- Fu, L., Guerrero, C. R., Zhong, N., Amato, N. J., Liu, Y., Liu, S., . . . Wang, Y. (2014). Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *J Am Chem Soc*, 136(33), 11582-11585. doi:10.1021/ja505305z
- Fu, T., Liu, L., Yang, Q. L., Wang, Y., Xu, P., Zhang, L., . . . Zhang, L. (2019). Thymine DNA glycosylase recognizes the geometry alteration of minor grooves induced by 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Chem Sci*, 10(31), 7407-7417. doi:10.1039/c9sc02807b
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376. doi:10.1038/288373a0
- Furqan, M., Mukhi, N., Lee, B., & Liu, D. (2013). Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark Res*, 1(1), 5. doi:10.1186/2050-7771-1-5

Furukawa, J., Inoue, K., Maeda, J., Yasujima, T., Ohta, K., Kanai, Y., . . . Yuasa, H. (2015). Functional identification of SLC43A3 as an equilibrative nucleobase transporter involved in purine salvage in mammals. *Sci Rep*, 5, 15057. doi:10.1038/srep15057

G

Gackowski, D., Zarakowska, E., Starczak, M., Modrzejewska, M., & Olinski, R. (2015). Tissue-Specific Differences in DNA Modifications (5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine, 5-Carboxylcytosine and 5-Hydroxymethyluracil) and Their Interrelationships. *PLoS One*, 10(12), e0144859. doi:10.1371/journal.pone.0144859

Galan, J. M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C., & Haguenaer-Tsapis, R. (1996). Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem*, 271(18), 10946-10952. doi:10.1074/jbc.271.18.10946

Galmarini, C. M., Mackey, J. R., & Dumontet, C. (2001). Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia*, 15(6), 875-890. doi:10.1038/sj.leu.2402114

Galmarini, C. M., Mackey, J. R., & Dumontet, C. (2002). Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol*, 3(7), 415-424. doi:10.1016/s1470-2045(02)00788-x

Galmarini, C. M., Thomas, X., Graham, K., El Jafaari, A., Cros, E., Jordheim, L., . . . Dumontet, C. (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(1), 53-60. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04386.x

Gandhi, V., Mineishi, S., Huang, P., Chapman, A. J., Yang, Y., Chen, F., . . . Plunkett, W. (1995). Cytotoxicity, metabolism, and mechanisms of action of 2',2'-difluorodeoxyguanosine in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*, 55(7), 1517-1524.

Gandhi, V., Plunkett, W., Rodriguez, C. O., Jr., Nowak, B. J., Du, M., Ayres, M., . . . Keating, M. J. (1998). Compound GW506U78 in refractory hematologic malignancies: relationship between cellular pharmacokinetics and clinical response. *J Clin Oncol*, 16(11), 3607-3615. doi:10.1200/JCO.1998.16.11.3607

Garcia-Manero, G. (2012). Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 87(7), 692-701. doi:10.1002/ajh.23264

Garcia-Manteiga, J., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., Mazo, A., & Pastor-Anglada, M. (2003). Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clin Cancer Res*, 9(13), 5000-5008.

Gasser, T., Moyer, J. D., & Handschumacher, R. E. (1981). Novel single-pass exchange of circulating uridine in rat liver. *Science*, 213(4509), 777-778. doi:10.1126/science.7256279

Gati, W. P., Paterson, A. R., Belch, A. R., Chlumecky, V., Larratt, L. M., Mant, M. J., & Turner, A. R. (1998). Es nucleoside transporter content of acute leukemia cells: role in cell sensitivity to cytarabine (araC). *Leuk Lymphoma*, 32(1-2), 45-54. doi:10.3109/10428199809059245

Gati, W. P., Paterson, A. R., Larratt, L. M., Turner, A. R., & Belch, A. R. (1997). Sensitivity of acute leukemia cells to cytarabine is a correlate of cellular es nucleoside transporter site content measured by flow cytometry with SAENTA-fluorescein. *Blood*, 90(1), 346-353.

Geiger, J. D., LaBella, F. S., & Nagy, J. I. (1985). Characterization of nitrobenzylthioinosine binding to nucleoside transport sites selective for adenosine in rat brain. *J Neurosci*, 5(3), 735-740.

Genini, D., Adachi, S., Chao, Q., Rose, D. W., Carrera, C. J., Cottam, H. B., . . . Leoni, L. M. (2000). Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood*, 96(10), 3537-3543.

- Genini, D., Budihardjo, I., Plunkett, W., Wang, X., Carrera, C. J., Cottam, H. B., . . . Leoni, L. M. (2000). Nucleotide requirements for the in vitro activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway. *J Biol Chem*, 275(1), 29-34. doi:10.1074/jbc.275.1.29
- Gerstin, K. M., Dresser, M. J., & Giacomini, K. M. (2002). Specificity of human and rat orthologs of the concentrative nucleoside transporter, SPNT. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283(2), F344-349. doi:10.1152/ajprenal.00274.2001
- Gerwins, P., & Fredholm, B. B. (1995). Activation of adenosine A1 and bradykinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 351(2), 186-193. doi:10.1007/BF00169332
- Ghai, V., Sharma, K., Abbi, K. K., Shimko, S., & Epner, E. M. (2013). Current approaches to epigenetic therapy for the treatment of mantle cell lymphoma. *Adv Exp Med Biol*, 779, 257-266. doi:10.1007/978-1-4614-6176-0_11
- Giacomini, K. M., & Huang, S. M. (2013). Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther*, 94(1), 3-9. doi:10.1038/clpt.2013.86
- Giannecchini, M., Matteucci, M., Pesi, R., Sgarrella, F., Tozzi, M. G., & Camici, M. (2005). Uptake and utilization of nucleosides for energy repletion. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(4), 797-808. doi:10.1016/j.biocel.2004.10.005
- Giannoudis, A., Wang, L., Jorgensen, A. L., Xinarianos, G., Davies, A., Pushpakom, S., . . . Clark, R. E. (2013). The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*, 121(4), 628-637. doi:10.1182/blood-2012-01-405035
- Giehl, R. F., & von Wiren, N. (2015). Nitrate signalling: Functions of a nitrate transceptor. *Nat Plants*, 1, 15021. doi:10.1038/nplants.2015.21
- Giovannetti, E., Danesi, R., Mey, V., Nannizzi, S., Pasqualetti, G., & Del Tacca, M. (2006). In vitro studies on gemcitabine combinations with other antiproliferatives. *Ann Oncol*, 17 Suppl 5, v17-19. doi:10.1093/annonc/mdj943
- Giovannetti, E., Del Tacca, M., Mey, V., Funel, N., Nannizzi, S., Ricci, S., . . . Danesi, R. (2006). Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res*, 66(7), 3928-3935. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4203
- Giovannetti, E., Laan, A. C., Vasile, E., Tibaldi, C., Nannizzi, S., Ricciardi, S., . . . Peters, G. J. (2008). Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 27(6), 720-725. doi:10.1080/15257770802145447
- Globisch, D., Munzel, M., Muller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., . . . Carell, T. (2010). Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*, 5(12), e15367. doi:10.1371/journal.pone.0015367
- Gloeckner-Hofmann, K., Guillen-Gomez, E., Schmidtgen, C., Porstmann, R., Ziegler, R., Stoss, O., . . . Pastor-Anglada, M. (2006). Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer. *Oncology*, 70(3), 238-244. doi:10.1159/000094541
- Goan, Y. G., Zhou, B., Hu, E., Mi, S., & Yen, Y. (1999). Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res*, 59(17), 4204-4207.
- Goberdhan, D. C., Meredith, D., Boyd, C. A., & Wilson, C. (2005). PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development*, 132(10), 2365-2375. doi:10.1242/dev.01821
- Godoy, V., Banales, J. M., Medina, J. F., & Pastor-Anglada, M. (2014). Functional crosstalk between the adenosine transporter CNT3 and purinergic receptors in the biliary epithelia. *J Hepatol*, 61(6), 1337-1343. doi:10.1016/j.jhep.2014.06.036
- Gojon, A., Krouk, G., Perrine-Walker, F., & Laugier, E. (2011). Nitrate transceptor(s) in plants. *J Exp Bot*, 62(7), 2299-2308. doi:10.1093/jxb/erq419

- Goldstone, D. C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J. J., Groom, H. C., Rice, G. I., Christodoulou, E., . . . Webb, M. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature*, 480(7377), 379-382. doi:10.1038/nature10623
- Gomez-Angelats, M., del Santo, B., Mercader, J., Ferrer-Martinez, A., Felipe, A., Casado, J., & Pastor-Anglada, M. (1996). Hormonal regulation of concentrative nucleoside transport in liver parenchymal cells. *Biochem J*, 313 (Pt 3), 915-920. doi:10.1042/bj3130915
- Gontcharov, J., Liu, L., Pilles, B. M., Carell, T., Schreier, W. J., & Zinth, W. (2019). Triplet-Induced Lesion Formation at CpT and TpC Sites in DNA. *Chemistry*, 25(66), 15164-15172. doi:10.1002/chem.201903573
- Gorboulev, V., Shatskaya, N., Volk, C., & Koepsell, H. (2005). Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Mol Pharmacol*, 67(5), 1612-1619. doi:10.1124/mol.104.008821
- Gorboulev, V., Ulzheimer, J. C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., . . . Koepsell, H. (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol*, 16(7), 871-881. doi:10.1089/dna.1997.16.871
- Gorbunov, D., Gorboulev, V., Shatskaya, N., Mueller, T., Bamberg, E., Friedrich, T., & Koepsell, H. (2008). High-affinity cation binding to organic cation transporter 1 induces movement of helix 11 and blocks transport after mutations in a modeled interaction domain between two helices. *Mol Pharmacol*, 73(1), 50-61. doi:10.1124/mol.107.040170
- Gorzkiwicz, M., & Klajnert-Maculewicz, B. (2017). Dendrimers as nanocarriers for nucleoside analogues. *Eur J Pharm Biopharm*, 114, 43-56. doi:10.1016/j.ejpb.2016.12.030
- Gourdeau, H., Clarke, M. L., Ouellet, F., Mowles, D., Selner, M., Richard, A., . . . Cass, C. E. (2001). Mechanisms of uptake and resistance to troxacitabine, a novel deoxycytidine nucleoside analogue, in human leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res*, 61(19), 7217-7224.
- Govindarajan, R., Bakken, A. H., Hudkins, K. L., Lai, Y., Casado, F. J., Pastor-Anglada, M., . . . Unadkat, J. D. (2007). In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys, and placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293(5), R1809-1822. doi:10.1152/ajpregu.00293.2007
- Govindarajan, R., Endres, C. J., Whittington, D., LeCluyse, E., Pastor-Anglada, M., Tse, C. M., & Unadkat, J. D. (2008). Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative nucleoside transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295(3), G570-580. doi:10.1152/ajpgi.00542.2007
- Govindarajan, R., Leung, G. P., Zhou, M., Tse, C. M., Wang, J., & Unadkat, J. D. (2009). Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(4), G910-922. doi:10.1152/ajpgi.90672.2008
- Graham, K. A., Leithoff, J., Coe, I. R., Mowles, D., Mackey, J. R., Young, J. D., & Cass, C. E. (2000). Differential transport of cytosine-containing nucleosides by recombinant human concentrative nucleoside transporter protein hCNT1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 19(1-2), 415-434. doi:10.1080/15257770008033018
- Grane-Boladeras, N., Perez-Torras, S., Lozano, J. J., Romero, M. R., Mazo, A., Marin, J. J. G., & Pastor-Anglada, M. (2016). Pharmacogenomic analysis of the responsiveness of gastrointestinal tumor cell lines to drug therapy: A transportome approach. *Pharmacol Res*, 113(Pt A), 364-375. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.007
- Grane-Boladeras, N., Spring, C. M., Hanna, W. J., Pastor-Anglada, M., & Coe, I. R. (2016). Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir. *Cell Mol Life Sci*, 73(23), 4559-4575. doi:10.1007/s00018-016-2288-9
- Grane-Boladeras, N., Williams, D., Tarmakova, Z., Stevanovic, K., Villani, L. A., Mehrabi, P., . . . Coe, I. R. (2019). Oligomerization of equilibrative nucleoside transporters: a novel

- regulatory and functional mechanism involving PKC and PP1. *FASEB J*, 33(3), 3841-3850. doi:10.1096/fj.201800440RR
- Granger, D. N., Valleau, J. D., Parker, R. E., Lane, R. S., & Taylor, A. E. (1978). Effects of adenosine on intestinal hemodynamics, oxygen delivery, and capillary fluid exchange. *Am J Physiol*, 235(6), H707-719. doi:10.1152/ajpheart.1978.235.6.H707
- Grant, S. (1998). Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res*, 72, 197-233. doi:10.1016/s0065-230x(08)60703-4
- Graves, L. M., Guy, H. I., Kozlowski, P., Huang, M., Lazarowski, E., Pope, R. M., . . . Evans, D. R. (2000). Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature*, 403(6767), 328-332. doi:10.1038/35002111
- Gray, J. H., Mangravite, L. M., Owen, R. P., Urban, T. J., Chan, W., Carlson, E. J., . . . Giacomini, K. M. (2004). Functional and genetic diversity in the concentrative nucleoside transporter, CNT1, in human populations. *Mol Pharmacol*, 65(3), 512-519. doi:10.1124/mol.65.3.512
- Gray, J. H., Owen, R. P., & Giacomini, K. M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*, 447(5), 728-734. doi:10.1007/s00424-003-1107-y
- Grayson, D. R., & Evans, D. R. (1983). The isolation and characterization of the aspartate transcarbamylase domain of the multifunctional protein, CAD. *J Biol Chem*, 258(7), 4123-4129.
- Grden, M., Podgorska, M., Kocbuch, K., Rzepko, R., Szutowicz, A., & Pawelczyk, T. (2008). High glucose suppresses expression of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in rat cardiac fibroblasts through a mechanism dependent on PKC-zeta and MAP kinases. *J Cell Physiol*, 215(1), 151-160. doi:10.1002/jcp.21296
- Greco, C. M., Kunderfranco, P., Rubino, M., Larcher, V., Carullo, P., Anselmo, A., . . . Condorelli, G. (2016). DNA hydroxymethylation controls cardiomyocyte gene expression in development and hypertrophy. *Nat Commun*, 7, 12418. doi:10.1038/ncomms12418
- Greenberg, N., Schumm, D. E., & Webb, T. E. (1977). Uridine kinase activities and pyrimidine nucleoside phosphorylation in fluoropyrimidine-sensitive and -resistant cell lines of the Novikoff hepatoma. *Biochem J*, 164(2), 379-387. doi:10.1042/bj1640379
- Grem, J. L., & Fischer, P. H. (1989). Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyrindamole. *Pharmacol Ther*, 40(3), 349-371. doi:10.1016/0163-7258(89)90084-3
- Grem, J. L., King, S. A., O'Dwyer, P. J., & Leyland-Jones, B. (1988). Biochemistry and clinical activity of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate: a review. *Cancer Res*, 48(16), 4441-4454.
- Griffith, D. A., & Jarvis, S. M. (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1286(3), 153-181. doi:10.1016/s0304-4157(96)00008-1
- Griffith, D. A., & Jarvis, S. M. (1996). Regulation of nucleobase transport in LLC-PK1 renal epithelia by protein kinase C. *Biochim Biophys Acta*, 1284(2), 213-220. doi:10.1016/s0005-2736(96)00132-0
- Griffiths, M., Yao, S. Y., Abidi, F., Phillips, S. E., Cass, C. E., Young, J. D., & Baldwin, S. A. (1997). Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J*, 328 (Pt 3), 739-743. doi:10.1042/bj3280739
- Gros, C., Fahy, J., Halby, L., Dufau, I., Erdmann, A., Gregoire, J. M., . . . Arimondo, P. B. (2012). DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie*, 94(11), 2280-2296. doi:10.1016/j.biochi.2012.07.025
- Gu, T. P., Guo, F., Yang, H., Wu, H. P., Xu, G. F., Liu, W., . . . Xu, G. L. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477(7366), 606-610. doi:10.1038/nature10443
- Guillen-Gomez, E., Calbet, M., Casado, J., de Lecea, L., Soriano, E., Pastor-Anglada, M., & Burgaya, F. (2004). Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *J Neurochem*, 90(4), 883-893. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02545.x

- Guillen-Gomez, E., Pinilla-Macua, I., Perez-Torras, S., Choi, D. S., Arce, Y., Ballarin, J. A., . . . Diaz-Encarnacion, M. M. (2012). New role of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) in epithelial-to-mesenchymal transition in renal tubular cells. *J Cell Physiol*, 227(4), 1521-1528. doi:10.1002/jcp.22869
- Guitart, X., Bonaventura, J., Rea, W., Orru, M., Cellai, L., Dettori, I., . . . Ferre, S. (2016). Equilibrative nucleoside transporter ENT1 as a biomarker of Huntington disease. *Neurobiol Dis*, 96, 47-53. doi:10.1016/j.nbd.2016.08.013
- Guittet, O., Hakansson, P., Voevodskaya, N., Fridd, S., Graslund, A., Arakawa, H., . . . Thelander, L. (2001). Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase in vitro with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells. *J Biol Chem*, 276(44), 40647-40651. doi:10.1074/jbc.M106088200
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., & Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3), 423-434. doi:10.1016/j.cell.2011.03.022
- Gutierrez, M. M., Brett, C. M., Ott, R. J., Hui, A. C., & Giacomini, K. M. (1992). Nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochim Biophys Acta*, 1105(1), 1-9. doi:10.1016/0005-2736(92)90156-g
- Gutierrez, M. M., & Giacomini, K. M. (1993). Substrate selectivity, potential sensitivity and stoichiometry of Na(+)-nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochim Biophys Acta*, 1149(2), 202-208. doi:10.1016/0005-2736(93)90202-b

H

- Hack, S. P., & Christie, M. J. (2003). Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. *Crit Rev Neurobiol*, 15(3-4), 235-274. doi:10.1615/critrevneurobiol.v15.i34.30
- Hackett, J. A., Sengupta, R., Zylitz, J. J., Murakami, K., Lee, C., Down, T. A., & Surani, M. A. (2013). Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science*, 339(6118), 448-452. doi:10.1126/science.1229277
- Haffner, M. C., Chaux, A., Meeker, A. K., Esopi, D. M., Gerber, J., Pellakuru, L. G., . . . Yegnasubramanian, S. (2011). Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget*, 2(8), 627-637. doi:10.18632/oncotarget.316
- Hajkova, P., Jeffries, S. J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S. P., & Surani, M. A. (2010). Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science*, 329(5987), 78-82. doi:10.1126/science.1187945
- Hamilton, S. R., Yao, S. Y., Ingram, J. C., Hadden, D. A., Ritzel, M. W., Gallagher, M. P., . . . Baldwin, S. A. (2001). Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem*, 276(30), 27981-27988. doi:10.1074/jbc.M100518200
- Hammond, J. R. (2000). Interaction of a series of draflazine analogues with equilibrative nucleoside transporters: species differences and transporter subtype selectivity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 361(4), 373-382. doi:10.1007/s002100000214
- Hammond, J. R., Lee, S., & Ferguson, P. J. (1999). [³H]gemcitabine uptake by nucleoside transporters in a human head and neck squamous carcinoma cell line. *J Pharmacol Exp Ther*, 288(3), 1185-1191.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Handa, M., Choi, D. S., Caldeiro, R. M., Messing, R. O., Gordon, A. S., & Diamond, I. (2001). Cloning of a novel isoform of the mouse NBMPR-sensitive equilibrative nucleoside

- transporter (ENT1) lacking a putative phosphorylation site. *Gene*, 262(1-2), 301-307. doi:10.1016/s0378-1119(00)00555-2
- Hanna, N. N., Mauceri, H. J., Wayne, J. D., Hallahan, D. E., Kufe, D. W., & Weichselbaum, R. R. (1997). Virally directed cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy enhances radiation response in human cancer xenografts. *Cancer Res*, 57(19), 4205-4209.
- Hapke, D. M., Stegmann, A. P., & Mitchell, B. S. (1996). Retroviral transfer of deoxycytidine kinase into tumor cell lines enhances nucleoside toxicity. *Cancer Res*, 56(10), 2343-2347.
- Hargrove, T. Y., Wawrzak, Z., Liu, J., Nes, W. D., Waterman, M. R., & Lepesheva, G. I. (2011). Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*. *J Biol Chem*, 286(30), 26838-26848. doi:10.1074/jbc.M111.237099
- Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 7(9), 759-770. doi:10.1038/nrd2638
- Hazen, R., & Lanier, E. R. (2003). Relative anti-HIV-1 efficacy of lamivudine and emtricitabine in vitro is dependent on cell type. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 32(3), 255-258. doi:10.1097/00126334-200303010-00003
- He, L., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics*, 3(2), 195-206. doi:10.1186/1479-7364-3-2-195
- He, Y., Chu, S. H., & Walker, W. A. (1993). Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells. *J Nutr*, 123(6), 1017-1027. doi:10.1093/jn/123.6.1017
- He, Y., Sanderson, I. R., & Walker, W. A. (1994). Uptake, transport and metabolism of exogenous nucleosides in intestinal epithelial cell cultures. *J Nutr*, 124(10), 1942-1949. doi:10.1093/jn/124.10.1942
- He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., . . . Xu, G. L. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333(6047), 1303-1307. doi:10.1126/science.1210944
- Hediger, M. A., Clemençon, B., Burrier, R. E., & Bruford, E. A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 95-107. doi:10.1016/j.mam.2012.12.009
- Heinemann, V., Hertel, L. W., Grindey, G. B., & Plunkett, W. (1988). Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res*, 48(14), 4024-4031.
- Hellsten-Westling, Y., Kaijser, L., Ekblom, B., & Sjödin, B. (1994). Exchange of purines in human liver and skeletal muscle with short-term exhaustive exercise. *Am J Physiol*, 266(1 Pt 2), R81-86. doi:10.1152/ajpregu.1994.266.1.R81
- Hermann, A., Goyal, R., & Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem*, 279(46), 48350-48359. doi:10.1074/jbc.M403427200
- Herraez, E., Lozano, E., Macias, R. I., Vaquero, J., Bujanda, L., Banales, J. M., . . . Briz, O. (2013). Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology*, 58(3), 1065-1073. doi:10.1002/hep.26425
- Herzfeld, A., & Raper, S. M. (1979). Uridine kinase activities in developing, adult and neoplastic rat tissues. *Biochem J*, 182(3), 771-778. doi:10.1042/bj1820771
- Heydrick, S. J., Lardeux, B. R., & Mortimore, G. E. (1991). Uptake and degradation of cytoplasmic RNA by hepatic lysosomes. Quantitative relationship to RNA turnover. *J Biol Chem*, 266(14), 8790-8796.
- Higashigawa, M., Ido, M., Nagao, Y., Kuwabara, H., Hori, H., Ohkubo, T., . . . Sakurai, M. (1991). Decreased DNA polymerase sensitivity to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-

- triphosphate in P388 murine leukemic cells resistant to vincristine. *Leuk Res*, 15(8), 675-681. doi:10.1016/0145-2126(91)90069-6
- Hines, V., Keys, L. D., 3rd, & Johnston, M. (1986). Purification and properties of the bovine liver mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 261(24), 11386-11392.
- Hirimburegama, K., Durnez, P., Keleman, J., Oris, E., Vergauwen, R., Mergelsberg, H., & Thevelein, J. M. (1992). Nutrient-induced activation of trehalase in nutrient-starved cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: cAMP is not involved as second messenger. *J Gen Microbiol*, 138(10), 2035-2043. doi:10.1099/00221287-138-10-2035
- Hirschi, M., Johnson, Z. L., & Lee, S. Y. (2017). Visualizing multistep elevator-like transitions of a nucleoside transporter. *Nature*, 545(7652), 66-70. doi:10.1038/nature22057
- Hofer, A., Crona, M., Logan, D. T., & Sjöberg, B. M. (2012). DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47(1), 50-63. doi:10.3109/10409238.2011.630372
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015), 49-53. doi:10.1126/science.1905840
- Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Nuland, A., Van de Velde, S., & Thevelein, J. M. (2004). The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends Biochem Sci*, 29(10), 556-564. doi:10.1016/j.tibs.2004.08.010
- Holstege, A., Gengenbacher, H. M., Jehle, L., & Gerok, W. (1992). Uridine catabolism by the isolated perfused rat liver. *J Hepatol*, 14(2-3), 335-341. doi:10.1016/0168-8278(92)90180-w
- Holstege, A., Gengenbacher, H. M., Jehle, L., & Hoppmann, J. (1991). Facilitated diffusion and sodium-dependent transport of purine and pyrimidine nucleosides in rat liver. *Hepatology*, 14(2), 373-380.
- Hong, M., Schlichter, L., & Bendayan, R. (2001). A novel zidovudine uptake system in microglia. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(1), 141-149.
- Hotchkiss, R. D. (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem*, 175(1), 315-332.
- Houslay, M. D., & Kolch, W. (2000). Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol*, 58(4), 659-668.
- Hoxhaj, G., Hughes-Hallett, J., Timson, R. C., Ilagan, E., Yuan, M., Asara, J. M., . . . Manning, B. D. (2017). The mTORC1 Signaling Network Senses Changes in Cellular Purine Nucleotide Levels. *Cell Rep*, 21(5), 1331-1346. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.029
- Hu, H., Endres, C. J., Chang, C., Umapathy, N. S., Lee, E. W., Fei, Y. J., . . . Unadkat, J. D. (2006). Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3). *Mol Pharmacol*, 69(5), 1542-1553. doi:10.1124/mol.105.018945
- Hu, X., Zhang, L., Mao, S. Q., Li, Z., Chen, J., Zhang, R. R., . . . Xu, G. L. (2014). Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14(4), 512-522. doi:10.1016/j.stem.2014.01.001
- Huang, G., Liu, L., Wang, H., Gou, M., Gong, P., Tian, C., . . . Liu, L. (2020). Tet1 Deficiency Leads to Premature Reproductive Aging by Reducing Spermatogonia Stem Cells and Germ Cell Differentiation. *iScience*, 23(3), 100908. doi:10.1016/j.isci.2020.100908
- Huang, P., Chubb, S., Hertel, L. W., Grindey, G. B., & Plunkett, W. (1991). Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res*, 51(22), 6110-6117.
- Huang, P., Chubb, S., & Plunkett, W. (1990). Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. A mechanism for cytotoxicity. *J Biol Chem*, 265(27), 16617-16625.
- Huang, P., & Plunkett, W. (1995). Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol*, 22(4 Suppl 11), 19-25.

- Huang, P., Robertson, L. E., Wright, S., & Plunkett, W. (1995). High molecular weight DNA fragmentation: a critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells. *Clin Cancer Res*, 1(9), 1005-1013.
- Huang, P., Sandoval, A., Van Den Neste, E., Keating, M. J., & Plunkett, W. (2000). Inhibition of RNA transcription: a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine. *Leukemia*, 14(8), 1405-1413. doi:10.1038/sj.leu.2401845
- Huang, Q. Q., Harvey, C. M., Paterson, A. R., Cass, C. E., & Young, J. D. (1993). Functional expression of Na(+)-dependent nucleoside transport systems of rat intestine in isolated oocytes of *Xenopus laevis*. Demonstration that rat jejunum expresses the purine-selective system N1 (cif) and a second, novel system N3 having broad specificity for purine and pyrimidine nucleosides. *J Biol Chem*, 268(27), 20613-20619.
- Huang, Q. Q., Yao, S. Y., Ritzel, M. W., Paterson, A. R., Cass, C. E., & Young, J. D. (1994). Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J Biol Chem*, 269(27), 17757-17760.
- Huang, X., Chen, Y. Q., Xu, G. L., & Peng, S. H. (2019). [DNA methylation in adipose tissue and the development of diabetes and obesity]. *Yi Chuan*, 41(2), 98-110. doi:10.16288/j.ycz.18-182
- Huang, Y., Anderle, P., Bussey, K. J., Barbacioru, C., Shankavaram, U., Dai, Z., . . . Sadee, W. (2004). Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*, 64(12), 4294-4301. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3884
- Huang, Y., Chavez, L., Chang, X., Wang, X., Pastor, W. A., Kang, J., . . . Rao, A. (2014). Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(4), 1361-1366. doi:10.1073/pnas.1322921111
- Hubeek, I., Stam, R. W., Peters, G. J., Broekhuizen, R., Meijerink, J. P., van Wering, E. R., . . . Kaspers, G. J. (2005). The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*, 93(12), 1388-1394. doi:10.1038/sj.bjc.6602881
- Huber-Ruano, I., Errasti-Murugarren, E., Godoy, V., Vera, A., Andreu, A. L., Garcia-Arumi, E., . . . Pastor-Anglada, M. (2012). Functional outcome of a novel SLC29A3 mutation identified in a patient with H syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 428(4), 532-537. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.143
- Huber-Ruano, I., & Pastor-Anglada, M. (2009). Transport of nucleoside analogs across the plasma membrane: a clue to understanding drug-induced cytotoxicity. *Curr Drug Metab*, 10(4), 347-358. doi:10.2174/138920009788499030
- Huber-Ruano, I., Pinilla-Macua, I., Torres, G., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2010). Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells. *J Cell Physiol*, 225(2), 620-630. doi:10.1002/jcp.22254
- Hughes, S. J., Cravetchi, X., Vilas, G., & Hammond, J. R. (2015). Adenosine A1 receptor activation modulates human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) activity via PKC-mediated phosphorylation of serine-281. *Cell Signal*, 27(5), 1008-1018. doi:10.1016/j.cellsig.2015.02.023
- Hundal, H. S., & Taylor, P. M. (2009). Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(4), E603-613. doi:10.1152/ajpendo.91002.2008
- Hunsucker, S. A., Spychala, J., & Mitchell, B. S. (2001). Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *J Biol Chem*, 276(13), 10498-10504. doi:10.1074/jbc.M011218200
- Hyde, R., Cwiklinski, E. L., MacAulay, K., Taylor, P. M., & Hundal, H. S. (2007). Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability. *J Biol Chem*, 282(27), 19788-19798. doi:10.1074/jbc.M611520200

Hyde, R. J., Cass, C. E., Young, J. D., & Baldwin, S. A. (2001). The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol*, 18(1), 53-63.

I

International Transporter, C., Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., . . . Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 9(3), 215-236. doi:10.1038/nrd3028

Iraqui, I., Vissers, S., Bernard, F., de Craene, J. O., Boles, E., Urrestarazu, A., & Andre, B. (1999). Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol Cell Biol*, 19(2), 989-1001. doi:10.1128/mcb.19.2.989

Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., & Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310), 1129-1133. doi:10.1038/nature09303

Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., . . . Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), 1300-1303. doi:10.1126/science.1210597

Iurlaro, M., McInroy, G. R., Burgess, H. E., Dean, W., Raiber, E. A., Bachman, M., . . . Reik, W. (2016). In vivo genome-wide profiling reveals a tissue-specific role for 5-formylcytosine. *Genome Biol*, 17(1), 141. doi:10.1186/s13059-016-1001-5

Iwan, K., Rahimoff, R., Kirchner, A., Spada, F., Schroder, A. S., Kosmatchev, O., . . . Carell, T. (2018). 5-Formylcytosine to cytosine conversion by C-C bond cleavage in vivo. *Nat Chem Biol*, 14(1), 72-78. doi:10.1038/nchembio.2531

Iwasaki, H., Huang, P., Keating, M. J., & Plunkett, W. (1997). Differential incorporation of ara-C, gemcitabine, and fludarabine into replicating and repairing DNA in proliferating human leukemia cells. *Blood*, 90(1), 270-278.

J

Jackson, C. D., Weis, C., Miller, B. J., & James, S. J. (1997). Dietary nucleotides: effects on cell proliferation following partial hepatectomy in rats fed NIH-31, AIN-76A, or folate/methyl-deficient diets. *J Nutr*, 127(5 Suppl), 834S-837S. doi:10.1093/jn/127.5.834S

Jaffrey, S. R., & Snyder, S. H. (1995). Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 417-440. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.002221

Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., . . . Mootha, V. K. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 336(6084), 1040-1044. doi:10.1126/science.1218595

Jamieson, G. P., Snook, M. B., Bradley, T. R., Bertoncello, I., & Wiley, J. S. (1989). Transport and metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in human ovarian adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 49(2), 309-313.

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

Jarvis, M. F., Yu, H., McGaraughty, S., Wismer, C. T., Mikusa, J., Zhu, C., . . . Kowaluk, E. A. (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of A-286501, a novel orally active adenosine kinase inhibitor. *Pain*, 96(1-2), 107-118. doi:10.1016/s0304-3959(01)00435-3

- Jarvis, S. M., & Griffith, D. A. (1991). Expression of the rabbit intestinal N² Na⁺/nucleoside transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J*, 278 (Pt 2), 605-607. doi:10.1042/bj2780605
- Jarvis, S. M., & Young, J. D. (1981). Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J*, 194(1), 331-339. doi:10.1042/bj1940331
- Jarvis, S. M., Young, J. D., & Ellory, J. C. (1980). Nucleoside transport in human erythrocytes. Apparent molecular weight of the nitrobenzylthioinosine-binding complex estimated by radiation-inactivation analysis. *Biochem J*, 190(2), 373-376. doi:10.1042/bj1900373
- Jennings, L. L., Hao, C., Cabrita, M. A., Vickers, M. F., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (2001). Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system. *Neuropharmacology*, 40(5), 722-731. doi:10.1016/s0028-3908(00)00207-0
- Jewell, J. L., Kim, Y. C., Russell, R. C., Yu, F. X., Park, H. W., Plouffe, S. W., . . . Guan, K. L. (2015). Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*, 347(6218), 194-198. doi:10.1126/science.1259472
- Ji, X., Tang, C., Zhao, Q., Wang, W., & Xiong, Y. (2014). Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(41), E4305-4314. doi:10.1073/pnas.1412289111
- Jin, S. G., Zhang, Z. M., Dunwell, T. L., Harter, M. R., Wu, X., Johnson, J., . . . Pfeifer, G. P. (2016). Tet3 Reads 5-Carboxylcytosine through Its CXXC Domain and Is a Potential Guardian against Neurodegeneration. *Cell Rep*, 14(3), 493-505. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.044
- Johnson, S. A. (2001). Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother*, 2(6), 929-943. doi:10.1517/14656566.2.6.929
- Johnson, Z. L., Cheong, C. G., & Lee, S. Y. (2012). Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature*, 483(7390), 489-493. doi:10.1038/nature10882
- Johnston, P. G., & Kaye, S. (2001). Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anticancer Drugs*, 12(8), 639-646. doi:10.1097/00001813-200109000-00001
- Johnston, P. G., Lenz, H. J., Leichman, C. G., Danenberg, K. D., Allegra, C. J., Danenberg, P. V., & Leichman, L. (1995). Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res*, 55(7), 1407-1412.
- Jones, P. A., & Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet*, 10(11), 805-811. doi:10.1038/nrg2651
- Jordan, A., & Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*, 67, 71-98. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.71
- Jordheim, L. P., & Dumontet, C. (2007). Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. *Biochim Biophys Acta*, 1776(2), 138-159. doi:10.1016/j.bbcan.2007.07.004
- Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F., & Dumontet, C. (2013). Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 12(6), 447-464. doi:10.1038/nrd4010
- Jung, N., Lehmann, C., Rubbert, A., Knispel, M., Hartmann, P., van Lunzen, J., . . . Taubert, D. (2008). Relevance of the organic cation transporters 1 and 2 for antiretroviral drug therapy in human immunodeficiency virus infection. *Drug Metab Dispos*, 36(8), 1616-1623. doi:10.1124/dmd.108.020826
- Jurecka, A. (2009). Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J Inherit Metab Dis*, 32(2), 247-263. doi:10.1007/s10545-009-1094-z
- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., & Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*, 12(2), 206-222. doi:10.1002/cbic.201000195

Juttermann, R., Li, E., & Jaenisch, R. (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(25), 11797-11801. doi:10.1073/pnas.91.25.11797

K

Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., & Saitou, M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J*, 32(3), 340-353. doi:10.1038/emboj.2012.331

Kalckar, H. M. (1950). The biological incorporation of purines and pyrimidines into nucleosides and nucleic acid. *Biochim Biophys Acta*, 4(1-3), 232-237. doi:10.1016/0006-3002(50)90029-1

Kang, N., Jun, A. H., Bhutia, Y. D., Kannan, N., Unadkat, J. D., & Govindarajan, R. (2010). Human equilibrative nucleoside transporter-3 (hENT3) spectrum disorder mutations impair nucleoside transport, protein localization, and stability. *J Biol Chem*, 285(36), 28343-28352. doi:10.1074/jbc.M110.109199

Karran, P. (2006). Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *Br Med Bull*, 79-80, 153-170. doi:10.1093/bmb/ldl020

Kashlan, O. B., & Cooperman, B. S. (2003). Comprehensive model for allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase: refinements and consequences. *Biochemistry*, 42(6), 1696-1706. doi:10.1021/bi020634d

Katsura, T., & Inui, K. (2003). Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug Metab Pharmacokinet*, 18(1), 1-15. doi:10.2133/dmpk.18.1

Katsuyama, S., Sugino, K., Sasazawa, Y., Nakano, Y., Aono, H., Morishita, K., . . . Simizu, S. (2016). Identification of a novel compound that inhibits osteoclastogenesis by suppressing nucleoside transporters. *FEBS Lett*, 590(8), 1152-1162. doi:10.1002/1873-3468.12146

Kawasaki, H., Carrera, C. J., Piro, L. D., Saven, A., Kipps, T. J., & Carson, D. A. (1993). Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'-nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood*, 81(3), 597-601.

Kazmierczuk, Z., Vilpo, J., Hildebrand, C., & Wright, G. (1990). Synthesis and cytotoxicity of deoxyadenosine analogues: isomer distribution in the sodium salt glycosylation of 2,6-disubstituted purines. *J Med Chem*, 33(6), 1683-1687. doi:10.1021/jm00168a023

Keller, T., Egenberger, B., Gorboulev, V., Bernhard, F., Uzelac, Z., Gorbunov, D., . . . Koepsell, H. (2011). The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *J Biol Chem*, 286(43), 37874-37886. doi:10.1074/jbc.M111.289330

Kemmerich, K., Dingler, F. A., Rada, C., & Neuberger, M. S. (2012). Germline ablation of SMUG1 DNA glycosylase causes loss of 5-hydroxymethyluracil- and UNG-backup uracil-excision activities and increases cancer predisposition of Ung^{-/-}Msh2^{-/-} mice. *Nucleic Acids Res*, 40(13), 6016-6025. doi:10.1093/nar/gks259

Keohane, C., Radia, D. H., & Harrison, C. N. (2013). Treatment and management of myelofibrosis in the era of JAK inhibitors. *Biologics*, 7, 189-198. doi:10.2147/BTT.S34942

Khare, T., Pai, S., Koncevicus, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., . . . Petronis, A. (2012). 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat Struct Mol Biol*, 19(10), 1037-1043. doi:10.1038/nsmb.2372

Kim, J. H., Lee, C., Cheong, H. S., Koh, Y., Ahn, K. S., Kim, H. L., . . . Yoon, S. S. (2016). SLC29A1 (ENT1) polymorphisms and outcome of complete remission in acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 78(3), 533-540. doi:10.1007/s00280-016-3103-x

- Kim, J. W., Kim, S., Kim, S., Lee, H., Lee, J. O., & Jin, M. S. (2017). Structural insights into the elevator-like mechanism of the sodium/citrate symporter CitS. *Sci Rep*, 7(1), 2548. doi:10.1038/s41598-017-02794-x
- Kim, S. R., Saito, Y., Maekawa, K., Sugiyama, E., Kaniwa, N., Ueno, H., . . . Sawada, J. (2006). Thirty novel genetic variations in the SLC29A1 gene encoding human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *Drug Metab Pharmacokinet*, 21(3), 248-256. doi:10.2133/dmpk.21.248
- Kim, Y., Yun, C. W., & Philpott, C. C. (2002). Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 21(14), 3632-3642. doi:10.1093/emboj/cdf382
- Kimura, H., Takeda, M., Narikawa, S., Enomoto, A., Ichida, K., & Endou, H. (2002). Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(1), 293-298. doi:10.1124/jpet.301.1.293
- Kimura, T., Takeda, S., Sagiya, Y., Gotoh, M., Nakamura, Y., & Arakawa, H. (2003). Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nat Genet*, 34(4), 440-445. doi:10.1038/ng1212
- King, A. E., Ackley, M. A., Cass, C. E., Young, J. D., & Baldwin, S. A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*, 27(8), 416-425. doi:10.1016/j.tips.2006.06.004
- King, K. M., Damaraju, V. L., Vickers, M. F., Yao, S. Y., Lang, T., Tackaberry, T. E., . . . Cass, C. E. (2006). A comparison of the transportability, and its role in cytotoxicity, of clofarabine, cladribine, and fludarabine by recombinant human nucleoside transporters produced in three model expression systems. *Mol Pharmacol*, 69(1), 346-353. doi:10.1124/mol.105.015768
- Kipps, T. J. (2000). Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*, 7(4), 223-234. doi:10.1097/00062752-200007000-00005
- Kiss, A., Farah, K., Kim, J., Garriock, R. J., Drysdale, T. A., & Hammond, J. R. (2000). Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochem J*, 352 Pt 2, 363-372.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., & Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285(1-2), 1-24. doi:10.1016/s0378-1119(02)00398-0
- Kitsera, N., Allgayer, J., Parsa, E., Geier, N., Rossa, M., Carell, T., & Khobta, A. (2017). Functional impacts of 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine, and 5-carboxycytosine at a single hemi-modified CpG dinucleotide in a gene promoter. *Nucleic Acids Res*, 45(19), 11033-11042. doi:10.1093/nar/gkx718
- Kitsera, N., Rodriguez-Alvarez, M., Emmert, S., Carell, T., & Khobta, A. (2019). Nucleotide excision repair of abasic DNA lesions. *Nucleic Acids Res*, 47(16), 8537-8547. doi:10.1093/nar/gkz558
- Klasson, H., Fink, G. R., & Ljungdahl, P. O. (1999). Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol*, 19(8), 5405-5416. doi:10.1128/mcb.19.8.5405
- Klein, K., Kullak-Ublick, G. A., Wagner, M., Trauner, M., & Eloranta, J. J. (2009). Hepatocyte nuclear factor-4alpha and bile acids regulate human concentrative nucleoside transporter-1 gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(4), G936-947. doi:10.1152/ajpgi.90678.2008
- Kline, E. R., Bassit, L., Hernandez-Santiago, B. I., Detorio, M. A., Liang, B., Kleinhenz, D. J., . . . Sutliff, R. L. (2009). Long-term exposure to AZT, but not d4T, increases endothelial cell oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol*, 9(1), 1-12. doi:10.1007/s12012-008-9029-8

- Kobayashi, Y., Ohshiro, N., Sakai, R., Ohbayashi, M., Kohyama, N., & Yamamoto, T. (2005). Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *J Pharm Pharmacol*, 57(5), 573-578. doi:10.1211/0022357055966
- Koepsell, H. (2011). Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biol Chem*, 392(1-2), 95-101. doi:10.1515/BC.2011.009
- Koepsell, H., & Endou, H. (2004). The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch*, 447(5), 666-676. doi:10.1007/s00424-003-1089-9
- Koepsell, H., Lips, K., & Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*, 24(7), 1227-1251. doi:10.1007/s11095-007-9254-z
- Kohnken, R., Kodigepalli, K. M., & Wu, L. (2015). Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications. *Mol Cancer*, 14, 176. doi:10.1186/s12943-015-0446-6
- Kolassa, N., Stengg, R., & Turnheim, K. (1977). Salvage of adenosine, inosine, hypoxanthine, and adenine by the isolated epithelium of guinea pig jejunum. *Can J Physiol Pharmacol*, 55(5), 1039-1044. doi:10.1139/y77-143
- Kollareddy, M., Dimitrova, E., Vallabhaneni, K. C., Chan, A., Le, T., Chauhan, K. M., . . . Martinez, L. A. (2015). Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nat Commun*, 6, 7389. doi:10.1038/ncomms8389
- Kong, W., Engel, K., & Wang, J. (2004). Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab*, 5(1), 63-84. doi:10.2174/1389200043489162
- Kowaluk, E. A., Bhagwat, S. S., & Jarvis, M. F. (1998). Adenosine kinase inhibitors. *Curr Pharm Des*, 4(5), 403-416.
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue), D152-157. doi:10.1093/nar/gkq1027
- Kralovics, R. (2008). Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 22(10), 1841-1848. doi:10.1038/leu.2008.233
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., Teo, S. S., Tiedt, R., Passweg, J. R., . . . Skoda, R. C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 352(17), 1779-1790. doi:10.1056/NEJMoa051113
- Kraus, T. F., Globisch, D., Wagner, M., Eigenbrod, S., Widmann, D., Munzel, M., . . . Kretzschmar, H. A. (2012). Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors. *Int J Cancer*, 131(7), 1577-1590. doi:10.1002/ijc.27429
- Kriaucionis, S., & Bird, A. (2003). DNA methylation and Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 2, R221-227. doi:10.1093/hmg/ddg286
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 324(5929), 929-930. doi:10.1126/science.1169786
- Kriaucionis, S., & Klöse, R. J. (2020). ATACing DNA Methylation during Differentiation. *Mol Cell*, 77(6), 1159-1161. doi:10.1016/j.molcel.2020.02.026
- Kriaucionis, S., & Tahiliani, M. (2014). Expanding the epigenetic landscape: novel modifications of cytosine in genomic DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(10), a018630. doi:10.1101/cshperspect.a018630
- Kriel, J., Haesendonckx, S., Rubio-Teixeira, M., Van Zeebroeck, G., & Thevelein, J. M. (2011). From transporter to transceptor: signaling from transporters provokes re-evaluation of complex trafficking and regulatory controls: endocytic internalization and intracellular trafficking of nutrient transceptors may, at least in part, be governed by their signaling function. *Bioessays*, 33(11), 870-879. doi:10.1002/bies.201100100

- Kroep, J. R., Loves, W. J., van der Wilt, C. L., Alvarez, E., Talianidis, I., Boven, E., . . . Peters, G. J. (2002). Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther*, 1(6), 371-376.
- Kroep, J. R., van Moorsel, C. J., Veerman, G., Voorn, D. A., Schultz, R. M., Worzalla, J. F., . . . Peters, G. J. (1998). Role of deoxycytidine kinase (dCK), thymidine kinase 2 (TK2), and deoxycytidine deaminase (dCDA) in the antitumor activity of gemcitabine (dFdC). *Adv Exp Med Biol*, 431, 657-660. doi:10.1007/978-1-4615-5381-6_127
- Kroeze, L. I., Aslanyan, M. G., van Rooij, A., Koorenhof-Scheele, T. N., Massop, M., Carell, T., . . . Gimema. (2014). Characterization of acute myeloid leukemia based on levels of global hydroxymethylation. *Blood*, 124(7), 1110-1118. doi:10.1182/blood-2013-08-518514
- Kroll, K., Decking, U. K., Dreikorn, K., & Schrader, J. (1993). Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ Res*, 73(5), 846-856. doi:10.1161/01.res.73.5.846
- Kudo, Y., Tateishi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Asaoka, Y., Ijichi, H., . . . Koike, K. (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci*, 103(4), 670-676. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02213.x
- Kwong, F. Y., Tse, C. M., Jarvis, S. M., Choy, M. Y., & Young, J. D. (1987). Purification and reconstitution studies of the nucleoside transporter from pig erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 904(1), 105-116. doi:10.1016/0005-2736(87)90091-5

L

- Lacoste, C., Herve, J., Bou Nader, M., Dos Santos, A., Moniaux, N., Valogne, Y., . . . Faivre, J. (2012). Iodide transporter NIS regulates cancer cell motility and invasiveness by interacting with the Rho guanine nucleotide exchange factor LARG. *Cancer Res*, 72(21), 5505-5515. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0516
- Lai, Y., Bakken, A. H., & Unadkat, J. D. (2002). Simultaneous expression of hCNT1-CFP and hENT1-YFP in Madin-Darby canine kidney cells. Localization and vectorial transport studies. *J Biol Chem*, 277(40), 37711-37717. doi:10.1074/jbc.M204986200
- Lai, Y., Lee, E. W., Ton, C. C., Vijay, S., Zhang, H., & Unadkat, J. D. (2005). Conserved residues F316 and G476 in the concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) affect guanosine sensitivity and membrane expression, respectively. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(1), C39-45. doi:10.1152/ajpcell.00192.2004
- Lai, Y., Tse, C. M., & Unadkat, J. D. (2004). Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J Biol Chem*, 279(6), 4490-4497. doi:10.1074/jbc.M307938200
- Lajtha, L. G., & Vane, J. R. (1958). Dependence of bone marrow cells on the liver for purine supply. *Nature*, 182(4629), 191-192. doi:10.1038/182191a0
- Lamba, J. K. (2009). Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics*, 10(10), 1657-1674. doi:10.2217/pgs.09.118
- Lamont, E. B., & Schilsky, R. L. (1999). The oral fluoropyrimidines in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 5(9), 2289-2296.
- Landfear, S. M. (2010). Transporters for drug delivery and as drug targets in parasitic protozoa. *Clin Pharmacol Ther*, 87(1), 122-125. doi:10.1038/clpt.2009.116
- Lane, A. N., & Fan, T. W. (2015). Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res*, 43(4), 2466-2485. doi:10.1093/nar/gkv047
- Lane, J., Martin, T. A., McGuigan, C., Mason, M. D., & Jiang, W. G. (2010). The differential expression of hCNT1 and hENT1 in breast cancer and the possible impact on breast cancer therapy. *J Exp Ther Oncol*, 8(3), 203-210.
- Lang, T. T., Selner, M., Young, J. D., & Cass, C. E. (2001). Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hcnt2) activity by gene transfer confers sensitivity to

- fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Mol Pharmacol*, 60(5), 1143-1152. doi:10.1124/mol.60.5.1143
- Lang, T. T., Young, J. D., & Cass, C. E. (2004). Interactions of nucleoside analogs, caffeine, and nicotine with human concentrative nucleoside transporters 1 and 2 stably produced in a transport-defective human cell line. *Mol Pharmacol*, 65(4), 925-933. doi:10.1124/mol.65.4.925
- Langemeijer, S. M., Kuiper, R. P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M. G., Massop, M., . . . Jansen, J. H. (2009). Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*, 41(7), 838-842. doi:10.1038/ng.391
- Larrayoz, I. M., Casado, F. J., Pastor-Anglada, M., & Lostao, M. P. (2004). Electrophysiological characterization of the human Na(+)/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J Biol Chem*, 279(10), 8999-9007. doi:10.1074/jbc.M311940200
- Laukka, T., Mariani, C. J., Ihantola, T., Cao, J. Z., Hokkanen, J., Kaelin, W. G., Jr., . . . Koivunen, P. (2016). Fumarate and Succinate Regulate Expression of Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes. *J Biol Chem*, 291(8), 4256-4265. doi:10.1074/jbc.M115.688762
- Lavoine, A., Claeysens, S., & Chedeville, A. (1990). Metabolism of adenosine through adenosine kinase inhibits gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 187(2), 403-407. doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15318.x
- Lawrence, T. S., Eisbruch, A., & Shewach, D. S. (1997). Gemcitabine-mediated radiosensitization. *Semin Oncol*, 24(2 Suppl 7), S7-24-S27-28.
- Le Bihan, Y. V., Angeles Izquierdo, M., Coste, F., Aller, P., Culard, F., Gehrke, T. H., . . . Castaing, B. (2011). 5-Hydroxy-5-methylhydantoin DNA lesion, a molecular trap for DNA glycosylases. *Nucleic Acids Res*, 39(14), 6277-6290. doi:10.1093/nar/gkr215
- Le Hir, M. (1990). Evidence for separate carriers for purine nucleosides and for pyrimidine nucleosides in the renal brush border membrane. *Ren Physiol Biochem*, 13(3), 154-161. doi:10.1159/000173361
- Lee, C. W., Cheeseman, C. I., & Jarvis, S. M. (1988). Na⁺- and K⁺-dependent uridine transport in rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 942(1), 139-149. doi:10.1016/0005-2736(88)90283-0
- Lee, C. W., Sokoloski, J. A., Sartorelli, A. C., & Handschumacher, R. E. (1994). Differentiation of HL-60 cells by dimethylsulfoxide activates a Na⁺-dependent nucleoside transport system. *In Vivo*, 8(5), 795-801.
- Lee, E. W., Lai, Y., Zhang, H., & Unadkat, J. D. (2006). Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J Biol Chem*, 281(24), 16700-16706. doi:10.1074/jbc.M513825200
- Leisewitz, A. V., Zimmerman, E. I., Huang, M., Jones, S. Z., Yang, J., & Graves, L. M. (2011). Regulation of ENT1 expression and ENT1-dependent nucleoside transport by c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 404(1), 370-375. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.125
- Lepesheva, G. I., Hargrove, T. Y., Kleshchenko, Y., Nes, W. D., Villalta, F., & Waterman, M. R. (2008). CYP51: A major drug target in the cytochrome P450 superfamily. *Lipids*, 43(12), 1117-1125. doi:10.1007/s11745-008-3225-y
- Lercher, L., McDonough, M. A., El-Sagheer, A. H., Thalhammer, A., Kriaucionis, S., Brown, T., & Schofield, C. J. (2014). Structural insights into how 5-hydroxymethylation influences transcription factor binding. *Chem Commun (Camb)*, 50(15), 1794-1796. doi:10.1039/c3cc48151d
- Leung, G. P., & Tse, C. M. (2007). The role of mitochondrial and plasma membrane nucleoside transporters in drug toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3(5), 705-718. doi:10.1517/17425255.3.5.705

- Leung, G. P., Ward, J. L., Wong, P. Y., & Tse, C. M. (2001). Characterization of nucleoside transport systems in cultured rat epididymal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(5), C1076-1082. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.5.C1076
- Lewis, W. (2005). Nucleoside reverse transcriptase inhibitors, mitochondrial DNA and AIDS therapy. *Antivir Ther*, 10 Suppl 2, M13-27.
- Leysen, P., De Clercq, E., & Neyts, J. (2008). Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res*, 78(1), 9-25. doi:10.1016/j.antiviral.2008.01.004
- Li, H., Smolen, G. A., Beers, L. F., Xia, L., Gerald, W., Wang, J., . . . Lee, S. B. (2008). Adenosine transporter ENT4 is a direct target of EWS/WT1 translocation product and is highly expressed in desmoplastic small round cell tumor. *PLoS One*, 3(6), e2353. doi:10.1371/journal.pone.0002353
- Li, J. Y., Boado, R. J., & Pardridge, W. M. (2001). Differential kinetics of transport of 2',3'-dideoxyinosine and adenosine via concentrative Na⁺ nucleoside transporter CNT2 cloned from rat blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(2), 735-740.
- Li, J. Y., Boado, R. J., & Pardridge, W. M. (2001). Cloned blood-brain barrier adenosine transporter is identical to the rat concentrative Na⁺ nucleoside cotransporter CNT2. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(8), 929-936. doi:10.1097/00004647-200108000-00005
- Li, L., Koo, S. H., Hong, I. H., & Lee, E. J. (2009). Identification of functional promoter haplotypes of human concentrative nucleoside transporter 2, hCNT2 (SLC28A2). *Drug Metab Pharmacokinet*, 24(2), 161-166. doi:10.2133/dmpk.24.161
- Li, L., Tan, C. M., Koo, S. H., Chong, K. T., & Lee, E. J. (2007). Identification and functional analysis of variants in the human concentrative nucleoside transporter 2, hCNT2 (SLC28A2) in Chinese, Malays and Indians. *Pharmacogenet Genomics*, 17(9), 783-786. doi:10.1097/FPC.0b013e3281c10e41
- Li, L. H., Olin, E. J., Buskirk, H. H., & Reineke, L. M. (1970). Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res*, 30(11), 2760-2769.
- Li, Z., Cai, X., Cai, C. L., Wang, J., Zhang, W., Petersen, B. E., . . . Xu, M. (2011). Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, 118(17), 4509-4518. doi:10.1182/blood-2010-12-325241
- Lian, C. G., Xu, Y., Ceol, C., Wu, F., Larson, A., Dresser, K., . . . Shi, Y. G. (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*, 150(6), 1135-1146. doi:10.1016/j.cell.2012.07.033
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., & Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 14(8), 543-560. doi:10.1038/nrd4626
- Lips, K. S., Volk, C., Schmitt, B. M., Pfeil, U., Arndt, P., Miska, D., . . . Koepsell, H. (2005). Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33(1), 79-88. doi:10.1165/rcmb.2004-0363OC
- Liu, L., Mao, S. Q., Ray, C., Zhang, Y., Bell, F. T., Ng, S. F., . . . Li, X. (2015). Differential regulation of genomic imprinting by TET proteins in embryonic stem cells. *Stem Cell Res*, 15(2), 435-443. doi:10.1016/j.scr.2015.08.010
- Liu, M., Zhang, Y., Yang, J., Cui, X., Zhou, Z., Zhan, H., . . . Li, M. (2020). 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*, 158(3), 679-692 e671. doi:10.1053/j.gastro.2019.10.038
- Liu, Y. C., Li, F., Handler, J., Huang, C. R., Xiang, Y., Neretti, N., . . . Dang, C. V. (2008). Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *PLoS One*, 3(7), e2722. doi:10.1371/journal.pone.0002722
- Liutkeviciute, Z., Kriukiene, E., Licyte, J., Rudyte, M., Urbanaviciute, G., & Klimasauskas, S. (2014). Direct decarboxylation of 5-carboxylcytosine by DNA C5-methyltransferases. *J Am Chem Soc*, 136(16), 5884-5887. doi:10.1021/ja5019223
- Liutkeviciute, Z., Lukinavicius, G., Masevicius, V., Daujotyte, D., & Klimasauskas, S. (2009). Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nat Chem Biol*, 5(6), 400-402. doi:10.1038/nchembio.172

- Loewen, S. K., Ng, A. M., Yao, S. Y., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (1999). Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na(+) nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2. *J Biol Chem*, 274(35), 24475-24484. doi:10.1074/jbc.274.35.24475
- Loffler, M., Carrey, E. A., & Zameitat, E. (2015). Orotic Acid, More Than Just an Intermediate of Pyrimidine de novo Synthesis. *J Genet Genomics*, 42(5), 207-219. doi:10.1016/j.jgg.2015.04.001
- Loffler, M., Morote-Garcia, J. C., Eltzschig, S. A., Coe, I. R., & Eltzschig, H. K. (2007). Physiological roles of vascular nucleoside transporters. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(5), 1004-1013. doi:10.1161/ATVBAHA.106.126714
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 330-338. doi:10.1038/nrc1074
- Lostao, M. P., Mata, J. F., Larrayoz, I. M., Inzillo, S. M., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2000). Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett*, 481(2), 137-140. doi:10.1016/S0014-5793(00)01983-9
- Lotfi, K., Mansson, E., Chandra, J., Wang, Y., Xu, D., Knaust, E., . . . Albertioni, F. (2001). Pharmacological basis for cladribine resistance in a human acute T lymphoblastic leukaemia cell line selected for resistance to etoposide. *Br J Haematol*, 113(2), 339-346. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02751.x
- Lotfi, K., Mansson, E., Peterson, C., Eriksson, S., & Albertioni, F. (2002). Low level of mitochondrial deoxyguanosine kinase is the dominant factor in acquired resistance to 9-beta-D-arabinofuranosylguanine cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(5), 1489-1496. doi:10.1016/S0006-291X(02)00415-1
- Lu, G., Zhou, Q. X., Kang, S., Li, Q. L., Zhao, L. C., Chen, J. D., . . . Liu, J. G. (2010). Chronic morphine treatment impaired hippocampal long-term potentiation and spatial memory via accumulation of extracellular adenosine acting on adenosine A1 receptors. *J Neurosci*, 30(14), 5058-5070. doi:10.1523/JNEUROSCI.0148-10.2010
- Lu, H., Chen, C., & Klaassen, C. (2004). Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metab Dispos*, 32(12), 1455-1461. doi:10.1124/dmd.104.001123
- Lu, X., Gong, S., Monks, A., Zaharevitz, D., & Moscow, J. A. (2002). Correlation of nucleoside and nucleobase transporter gene expression with antimetabolite drug cytotoxicity. *J Exp Ther Oncol*, 2(4), 200-212. doi:10.1046/j.1359-4117.2002.01035.x
- Lu, X., Han, D., Zhao, B. S., Song, C. X., Zhang, L. S., Dore, L. C., & He, C. (2015). Base-resolution maps of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reveal genome-wide DNA demethylation dynamics. *Cell Res*, 25(3), 386-389. doi:10.1038/cr.2015.5
- Lu, X., Zhao, B. S., & He, C. (2015). TET family proteins: oxidation activity, interacting molecules, and functions in diseases. *Chem Rev*, 115(6), 2225-2239. doi:10.1021/cr500470n
- Luengo, A., Gui, D. Y., & Vander Heiden, M. G. (2017). Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol*, 24(9), 1161-1180. doi:10.1016/j.chembiol.2017.08.028
- Lum, P. Y., Ngo, L. Y., Bakken, A. H., & Unadkat, J. D. (2000). Human intestinal es nucleoside transporter: molecular characterization and nucleoside inhibitory profiles. *Cancer Chemother Pharmacol*, 45(4), 273-278. doi:10.1007/s002800050040

M

- Mackey, J. R., Galmarini, C. M., Graham, K. A., Joy, A. A., Delmer, A., Dabbagh, L., . . . Dumontet, C. (2005). Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations. *Blood*, 105(2), 767-774. doi:10.1182/blood-2004-03-1046

- Mackey, J. R., Jennings, L. L., Clarke, M. L., Santos, C. L., Dabbagh, L., Vsianska, M., . . . Cass, C. E. (2002). Immunohistochemical variation of human equilibrative nucleoside transporter 1 protein in primary breast cancers. *Clin Cancer Res*, 8(1), 110-116.
- Mackey, J. R., Mani, R. S., Selner, M., Mowles, D., Young, J. D., Belt, J. A., . . . Cass, C. E. (1998). Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res*, 58(19), 4349-4357.
- Mackey, J. R., Yao, S. Y., Smith, K. M., Karpinski, E., Baldwin, S. A., Cass, C. E., & Young, J. D. (1999). Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst*, 91(21), 1876-1881. doi:10.1093/jnci/91.21.1876
- Maiti, A., & Drohat, A. C. (2011). Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*, 286(41), 35334-35338. doi:10.1074/jbc.C111.284620
- Maiti, A., Michelson, A. Z., Armwood, C. J., Lee, J. K., & Drohat, A. C. (2013). Divergent mechanisms for enzymatic excision of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine from DNA. *J Am Chem Soc*, 135(42), 15813-15822. doi:10.1021/ja406444x
- Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., & Mollace, V. (2016). Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol*, 213, 8-14. doi:10.1016/j.ijcard.2015.08.109
- Mangravite, L. M., Badagnani, I., & Giacomini, K. M. (2003). Nucleoside transporters in the disposition and targeting of nucleoside analogs in the kidney. *Eur J Pharmacol*, 479(1-3), 269-281. doi:10.1016/j.ejphar.2003.08.076
- Mangravite, L. M., Lipschutz, J. H., Mostov, K. E., & Giacomini, K. M. (2001). Localization of GFP-tagged concentrative nucleoside transporters in a renal polarized epithelial cell line. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(5), F879-885. doi:10.1152/ajprenal.2001.280.5.F879
- Mangravite, L. M., Xiao, G., & Giacomini, K. M. (2003). Localization of human equilibrative nucleoside transporters, hENT1 and hENT2, in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284(5), F902-910. doi:10.1152/ajprenal.00215.2002
- Mani, R. S., Hammond, J. R., Marjan, J. M., Graham, K. A., Young, J. D., Baldwin, S. A., & Cass, C. E. (1998). Demonstration of equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and hENT2) in nuclear envelopes of cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells by functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem*, 273(46), 30818-30825. doi:10.1074/jbc.273.46.30818
- Mannava, S., Grachtchouk, V., Wheeler, L. J., Im, M., Zhuang, D., Slavina, E. G., . . . Nikiforov, M. A. (2008). Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle*, 7(15), 2392-2400. doi:10.4161/cc.6390
- Marce, S., Molina-Arcas, M., Villamor, N., Casado, F. J., Campo, E., Pastor-Anglada, M., & Colomer, D. (2006). Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) and its correlation with gemcitabine uptake and cytotoxicity in mantle cell lymphoma. *Haematologica*, 91(7), 895-902.
- Marzo, I., Perez-Galan, P., Giraldo, P., Rubio-Felix, D., Anel, A., & Naval, J. (2001). Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J*, 359(Pt 3), 537-546. doi:10.1042/0264-6021:3590537
- Mata, J. F., Garcia-Manteiga, J. M., Lostao, M. P., Fernandez-Veledo, S., Guillen-Gomez, E., Larrayoz, I. M., . . . Pastor-Anglada, M. (2001). Role of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT1) in the cytotoxic action of 5[Prime]-deoxy-5-fluorouridine, an active intermediate metabolite of capecitabine, a novel oral anticancer drug. *Mol Pharmacol*, 59(6), 1542-1548. doi:10.1124/mol.59.6.1542
- Mathews, C. K. (2006). DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J*, 20(9), 1300-1314. doi:10.1096/fj.06-5730rev
- Mathews, C. K. (2015). Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(9), 528-539. doi:10.1038/nrc3981

- McGinn, C. J., Kunugi, K. A., Tutsch, K. D., Feierabend, C., Alberti, D., Lindstrom, M. J., . . . Kinsella, T. J. (1996). Leucovorin modulation of 5-iododeoxyuridine radiosensitization: a phase I study. *Clin Cancer Res*, 2(8), 1299-1305.
- McGinn, C. J., Miller, E. M., Lindstrom, M. J., Kunugi, K. A., Johnston, P. G., & Kinsella, T. J. (1994). The role of cell cycle redistribution in radiosensitization: implications regarding the mechanism of fluorodeoxyuridine radiosensitization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 30(4), 851-859. doi:10.1016/0360-3016(94)90360-3
- Medina-Pulido, L., Molina-Arcas, M., Justicia, C., Soriano, E., Burgaya, F., Planas, A. M., & Pastor-Anglada, M. (2013). Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells. *Biochem J*, 454(3), 437-445. doi:10.1042/BJ20130231
- Meisel, H., Gunther, S., Martin, D., & Schlimme, E. (1998). Apoptosis induced by modified ribonucleosides in human cell culture systems. *FEBS Lett*, 433(3), 265-268. doi:10.1016/s0014-5793(98)00927-2
- Mellen, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2012). MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, 151(7), 1417-1430. doi:10.1016/j.cell.2012.11.022
- Menendez-Arias, L. (2008). Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Res*, 134(1-2), 124-146. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.015
- Mercader, J., Gomez-Angelats, M., del Santo, B., Casado, F. J., Felipe, A., & Pastor-Anglada, M. (1996). Nucleoside uptake in rat liver parenchymal cells. *Biochem J*, 317 (Pt 3), 835-842. doi:10.1042/bj3170835
- Merriman, R. L., Hertel, L. W., Schultz, R. M., Houghton, P. J., Houghton, J. A., Rutherford, P. G., . . . Grindey, G. B. (1996). Comparison of the antitumor activity of gemcitabine and ara-C in a panel of human breast, colon, lung and pancreatic xenograft models. *Invest New Drugs*, 14(3), 243-247. doi:10.1007/BF00194526
- Mey, V., Giovannetti, E., De Braud, F., Nannizzi, S., Curigliano, G., Verweij, F., . . . Danesi, R. (2006). In vitro synergistic cytotoxicity of gemcitabine and pemetrexed and pharmacogenetic evaluation of response to gemcitabine in bladder cancer patients. *Br J Cancer*, 95(3), 289-297. doi:10.1038/sj.bjc.6603242
- Meyer-Wentrup, F., Karbach, U., Gorboulev, V., Arndt, P., & Koepsell, H. (1998). Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 248(3), 673-678. doi:10.1006/bbrc.1998.9034
- Michaelides, I. N., Tago, N., Viverge, B., & Carell, T. (2017). Synthesis of RNA Containing 5-Hydroxymethyl-, 5-Formyl-, and 5-Carboxycytidine. *Chemistry*, 23(63), 15894-15898. doi:10.1002/chem.201704216
- Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science*, 276(5309), 60-66. doi:10.1126/science.276.5309.60
- Minematsu, T., & Giacomini, K. M. (2011). Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins. *Mol Cancer Ther*, 10(3), 531-539. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0731
- Minor, E. A., Court, B. L., Young, J. I., & Wang, G. (2013). Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem*, 288(19), 13669-13674. doi:10.1074/jbc.C113.464800
- Minuesa, G., Albert, C., Pastor-Anglada, M., Martinez-Picado, J., & Koepsell, H. (2017). Response to "Tenofvir Disoproxil Fumarate Is Not an Inhibitor of Human Organic Cation Transporter 1". *J Pharmacol Exp Ther*, 360(2), 343-345. doi:10.1124/jpet.116.239004
- Minuesa, G., Arimany-Nardi, C., Erkizia, I., Cedeno, S., Molto, J., Clotet, B., . . . Martinez-Picado, J. (2016). P-glycoprotein (ABCB1) activity decreases raltegravir disposition in primary CD4+P-gphigh cells and correlates with HIV-1 viral load. *J Antimicrob Chemother*, 71(10), 2782-2792. doi:10.1093/jac/dkw215

- Minuesa, G., Purcet, S., Erkizia, I., Molina-Arcas, M., Bofill, M., Izquierdo-Useros, N., . . . Martinez-Picado, J. (2008). Expression and functionality of anti-human immunodeficiency virus and anticancer drug uptake transporters in immune cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 324(2), 558-567. doi:10.1124/jpet.107.131482
- Minuesa, G., Volk, C., Molina-Arcas, M., Gorboulev, V., Erkizia, I., Arndt, P., . . . Martinez-Picado, J. (2009). Transport of lamivudine [(-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3. *J Pharmacol Exp Ther*, 329(1), 252-261. doi:10.1124/jpet.108.146225
- Miranda, T. B., & Jones, P. A. (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol*, 213(2), 384-390. doi:10.1002/jcp.21224
- Miras-Portugal, M. T., Gualix, J., & Pintor, J. (1998). The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. *FEBS Lett*, 430(1-2), 78-82. doi:10.1016/s0014-5793(98)00560-2
- Mitchell, J. B., Lupica, C. R., & Dunwiddie, T. V. (1993). Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 13(8), 3439-3447.
- Moaddel, R., Patel, S., Jozwiak, K., Yamaguchi, R., Ho, P. C., & Wainer, I. W. (2005). Enantioselective binding to the human organic cation transporter-1 (hOCT1) determined using an immobilized hOCT1 liquid chromatographic stationary phase. *Chirality*, 17(8), 501-506. doi:10.1002/chir.20195
- Moaddel, R., Ravichandran, S., Bighi, F., Yamaguchi, R., & Wainer, I. W. (2007). Pharmacophore modelling of stereoselective binding to the human organic cation transporter (hOCT1). *Br J Pharmacol*, 151(8), 1305-1314. doi:10.1038/sj.bjp.0707341
- Modrzejewska, M., Gawronski, M., Skonieczna, M., Zarakowska, E., Starczak, M., Foksinski, M., . . . Olinski, R. (2016). Vitamin C enhances substantially formation of 5-hydroxymethyluracil in cellular DNA. *Free Radic Biol Med*, 101, 378-383. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.535
- Mohelnikova-Duchonova, B., Brynychova, V., Hlavac, V., Kocik, M., Oliverius, M., Hlavsa, J., . . . Soucek, P. (2013). The association between the expression of solute carrier transporters and the prognosis of pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 72(3), 669-682. doi:10.1007/s00280-013-2246-2
- Molho-Pessach, V., Lerer, I., Abeliovich, D., Agha, Z., Abu Libdeh, A., Broshtilova, V., . . . Zlotogorski, A. (2008). The H syndrome is caused by mutations in the nucleoside transporter hENT3. *Am J Hum Genet*, 83(4), 529-534. doi:10.1016/j.ajhg.2008.09.013
- Molho-Pessach, V., Suarez, J., Perrin, C., Chiaverini, C., Doviner, V., Tristan-Clavijo, E., . . . Zlotogorski, A. (2010). The H syndrome: two novel mutations affecting the same amino acid residue of hENT3. *J Dermatol Sci*, 57(1), 59-61. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.09.011
- Molina-Arcas, M., Bellosillo, B., Casado, F. J., Montserrat, E., Gil, J., Colomer, D., & Pastor-Anglada, M. (2003). Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 101(6), 2328-2334. doi:10.1182/blood-2002-07-2236
- Molina-Arcas, M., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2009). Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol*, 7(4), 426-434. doi:10.2174/157016109789043892
- Molina-Arcas, M., Hancock, D. C., Sheridan, C., Kumar, M. S., & Downward, J. (2013). Coordinate direct input of both KRAS and IGF1 receptor to activation of PI3 kinase in KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Discov*, 3(5), 548-563. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0446
- Molina-Arcas, M., Marce, S., Villamor, N., Huber-Ruano, I., Casado, F. J., Bellosillo, B., . . . Pastor-Anglada, M. (2005). Equilibrative nucleoside transporter-2 (hENT2) protein expression correlates with ex vivo sensitivity to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia*, 19(1), 64-68. doi:10.1038/sj.leu.2403582
- Molina-Arcas, M., Moreno-Bueno, G., Cano-Soldado, P., Hernandez-Vargas, H., Casado, F. J., Palacios, J., & Pastor-Anglada, M. (2006). Human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1) is required for the transcriptomic response of the nucleoside-derived drug 5'-

- DFUR in breast cancer MCF7 cells. *Biochem Pharmacol*, 72(12), 1646-1656. doi:10.1016/j.bcp.2006.07.036
- Molina-Arcas, M., Trigueros-Motos, L., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2008). Physiological and pharmacological roles of nucleoside transporter proteins. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 27(6), 769-778. doi:10.1080/15257770802145819
- Momparler, R. L., Eliopoulos, N., Bovenzi, V., Letourneau, S., Greenbaum, M., & Cournoyer, D. (1996). Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther*, 3(5), 331-338.
- Montero, T. D., Racordon, D., Bravo, L., Owen, G. I., Bronfman, M. L., & Leisewitz, A. V. (2012). PPARalpha and PPARgamma regulate the nucleoside transporter hENT1. *Biochem Biophys Res Commun*, 419(2), 405-411. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.035
- Montraveta, A., Lee-Verges, E., Roldan, J., Jimenez, L., Cabezas, S., Clot, G., . . . Colomer, D. (2016). CD69 expression potentially predicts response to bendamustine and its modulation by ibrutinib or idelalisib enhances cytotoxic effect in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 7(5), 5507-5520. doi:10.18632/oncotarget.6685
- Mooijman, D., Dey, S. S., Boisset, J. C., Crosetto, N., & van Oudenaarden, A. (2016). Single-cell 5hmC sequencing reveals chromosome-wide cell-to-cell variability and enables lineage reconstruction. *Nat Biotechnol*, 34(8), 852-856. doi:10.1038/nbt.3598
- Morabito, A., Filippelli, G., Palmeri, S., Cascinu, S., Ferrau, F., Zagonel, V., . . . Gasparini, G. (2003). The combination of gemcitabine and vinorelbine is an active regimen as second-line therapy in patients with metastatic breast cancer pretreated with taxanes and/or anthracyclines: a phase I-II study. *Breast Cancer Res Treat*, 78(1), 29-36. doi:10.1023/a:1022197109592
- Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., . . . Levine, R. L. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*, 20(1), 11-24. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.001
- Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W., & Petersen-Mahrt, S. K. (2004). Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem*, 279(50), 52353-52360. doi:10.1074/jbc.M407695200
- Morgan, N. V., Morris, M. R., Cangul, H., Gleeson, D., Straatman-Iwanowska, A., Davies, N., . . . Maher, E. R. (2010). Mutations in SLC29A3, encoding an equilibrative nucleoside transporter ENT3, cause a familial histiocytosis syndrome (Faisalabad histiocytosis) and familial Rosai-Dorfman disease. *PLoS Genet*, 6(2), e1000833. doi:10.1371/journal.pgen.1000833
- Mori, K., Hasegawa, M., Nishida, M., Toma, H., Fukuda, M., Kubota, T., . . . Manabe, T. (2000). Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tumor tissues. *Int J Oncol*, 17(1), 33-38. doi:10.3892/ijo.17.1.33
- Mori, N., Yokooji, T., Kamio, Y., & Murakami, T. (2008). Characterization of intestinal absorption of mizoribine mediated by concentrative nucleoside transporters in rats. *Eur J Pharmacol*, 586(1-3), 52-58. doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.043
- Mori, R., Ishikawa, T., Ichikawa, Y., Taniguchi, K., Matsuyama, R., Ueda, M., . . . Shimada, H. (2007). Human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with the chemosensitivity of gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma and biliary tract carcinoma cells. *Oncol Rep*, 17(5), 1201-1205.
- Morote-Garcia, J. C., Rosenberger, P., Nivillac, N. M., Coe, I. R., & Eltzschig, H. K. (2009). Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia. *Gastroenterology*, 136(2), 607-618. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.037
- Mosconi, A. M., Crino, L., & Tonato, M. (1997). Combination therapy with gemcitabine in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 33 Suppl 1, S14-17. doi:10.1016/s0959-8049(96)00326-7

- Moseley, R. H., Jarose, S., & Permod, P. (1991). Adenosine transport in rat liver plasma membrane vesicles. *Am J Physiol*, 261(5 Pt 1), G716-722. doi:10.1152/ajpgi.1991.261.5.G716
- Mulholland, C. B., Nishiyama, A., Ryan, J., Nakamura, R., Yigit, M., Gluck, I. M., . . . Leonhardt, H. (2020). Recent evolution of a TET-controlled and DPPA3/STELLA-driven pathway of passive DNA demethylation in mammals. *Nat Commun*, 11(1), 5972. doi:10.1038/s41467-020-19603-1
- Mulholland, C. B., Traube, F. R., Ugur, E., Parsa, E., Eckl, E. M., Schonung, M., . . . Bultmann, S. (2020). Distinct and stage-specific contributions of TET1 and TET2 to stepwise cytosine oxidation in the transition from naive to primed pluripotency. *Sci Rep*, 10(1), 12066. doi:10.1038/s41598-020-68600-3
- Mulinta, R., Yao, S. Y. M., Ng, A. M. L., Cass, C. E., & Young, J. D. (2017). Substituted cysteine accessibility method (SCAM) analysis of the transport domain of human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) and other family members reveals features of structural and functional importance. *J Biol Chem*, 292(23), 9505-9522. doi:10.1074/jbc.M116.743997
- Muller, J., Lips, K. S., Metzner, L., Neubert, R. H., Koepsell, H., & Brandsch, M. (2005). Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol*, 70(12), 1851-1860. doi:10.1016/j.bcp.2005.09.011
- Munzel, M., Globisch, D., Bruckl, T., Wagner, M., Welzmler, V., Michalakakis, S., . . . Carell, T. (2010). Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49(31), 5375-5377. doi:10.1002/anie.201002033
- Munzel, M., Globisch, D., & Carell, T. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50(29), 6460-6468. doi:10.1002/anie.201101547
- Munzel, M., Globisch, D., Trindler, C., & Carell, T. (2010). Efficient synthesis of 5-hydroxymethylcytosine containing DNA. *Org Lett*, 12(24), 5671-5673. doi:10.1021/ol102408t
- Munzel, M., Lischke, U., Stathis, D., Pfaffeneder, T., Gnerlich, F. A., Deiml, C. A., . . . Carell, T. (2011). Improved synthesis and mutagenicity of oligonucleotides containing 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Chemistry*, 17(49), 13782-13788. doi:10.1002/chem.201102782
- Musa, H., Dobrzynski, H., Berry, Z., Abidi, F., Cass, C. E., Young, J. D., . . . Boyett, M. R. (2002). Immunocytochemical demonstration of the equilibrative nucleoside transporter rENT1 in rat sinoatrial node. *J Histochem Cytochem*, 50(3), 305-309. doi:10.1177/002215540205000302
- Myers, S. N., Goyal, R. K., Roy, J. D., Fairfull, L. D., Wilson, J. W., & Ferrell, R. E. (2006). Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. *Pharmacogenet Genomics*, 16(5), 315-320. doi:10.1097/01.fpc.0000189804.41962.15

N

- Nabhan, C., Krett, N., Gandhi, V., & Rosen, S. (2001). Gemcitabine in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol*, 13(6), 514-521. doi:10.1097/00001622-200111000-00015
- Naito, T., Tokashiki, S., Mino, Y., Otsuka, A., Ozono, S., Kagawa, Y., & Kawakami, J. (2010). Impact of concentrative nucleoside transporter 1 gene polymorphism on oral bioavailability of mizoribine in stable kidney transplant recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 106(4), 310-316. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00489.x
- Nangalia, J., Massie, C. E., Baxter, E. J., Nice, F. L., Gundem, G., Wedge, D. C., . . . Green, A. R. (2013). Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*, 369(25), 2391-2405. doi:10.1056/NEJMoa1312542

- Natsumeda, Y., Prajda, N., Donohue, J. P., Glover, J. L., & Weber, G. (1984). Enzymic capacities of purine de Novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*, 44(6), 2475-2479.
- Navaratnam, N., & Sarwar, R. (2006). An overview of cytidine deaminases. *Int J Hematol*, 83(3), 195-200. doi:10.1532/IJH97.06032
- Naydenova, Z., Rose, J. B., & Coe, I. R. (2008). Inosine and equilibrative nucleoside transporter 2 contribute to hypoxic preconditioning in the murine cardiomyocyte HL-1 cell line. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(6), H2687-2692. doi:10.1152/ajpheart.00251.2007
- Neff, T., & Blau, C. A. (1996). Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp Hematol*, 24(11), 1340-1346.
- Neri, F., Incarnato, D., Krepelova, A., Rapelli, S., Anselmi, F., Parlato, C., . . . Oliviero, S. (2015). Single-Base Resolution Analysis of 5-Formyl and 5-Carboxyl Cytosine Reveals Promoter DNA Methylation Dynamics. *Cell Rep*, 10(5), 674-683. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.008
- Nestor, C. E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, D., . . . Meehan, R. R. (2012). Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res*, 22(3), 467-477. doi:10.1101/gr.126417.111
- Ng, S. S., Tsao, M. S., Nicklee, T., & Hedley, D. W. (2001). Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res*, 7(10), 3269-3275.
- Ngo, L. Y., Patil, S. D., & Unadkat, J. D. (2001). Ontogenic and longitudinal activity of Na(+)-nucleoside transporters in the human intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280(3), G475-481. doi:10.1152/ajpgi.2001.280.3.G475
- Nielsen, S. E., Munch-Petersen, B., & Mejer, J. (1995). Increased ratio between deoxycytidine kinase and thymidine kinase 2 in CLL lymphocytes compared to normal lymphocytes. *Leuk Res*, 19(7), 443-447. doi:10.1016/0145-2126(94)00153-2
- Nies, A. T., Herrmann, E., Brom, M., & Keppler, D. (2008). Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 376(6), 449-461. doi:10.1007/s00210-007-0219-x
- Nies, A. T., Koepsell, H., Winter, S., Burk, O., Klein, K., Kerb, R., . . . Schaeffeler, E. (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology*, 50(4), 1227-1240. doi:10.1002/hep.23103
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*, 9(7), 484-496.
- Nivillac, N. M., Bacani, J., & Coe, I. R. (2011). The life cycle of human equilibrative nucleoside transporter 1: from ER export to degradation. *Exp Cell Res*, 317(11), 1567-1579. doi:10.1016/j.yexcr.2011.03.008
- Noji, T., Karasawa, A., & Kusaka, H. (2004). Adenosine uptake inhibitors. *Eur J Pharmacol*, 495(1), 1-16. doi:10.1016/j.ejphar.2004.05.003
- Nordlund, P., & Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*, 75, 681-706. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443
- Novak, D. A., Carver, J. D., & Barness, L. A. (1994). Dietary nucleotides affect hepatic growth and composition in the weanling mouse. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 18(1), 62-66. doi:10.1177/014860719401800162
- Nyiri, K., Mertens, H. D. T., Tihanyi, B., Nagy, G. N., Kohegyi, B., Matejka, J., . . . Vertessy, B. G. (2018). Structural model of human dUTPase in complex with a novel proteinaceous inhibitor. *Sci Rep*, 8(1), 4326. doi:10.1038/s41598-018-22145-8
- Nyquist, M. D., Prasad, B., & Mostaghel, E. A. (2017). Harnessing Solute Carrier Transporters for Precision Oncology. *Molecules*, 22(4). doi:10.3390/molecules22040539

O

- O'Donnell, A. H., Edwards, J. R., Rollins, R. A., Vander Kraats, N. D., Su, T., Hibshoosh, H. H., & Bestor, T. H. (2014). Methylation Abnormalities in Mammary Carcinoma: The Methylation Suicide Hypothesis. *J Cancer Ther*, 5(14), 1311-1324. doi:10.4236/jct.2014.514131
- O'Regan, M. (2005). Adenosine and the regulation of cerebral blood flow. *Neurol Res*, 27(2), 175-181. doi:10.1179/016164105X21931
- O'Reilly, E. M. (2009). Pancreatic adenocarcinoma: new strategies for success. *Gastrointest Cancer Res*, 3(2 Suppl), S11-15.
- Ogoshi, S., Iwasa, M., Yonezawa, T., & Tamiya, T. (1985). Effect of nucleotide and nucleoside mixture on rats given total parenteral nutrition after 70% hepatectomy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 9(3), 339-342. doi:10.1177/0148607185009003339
- Ogoshi, S., Mizobuchi, S., Iwasa, M., & Tamiya, T. (1989). Effect of a nucleoside-nucleotide mixture on protein metabolism in rats after seventy percent hepatectomy. *Nutrition*, 5(3), 173-178.
- Oguri, T., Achiwa, H., Muramatsu, H., Ozasa, H., Sato, S., Shimizu, S., . . . Ueda, R. (2007). The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts nonresponse to gemcitabine-containing chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*, 256(1), 112-119. doi:10.1016/j.canlet.2007.06.012
- Ohyanagi, H., Nishimatsu, S., Kanbara, Y., Usami, M., & Saitoh, Y. (1989). Effects of nucleosides and a nucleotide on DNA and RNA syntheses by the salvage and de novo pathway in primary monolayer cultures of hepatocytes and hepatoma cells. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 13(1), 51-58. doi:10.1177/014860718901300151
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257. doi:10.1016/s0092-8674(00)81656-6
- Okazaki, T., Javle, M., Tanaka, M., Abbruzzese, J. L., & Li, D. (2010). Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res*, 16(1), 320-329. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1555
- Ooi, S. K., O'Donnell, A. H., & Bestor, T. H. (2009). Mammalian cytosine methylation at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 16), 2787-2791. doi:10.1242/jcs.015123
- Orr, R. M., Talbot, D. C., Aherne, W. G., Fisher, T. C., Serafinowski, P., & Harrap, K. R. (1995). 2'-Deoxycytidine kinase deficiency is a major determinant of 2-chloro-2'-deoxyadenosine resistance in lymphoid cell lines. *Clin Cancer Res*, 1(4), 391-398.
- Ortega, M. A., Nunez, M. C., Gil, A., & Sanchez-Pozo, A. (1995). Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old rats. *J Nutr*, 125(6), 1413-1418. doi:10.1093/jn/125.6.1413
- Osato, D. H., Huang, C. C., Kawamoto, M., Johns, S. J., Stryke, D., Wang, J., . . . Giacomini, K. M. (2003). Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. *Pharmacogenetics*, 13(5), 297-301. doi:10.1097/00008571-200305000-00010
- Osses, N., Pearson, J. D., Yudilevich, D. L., & Jarvis, S. M. (1996). Hypoxanthine enters human vascular endothelial cells (ECV 304) via the nitrobenzylthioinosine-insensitive equilibrative nucleoside transporter. *Biochem J*, 317 (Pt 3), 843-848. doi:10.1042/bj3170843
- Ostruszka, L. J., & Shewach, D. S. (2003). The role of DNA synthesis inhibition in the cytotoxicity of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol*, 52(4), 325-332. doi:10.1007/s00280-003-0661-5
- Ou, A., Ott, M., Fang, D., & Heimberger, A. B. (2021). The Role and Therapeutic Targeting of JAK/STAT Signaling in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*, 13(3). doi:10.3390/cancers13030437

- Owen, R. P., Badagnani, I., & Giacomini, K. M. (2006). Molecular determinants of specificity for synthetic nucleoside analogs in the concentrative nucleoside transporter, CNT2. *J Biol Chem*, 281(36), 26675-26682. doi:10.1074/jbc.M513421200
- Owen, R. P., Gray, J. H., Taylor, T. R., Carlson, E. J., Huang, C. C., Kawamoto, M., . . . Giacomini, K. M. (2005). Genetic analysis and functional characterization of polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter, CNT2. *Pharmacogenet Genomics*, 15(2), 83-90. doi:10.1097/01213011-200502000-00004
- Owen, R. P., Lagpacan, L. L., Taylor, T. R., De La Cruz, M., Huang, C. C., Kawamoto, M., . . . Giacomini, K. M. (2006). Functional characterization and haplotype analysis of polymorphisms in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT2. *Drug Metab Dispos*, 34(1), 12-15. doi:10.1124/dmd.105.006270
- Ozcan, S., Dover, J., & Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 17(9), 2566-2573. doi:10.1093/emboj/17.9.2566

P

- Pai, C. C., & Kearsey, S. E. (2017). A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability. *Genes (Basel)*, 8(2). doi:10.3390/genes8020057
- Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S., & Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, 153(3), 1251-1256. doi:10.1016/s0006-291x(88)81362-7
- Paproski, R. J., Visser, F., Zhang, J., Tackaberry, T., Damaraju, V., Baldwin, S. A., . . . Cass, C. E. (2008). Mutation of Trp29 of human equilibrative nucleoside transporter 1 alters affinity for coronary vasodilator drugs and nucleoside selectivity. *Biochem J*, 414(2), 291-300. doi:10.1042/BJ20080074
- Parker, W. B. (2009). Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem Rev*, 109(7), 2880-2893. doi:10.1021/cr900028p
- Parker, W. B., Shaddix, S. C., Chang, C. H., White, E. L., Rose, L. M., Brockman, R. W., . . . Bennett, L. L., 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(9), 2386-2394.
- Parker, W. B., Shaddix, S. C., Rose, L. M., Shewach, D. S., Hertel, L. W., Secrist, J. A., 3rd, . . . Bennett, L. L., Jr. (1999). Comparison of the mechanism of cytotoxicity of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)adenine, 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-ribofuranosyl)adenine, and 2-chloro-9-(2-deoxy-2,2-difluoro-beta-D-ribofuranosyl)adenine in CEM cells. *Mol Pharmacol*, 55(3), 515-520.
- Parkinson, F. E., Damaraju, V. L., Graham, K., Yao, S. Y., Baldwin, S. A., Cass, C. E., & Young, J. D. (2011). Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Curr Top Med Chem*, 11(8), 948-972. doi:10.2174/156802611795347582
- Pastor, W. A., Pape, U. J., Huang, Y., Henderson, H. R., Lister, R., Ko, M., . . . Rao, A. (2011). Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, 473(7347), 394-397. doi:10.1038/nature10102
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Errasti-Murugarren, E., & Casado, F. J. (2008). SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica*, 38(7-8), 972-994. doi:10.1080/00498250802069096
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Molina-Arcas, M., Lostao, M. P., Larrayoz, I., Martinez-Picado, J., & Casado, F. J. (2005). Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res*, 107(2), 151-164. doi:10.1016/j.virusres.2004.11.005

- Pastor-Anglada, M., Casado, F. J., Valdes, R., Mata, J., Garcia-Manteiga, J., & Molina, M. (2001). Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol Membr Biol*, 18(1), 81-85. doi:10.1080/096876800110033783
- Pastor-Anglada, M., Errasti-Murugarren, E., Aymerich, I., & Casado, F. J. (2007). Concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia: from absorption to cell signaling. *J Physiol Biochem*, 63(1), 97-110. doi:10.1007/BF03174089
- Pastor-Anglada, M., Felipe, A., & Casado, F. J. (1998). Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends Pharmacol Sci*, 19(10), 424-430. doi:10.1016/s0165-6147(98)01253-x
- Pastor-Anglada, M., Felipe, A., Casado, F. J., del Santo, B., Mata, J. F., & Valdes, R. (1998). Nucleoside transporters and liver cell growth. *Biochem Cell Biol*, 76(5), 771-777. doi:10.1139/bcb-76-5-771
- Pastor-Anglada, M., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., Bellosillo, B., Colomer, D., & Gil, J. (2004). Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 18(3), 385-393. doi:10.1038/sj.leu.2403271
- Pastor-Anglada, M., & Perez-Torras, S. (2015). Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol*, 6, 13. doi:10.3389/fphar.2015.00013
- Pastor-Anglada, M., & Perez-Torras, S. (2018). Who Is Who in Adenosine Transport. *Front Pharmacol*, 9, 627. doi:10.3389/fphar.2018.00627
- Pastor-Anglada, M., & Perez-Torras, S. (2018). Emerging Roles of Nucleoside Transporters. *Front Pharmacol*, 9, 606. doi:10.3389/fphar.2018.00606
- Pastor-Anglada, M., Urtasun, N., & Perez-Torras, S. (2018). Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation. *Compr Physiol*, 8(3), 1003-1017. doi:10.1002/cphy.c170039
- Patil, S. D., Ngo, L. Y., & Unadkat, J. D. (2000). Structure-inhibitory profiles of nucleosides for the human intestinal N1 and N2 Na⁺-nucleoside transporters. *Cancer Chemother Pharmacol*, 46(5), 394-402. doi:10.1007/s002800000171
- Patil, S. D., & Unadkat, J. D. (1997). Sodium-dependent nucleoside transport in the human intestinal brush-border membrane. *Am J Physiol*, 272(6 Pt 1), G1314-1320. doi:10.1152/ajpgi.1997.272.6.G1314
- Patrick, S. M., Oakley, G. G., Dixon, K., & Turchi, J. J. (2005). DNA damage induced hyperphosphorylation of replication protein A. 2. Characterization of DNA binding activity, protein interactions, and activity in DNA replication and repair. *Biochemistry*, 44(23), 8438-8448. doi:10.1021/bi048057b
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 23(1), 27-47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006
- Pedley, A. M., & Benkovic, S. J. (2017). A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends Biochem Sci*, 42(2), 141-154. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.009
- Pellegrini, S., & Dusanter-Fourt, I. (1997). The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem*, 248(3), 615-633. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00615.x
- Peng, L., Huang, R., Yu, A. C., Fung, K. Y., Rathbone, M. P., & Hertz, L. (2005). Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. *Glia*, 52(1), 25-35. doi:10.1002/glia.20216
- Penn, N. W., Suwalski, R., O'Riley, C., Bojanowski, K., & Yura, R. (1972). The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 126(4), 781-790. doi:10.1042/bj1260781
- Pennycooke, M., Chaudary, N., Shuralyova, I., Zhang, Y., & Coe, I. R. (2001). Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(3), 951-959. doi:10.1006/bbrc.2000.4205

- Perez-Bercoff, D., Wurtzer, S., Compain, S., Benech, H., & Clavel, F. (2007). Human immunodeficiency virus type 1: resistance to nucleoside analogues and replicative capacity in primary human macrophages. *J Virol*, 81(9), 4540-4550. doi:10.1128/JVI.01620-06
- Perez-Torras, S., Garcia-Manteiga, J., Mercade, E., Casado, F. J., Carbo, N., Pastor-Anglada, M., & Mazo, A. (2008). Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer. *Biochem Pharmacol*, 76(3), 322-329. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.011
- Perez-Torras, S., Vidal-Pla, A., Cano-Soldado, P., Huber-Ruano, I., Mazo, A., & Pastor-Anglada, M. (2013). Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner. *Cell Death Dis*, 4, e648. doi:10.1038/cddis.2013.173
- Petersson, J., Pattison, J., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., & Persson, B. L. (1999). Intracellular localization of an active green fluorescent protein-tagged Pho84 phosphate permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 462(1-2), 37-42. doi:10.1016/s0014-5793(99)01471-4
- Pettitt, A. R., Sherrington, P. D., & Cawley, J. C. (2000). Role of poly(ADP-ribosylation) in the killing of chronic lymphocytic leukemia cells by purine analogues. *Cancer Res*, 60(15), 4187-4193.
- Pfaffeneder, T., Hackner, B., Truss, M., Munzel, M., Muller, M., Deiml, C. A., . . . Carell, T. (2011). The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50(31), 7008-7012. doi:10.1002/anie.201103899
- Pfaffeneder, T., Spada, F., Wagner, M., Brandmayr, C., Laube, S. K., Eisen, D., . . . Carell, T. (2014). Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nat Chem Biol*, 10(7), 574-581. doi:10.1038/nchembio.1532
- Phillips, K. E., & Munson, A. E. (1997). 2'3'-Dideoxyinosine inhibits the humoral immune response in female B6C3F1 mice by targeting the B lymphocyte. *Toxicol Appl Pharmacol*, 145(2), 260-267. doi:10.1006/taap.1997.8150
- Pikman, Y., Lee, B. H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B. L., Gozo, M., . . . Levine, R. L. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, 3(7), e270. doi:10.1371/journal.pmed.0030270
- Pimkin, M., & Markham, G. D. (2008). The CBS subdomain of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase regulates purine nucleotide turnover. *Mol Microbiol*, 68(2), 342-359. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06153.x
- Pinilla-Macua, I., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2012). Structural determinants for rCNT2 sorting to the plasma membrane of polarized and non-polarized cells. *Biochem J*, 442(3), 517-525. doi:10.1042/BJ20110605
- Pinilla-Macua, I., Claudio-Montero, A., & Pastor-Anglada, M. (2014). rCNT2 extracellular cysteines, Cys(615) and Cys(649), are important for maturation and sorting to the plasma membrane. *FEBS Lett*, 588(23), 4382-4389. doi:10.1016/j.febslet.2014.10.006
- Pinilla-Macua, I., Fernandez-Calotti, P., Perez-Del-Pulgar, S., & Pastor-Anglada, M. (2014). Ribavirin uptake into human hepatocyte HHL5 cells is enhanced by interferon-alpha via up-regulation of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT2). *Mol Pharm*, 11(9), 3223-3230. doi:10.1021/mp500263p
- Pinto-Duarte, A., Coelho, J. E., Cunha, R. A., Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (2005). Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J Neurochem*, 93(3), 595-604. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03071.x
- Plagemann, P. G., & Wohlhueter, R. M. (1985). Nitrobenzylthioinosine-sensitive and -resistant nucleoside transport in normal and transformed rat cells. *Biochim Biophys Acta*, 816(2), 387-395. doi:10.1016/0005-2736(85)90506-1

- Plagemann, P. G., Wohlhueter, R. M., & Woffendin, C. (1988). Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochim Biophys Acta*, 947(3), 405-443. doi:10.1016/0304-4157(88)90002-0
- Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y. Z., Heinemann, V., Grunewald, R., & Gandhi, V. (1995). Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol*, 22(4 Suppl 11), 3-10.
- Plunkett, W., Liliemark, J. O., Estey, E., & Keating, M. J. (1987). Saturation of ara-CTP accumulation during high-dose ara-C therapy: pharmacologic rationale for intermediate-dose ara-C. *Semin Oncol*, 14(2 Suppl 1), 159-166.
- Plunkett, W., & Saunders, P. P. (1991). Metabolism and action of purine nucleoside analogs. *Pharmacol Ther*, 49(3), 239-268. doi:10.1016/0163-7258(91)90057-s
- Popp, C., Gorboulev, V., Muller, T. D., Gorbunov, D., Shatskaya, N., & Koepsell, H. (2005). Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease. *Mol Pharmacol*, 67(5), 1600-1611. doi:10.1124/mol.104.008839
- Praetorius, H. A., & Leipziger, J. (2010). Intrarenal purinergic signaling in the control of renal tubular transport. *Annu Rev Physiol*, 72, 377-393. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135825
- Prasad, B., Evers, R., Gupta, A., Hop, C. E., Salphati, L., Shukla, S., . . . Unadkat, J. D. (2014). Interindividual variability in hepatic organic anion-transporting polypeptides and P-glycoprotein (ABCB1) protein expression: quantification by liquid chromatography tandem mass spectroscopy and influence of genotype, age, and sex. *Drug Metab Dispos*, 42(1), 78-88. doi:10.1124/dmd.113.053819
- Pressacco, J., Mitrovski, B., Erlichman, C., & Hedley, D. W. (1995). Effects of thymidylate synthase inhibition on thymidine kinase activity and nucleoside transporter expression. *Cancer Res*, 55(7), 1505-1508.
- Price, C. J., George, J. D., Marr, M. C., Myers, C. B., Bieler, G. S., Williams, R. L., & Jahnke, G. D. (2006). Prenatal developmental toxicity evaluation of 2',3'-dideoxyinosine (ddI) and 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (d4T) co-administered to Swiss Albino (CD-1) mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 77(3), 207-215. doi:10.1002/bdrb.20076
- Prus, K. L., Averett, D. R., & Zimmerman, T. P. (1990). Transport and metabolism of 9-beta-D-arabinofuranosylguanine in a human T-lymphoblastoid cell line: nitrobenzylthioinosine-sensitive and -insensitive influx. *Cancer Res*, 50(6), 1817-1821.
- Puebla, C., Farias, M., Gonzalez, M., Vecchiola, A., Aguayo, C., Krause, B., . . . Sobrevia, L. (2008). High D-glucose reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving specific protein 1 in human umbilical vein endothelium. *J Cell Physiol*, 215(3), 645-656. doi:10.1002/jcp.21347
- Pugmire, M. J., & Ealick, S. E. (2002). Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J*, 361(Pt 1), 1-25. doi:10.1042/0264-6021:3610001

Q

- Quan, R., & Barness, L. A. (1990). Do infants need nucleotide supplemented formula for optimal nutrition? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 11(4), 429-434.
- Quashie, N. B., Dorin-Semblat, D., Bray, P. G., Biagini, G. A., Doerig, C., Ranford-Cartwright, L. C., & De Koning, H. P. (2008). A comprehensive model of purine uptake by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: identification of four purine transport activities in intraerythrocytic parasites. *Biochem J*, 411(2), 287-295. doi:10.1042/BJ20071460
- Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., Cortes, J., & Verstovsek, S. (2011). Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nat Rev Drug Discov*, 10(2), 127-140. doi:10.1038/nrd3264

- Quintas-Cardama, A., Santos, F. P., & Garcia-Manero, G. (2010). Therapy with azanucleosides for myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Clin Oncol*, 7(8), 433-444. doi:10.1038/nrclinonc.2010.87
- Quintas-Cardama, A., Vaddi, K., Liu, P., Manshour, T., Li, J., Scherle, P. A., . . . Verstovsek, S. (2010). Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 115(15), 3109-3117. doi:10.1182/blood-2009-04-214957
- Quivoron, C., Couronne, L., Della Valle, V., Lopez, C. K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., . . . Bernard, O. A. (2011). TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*, 20(1), 25-38. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.003

R

- Rahimoff, R., Kosmatchev, O., Kirchner, A., Pfaffeneder, T., Spada, F., Brantl, V., . . . Carell, T. (2017). 5-Formyl- and 5-Carboxydeoxycytidines Do Not Cause Accumulation of Harmful Repair Intermediates in Stem Cells. *J Am Chem Soc*, 139(30), 10359-10364. doi:10.1021/jacs.7b04131
- Ramadan, A., Naydenova, Z., Stevanovic, K., Rose, J. B., & Coe, I. R. (2014). The adenosine transporter, ENT1, in cardiomyocytes is sensitive to inhibition by ethanol in a kinase-dependent manner: implications for ethanol-dependent cardioprotection and nucleoside analog drug cytotoxicity. *Purinergic Signal*, 10(2), 305-312. doi:10.1007/s11302-013-9391-2
- Rampal, R., Al-Shahrour, F., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P., Brunel, J. P., Mermel, C. H., . . . Levine, R. L. (2014). Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*, 123(22), e123-133. doi:10.1182/blood-2014-02-554634
- Rampazzo, C., Miazzi, C., Franzolin, E., Pontarin, G., Ferraro, P., Frangini, M., . . . Bianchi, V. (2010). Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat Res*, 703(1), 2-10. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.06.002
- Ramsawhook, A., Lewis, L., Coyle, B., & Ruzov, A. (2017). Medulloblastoma and ependymoma cells display increased levels of 5-carboxylcytosine and elevated TET1 expression. *Clin Epigenetics*, 9, 18. doi:10.1186/s13148-016-0306-2
- Rauchwerger, D. R., Firby, P. S., Hedley, D. W., & Moore, M. J. (2000). Equilibrative-sensitive nucleoside transporter and its role in gemcitabine sensitivity. *Cancer Res*, 60(21), 6075-6079.
- Razonable, R. R. (2011). Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. *Mayo Clin Proc*, 86(10), 1009-1026. doi:10.4065/mcp.2011.0309
- Reichard, P. (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, 57, 349-374. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.002025
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., De Haas, M., Van Deemter, L., Wijnholds, J., . . . Borst, P. (2003). Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol*, 63(5), 1094-1103. doi:10.1124/mol.63.5.1094
- Resta, R., Yamashita, Y., & Thompson, L. F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*, 161, 95-109. doi:10.1111/j.1600-065x.1998.tb01574.x
- Reyes, G., Nivillac, N. M., Chalsev, M., & Coe, I. R. (2011). Analysis of recombinant tagged equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) expressed in *E. coli*. *Biochem Cell Biol*, 89(2), 246-255. doi:10.1139/o10-155
- Reyes, G., Nivillac, N. M., Karim, M. Z., Desouza, L., Siu, K. W., & Coe, I. R. (2011). The Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT1) can be phosphorylated at multiple sites by PKC and PKA. *Mol Membr Biol*, 28(6), 412-426. doi:10.3109/09687688.2011.604861

- Reyes, N., Ginter, C., & Boudker, O. (2009). Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature*, 462(7275), 880-885. doi:10.1038/nature08616
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., McAllister, F., . . . Stanger, B. Z. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148(1-2), 349-361. doi:10.1016/j.cell.2011.11.025
- Ribeiro, J. A. (2005). What can adenosine neuromodulation do for neuroprotection? *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4(4), 325-329. doi:10.2174/1568007054546090
- Riegelhaupt, P. M., Frame, I. J., & Akabas, M. H. (2010). Transmembrane segment 11 appears to line the purine permeation pathway of the *Plasmodium falciparum* equilibrative nucleoside transporter 1 (PfENT1). *J Biol Chem*, 285(22), 17001-17010. doi:10.1074/jbc.M110.115758
- Ritzel, M. W., Ng, A. M., Yao, S. Y., Graham, K., Loewen, S. K., Smith, K. M., . . . Young, J. D. (2001). Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem*, 276(4), 2914-2927. doi:10.1074/jbc.M007746200
- Ritzel, M. W., Yao, S. Y., Huang, M. Y., Elliott, J. F., Cass, C. E., & Young, J. D. (1997). Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1), C707-714. doi:10.1152/ajpcell.1997.272.2.C707
- Ritzel, M. W., Yao, S. Y., Ng, A. M., Mackey, J. R., Cass, C. E., & Young, J. D. (1998). Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol*, 15(4), 203-211. doi:10.3109/09687689709044322
- Rius, M., Keller, D., Brom, M., Hummel-Eisenbeiss, J., Lyko, F., & Keppler, D. (2010). Vectorial transport of nucleoside analogs from the apical to the basolateral membrane in double-transfected cells expressing the human concentrative nucleoside transporter hCNT3 and the export pump ABCC4. *Drug Metab Dispos*, 38(7), 1054-1063. doi:10.1124/dmd.110.032664
- Rius, M., & Lyko, F. (2012). Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs. *Oncogene*, 31(39), 4257-4265. doi:10.1038/onc.2011.601
- Rius, M., Stresemann, C., Keller, D., Brom, M., Schirmacher, E., Keppler, D., & Lyko, F. (2009). Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. *Mol Cancer Ther*, 8(1), 225-231. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0743
- Robak, T. (2011). New nucleoside analogs for patients with hematological malignancies. *Expert Opin Investig Drugs*, 20(3), 343-359. doi:10.1517/13543784.2011.554822
- Robak, T., Korycka, A., Lech-Maranda, E., & Robak, P. (2009). Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases. *Molecules*, 14(3), 1183-1226. doi:10.3390/molecules14031183
- Robak, T., Korycka, A., & Robak, E. (2006). Older and new formulations of cladribine. Pharmacology and clinical efficacy in hematological malignancies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 1(1), 23-38. doi:10.2174/157489206775246467
- Robillard, K. R., Bone, D. B., Park, J. S., & Hammond, J. R. (2008). Characterization of mENT1Delta11, a novel alternative splice variant of the mouse equilibrative nucleoside transporter 1. *Mol Pharmacol*, 74(1), 264-273. doi:10.1124/mol.107.041871
- Robitaille, A. M., Christen, S., Shimobayashi, M., Cornu, M., Fava, L. L., Moes, S., . . . Hall, M. N. (2013). Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science*, 339(6125), 1320-1323. doi:10.1126/science.1228771
- Rodriguez-Mulero, S., Errasti-Murugarren, E., Ballarin, J., Felipe, A., Doucet, A., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2005). Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: effect of diabetes. *Kidney Int*, 68(2), 665-672. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00444.x

- Rogato, A., D'Apuzzo, E., & Chiurazzi, M. (2010). The multiple plant response to high ammonium conditions: the Lotus japonicus AMT1; 3 protein acts as a putative transceptor. *Plant Signal Behav*, 5(12), 1594-1596. doi:10.4161/psb.5.12.13856
- Rose, J. B., & Coe, I. R. (2008). Physiology of nucleoside transporters: back to the future. *Physiology (Bethesda)*, 23, 41-48. doi:10.1152/physiol.00036.2007
- Rose, J. B., Naydenova, Z., Bang, A., Eguchi, M., Sweeney, G., Choi, D. S., . . . Coe, I. R. (2010). Equilibrative nucleoside transporter 1 plays an essential role in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298(3), H771-777. doi:10.1152/ajpheart.00711.2009
- Ross, D. D., & Cuddy, D. P. (1994). Molecular effects of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) on DNA replication in intact HL-60 cells. *Biochem Pharmacol*, 48(8), 1619-1630. doi:10.1016/0006-2952(94)90207-0
- Ross, S. R., McTavish, D., & Faulds, D. (1993). Fludarabine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in malignancy. *Drugs*, 45(5), 737-759. doi:10.2165/00003495-199345050-00009
- Roth, M., Araya, J. J., Timmermann, B. N., & Hagenbuch, B. (2011). Isolation of modulators of the liver-specific organic anion-transporting polypeptides (OATPs) 1B1 and 1B3 from *Rollinia emarginata* Schlecht (Annonaceae). *J Pharmacol Exp Ther*, 339(2), 624-632. doi:10.1124/jpet.111.184564
- Rudolph, F. B., Kulkarni, A. D., Schandle, V. B., & Van Buren, C. T. (1984). Involvement of dietary nucleotides in T lymphocyte function. *Adv Exp Med Biol*, 165 Pt B, 175-178. doi:10.1007/978-1-4757-0390-0_35
- Ruiz van Haperen, V. W., Veerman, G., Eriksson, S., Boven, E., Stegmann, A. P., Hermsen, M., . . . Peters, G. J. (1994). Development and molecular characterization of a 2',2'-difluorodeoxycytidine-resistant variant of the human ovarian carcinoma cell line A2780. *Cancer Res*, 54(15), 4138-4143.
- Ruiz van Haperen, V. W., Veerman, G., Eriksson, S., Stegmann, A. P., & Peters, G. J. (1995). Induction of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine in the human ovarian cancer cell line A2780. *Semin Oncol*, 22(4 Suppl 11), 35-41.
- Ruiz van Haperen, V. W., Veerman, G., Vermorken, J. B., & Peters, G. J. (1993). 2',2'-Difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem Pharmacol*, 46(4), 762-766. doi:10.1016/0006-2952(93)90566-f
- Ruiz-Montasell, B., Javier Casado, F., Felipe, A., & Pastor-Anglada, M. (1992). Uridine transport in basolateral plasma membrane vesicles from rat liver. *J Membr Biol*, 128(3), 227-233. doi:10.1007/BF00231815
- Ruiz-Montasell, B., Martinez-Mas, J. V., Enrich, C., Casado, F. J., Felipe, A., & Pastor-Anglada, M. (1993). Early induction of Na(+)-dependent uridine uptake in the regenerating rat liver. *FEBS Lett*, 316(1), 85-88. doi:10.1016/0014-5793(93)81741-h
- Rumi, E., Pietra, D., Ferretti, V., Klampfl, T., Harutyunyan, A. S., Milosevic, J. D., . . . Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative, I. (2014). JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*, 123(10), 1544-1551. doi:10.1182/blood-2013-11-539098

S

- Sabini, E., Hazra, S., Ort, S., Konrad, M., & Lavie, A. (2008). Structural basis for substrate promiscuity of dCK. *J Mol Biol*, 378(3), 607-621. doi:10.1016/j.jmb.2008.02.061
- Sabini, E., Ort, S., Monnerjahn, C., Konrad, M., & Lavie, A. (2003). Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy. *Nat Struct Biol*, 10(7), 513-519. doi:10.1038/nsb942
- Sahasranaman, S., Howard, D., & Roy, S. (2008). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol*, 64(8), 753-767. doi:10.1007/s00228-008-0478-6

- Saiko, P., Horvath, Z., Jaeger, W., Schott, H., Fritzer-Szekeres, M., & Szekeres, T. (2005). Heterodinucleoside phosphates of 5-fluorodeoxyuridine and arabinofuranosylcytosine--new drugs in cancer chemotherapy? *In Vivo*, 19(1), 205-214.
- Saito, H., Nishimura, M., Shinano, H., Makita, H., Tsujino, I., Shibuya, E., . . . Kawakami, Y. (1999). Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans. *Am J Respir Crit Care Med*, 159(3), 1014-1018. doi:10.1164/ajrccm.159.3.9803100
- Sakamoto, A., Matsumaru, T., Yamamura, N., Uchida, Y., Tachikawa, M., Ohtsuki, S., & Terasaki, T. (2013). Quantitative expression of human drug transporter proteins in lung tissues: analysis of regional, gender, and interindividual differences by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Sci*, 102(9), 3395-3406. doi:10.1002/jps.23606
- Sakowicz, M., Szutowicz, A., & Pawelczyk, T. (2004). Insulin and glucose induced changes in expression level of nucleoside transporters and adenosine transport in rat T lymphocytes. *Biochem Pharmacol*, 68(7), 1309-1320. doi:10.1016/j.bcp.2004.06.020
- Salati, L. M., Gross, C. J., Henderson, L. M., & Savaiano, D. A. (1984). Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5'-monophosphate, adenosine and hypoxanthine by the isolated vascularly perfused rat small intestine. *J Nutr*, 114(4), 753-760. doi:10.1093/jn/114.4.753
- Sanchez, C., Lachaize, C., Janody, F., Bellon, B., Roder, L., Euzenat, J., . . . Jacq, B. (1999). Grasping at molecular interactions and genetic networks in *Drosophila melanogaster* using FlyNets, an Internet database. *Nucleic Acids Res*, 27(1), 89-94. doi:10.1093/nar/27.1.89
- Sanderson, I. R., & He, Y. (1994). Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. *J Nutr*, 124(1 Suppl), 131S-137S. doi:10.1093/jn/124.suppl_1.131S
- Santi, D. V., McHenry, C. S., & Sommer, H. (1974). Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*, 13(3), 471-481. doi:10.1021/bi00700a012
- Santini, D., Schiavon, G., Vincenzi, B., Cass, C. E., Vasile, E., Manazza, A. D., . . . Tonini, G. (2011). Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) levels predict response to gemcitabine in patients with biliary tract cancer (BTC). *Curr Cancer Drug Targets*, 11(1), 123-129. doi:10.2174/156800911793743600
- Sasaki, M., Knobbe, C. B., Munger, J. C., Lind, E. F., Brenner, D., Brustle, A., . . . Mak, T. W. (2012). IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature*, 488(7413), 656-659. doi:10.1038/nature11323
- Sasi, W., Sharma, A. K., & Mokbel, K. (2014). The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms. *Mol Biol Int*, 2014, 630797. doi:10.1155/2014/630797
- Sasvari-Szekely, M., Spasokoukotskaja, T., Szoke, M., Csapo, Z., Turi, A., Szanto, I., . . . Staub, M. (1998). Activation of deoxycytidine kinase during inhibition of DNA synthesis by 2-chloro-2'-deoxyadenosine (Cladribine) in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol*, 56(9), 1175-1179. doi:10.1016/s0006-2952(98)00108-7
- Sata, R., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Murakami, H., Koyabu, N., Nakamura, T., . . . Sawada, Y. (2005). Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(2), 888-895. doi:10.1124/jpet.105.086827
- Schaner, M. E., Wang, J., Zevin, S., Gerstin, K. M., & Giacomini, K. M. (1997). Transient expression of a purine-selective nucleoside transporter (SPNTint) in a human cell line (HeLa). *Pharm Res*, 14(10), 1316-1321. doi:10.1023/a:1012148016794
- Schaner, M. E., Wang, J., Zhang, L., Su, S. F., Gerstin, K. M., & Giacomini, K. M. (1999). Functional characterization of a human purine-selective, Na⁺-dependent nucleoside transporter (hSPNT1) in a mammalian expression system. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(3), 1487-1491.
- Scharrer, E., & Grenacher, B. (2001). Active intestinal absorption of nucleosides by Na⁺-dependent transport across the brush border membrane in cows. *J Dairy Sci*, 84(3), 614-619. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74515-8

- Schelter, F., Kirchner, A., Traube, F. R., Muller, M., Steglich, W., & Carell, T. (2021). 5-Hydroxymethyl-, 5-Formyl- and 5-Carboxydeoxycytidines as Oxidative Lesions and Epigenetic Marks. *Chemistry*. doi:10.1002/chem.202100551
- Schiesser, S., Hackner, B., Pfaffeneder, T., Muller, M., Hagemeyer, C., Truss, M., & Carell, T. (2012). Mechanism and stem-cell activity of 5-carboxycytosine decarboxylation determined by isotope tracing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(26), 6516-6520. doi:10.1002/anie.201202583
- Schiesser, S., Pfaffeneder, T., Sadeghian, K., Hackner, B., Steigenberger, B., Schroder, A. S., . . . Carell, T. (2013). Deamination, oxidation, and C-C bond cleavage reactivity of 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine, and 5-carboxycytosine. *J Am Chem Soc*, 135(39), 14593-14599. doi:10.1021/ja403229y
- Schiffers, S., Ebert, C., Rahimoff, R., Kosmatchev, O., Steinbacher, J., Bohne, A. V., . . . Carell, T. (2017). Quantitative LC-MS Provides No Evidence for m(6) dA or m(4) dC in the Genome of Mouse Embryonic Stem Cells and Tissues. *Angew Chem Int Ed Engl*, 56(37), 11268-11271. doi:10.1002/anie.201700424
- Schlessinger, A., Matsson, P., Shima, J. E., Pieper, U., Yee, S. W., Kelly, L., . . . Sali, A. (2010). Comparison of human solute carriers. *Protein Sci*, 19(3), 412-428. doi:10.1002/pro.320
- Schlimme, E., Martin, D., & Meisel, H. (2000). Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum. *Br J Nutr*, 84 Suppl 1, S59-68. doi:10.1017/s0007114500002269
- Schlosser, S. F., Burgstahler, A. D., & Nathanson, M. H. (1996). Isolated rat hepatocytes can signal to other hepatocytes and bile duct cells by release of nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), 9948-9953. doi:10.1073/pnas.93.18.9948
- Schmidt, V., Nagar, R., & Martinez, L. A. (2017). Control of Nucleotide Metabolism Enables Mutant p53's Oncogenic Gain-of-Function Activity. *Int J Mol Sci*, 18(12). doi:10.3390/ijms18122759
- Schmitt, A., Mossner, R., Gossmann, A., Fischer, I. G., Gorboulev, V., Murphy, D. L., . . . Lesch, K. P. (2003). Organic cation transporter capable of transporting serotonin is up-regulated in serotonin transporter-deficient mice. *J Neurosci Res*, 71(5), 701-709. doi:10.1002/jnr.10521
- Schon, A., Kaminska, E., Schelter, F., Ponkkonen, E., Korytiakova, E., Schiffers, S., & Carell, T. (2020). Analysis of an Active Deformylation Mechanism of 5-Formyl-deoxycytidine (fdC) in Stem Cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 59(14), 5591-5594. doi:10.1002/anie.202000414
- Schroder, A. S., Parsa, E., Iwan, K., Traube, F. R., Wallner, M., Serdjukow, S., & Carell, T. (2016). 2'-(R)-Fluorinated mC, hmC, fC and caC triphosphates are substrates for DNA polymerases and TET-enzymes. *Chem Commun (Camb)*, 52(100), 14361-14364. doi:10.1039/c6cc07517g
- Schroder, A. S., Steinbacher, J., Steigenberger, B., Gnerlich, F. A., Schiesser, S., Pfaffeneder, T., & Carell, T. (2014). Synthesis of a DNA promoter segment containing all four epigenetic nucleosides: 5-methyl-, 5-hydroxymethyl-, 5-formyl-, and 5-carboxy-2'-deoxycytidine. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53(1), 315-318. doi:10.1002/anie.201308469
- Schubeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517(7534), 321-326. doi:10.1038/nature14192
- Schutsky, E. K., Nabel, C. S., Davis, A. K. F., DeNizio, J. E., & Kohli, R. M. (2017). APOBEC3A efficiently deaminates methylated, but not TET-oxidized, cytosine bases in DNA. *Nucleic Acids Res*, 45(13), 7655-7665. doi:10.1093/nar/gkx345
- Schwikowski, B., Uetz, P., & Fields, S. (2000). A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat Biotechnol*, 18(12), 1257-1261. doi:10.1038/82360
- Schwoppe, C., Winkler, H. H., & Neuhaus, H. E. (2003). Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 270(7), 1450-1457. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03507.x

- Sciacovelli, M., Goncalves, E., Johnson, T. I., Zecchini, V. R., da Costa, A. S., Gaude, E., . . . Frezza, C. (2016). Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature*, 537(7621), 544-547. doi:10.1038/nature19353
- Scott, L. M., Tong, W., Levine, R. L., Scott, M. A., Beer, P. A., Stratton, M. R., . . . Green, A. R. (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, 356(5), 459-468. doi:10.1056/NEJMoa065202
- Seino, S., & Miki, T. (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol*, 81(2), 133-176. doi:10.1016/s0079-6107(02)00053-6
- Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., . . . Reik, W. (2012). The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell*, 48(6), 849-862. doi:10.1016/j.molcel.2012.11.001
- Sen, R. P., Sobrevia, L., Delicado, E. G., Yudilevich, D., & Miras-Portugal, M. T. (1996). Bovine adrenal endothelial cells express nucleoside transporters nonregulated by protein kinases A and C. *Am J Physiol*, 271(2 Pt 1), C504-510. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.2.C504
- SenGupta, D. J., Lum, P. Y., Lai, Y., Shubochkina, E., Bakken, A. H., Schneider, G., & Unadkat, J. D. (2002). A single glycine mutation in the equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1, alters nucleoside transport activity and sensitivity to nitrobenzylthioinosine. *Biochemistry*, 41(5), 1512-1519. doi:10.1021/bi015833w
- SenGupta, D. J., & Unadkat, J. D. (2004). Glycine 154 of the equilibrative nucleoside transporter, hENT1, is important for nucleoside transport and for conferring sensitivity to the inhibitors nitrobenzylthioinosine, dipyridamole, and dilazep. *Biochem Pharmacol*, 67(3), 453-458. doi:10.1016/j.bcp.2003.09.018
- Serdjebi, C., Milano, G., & Ciccolini, J. (2015). Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 11(5), 665-672. doi:10.1517/17425255.2015.985648
- Seve, P., Mackey, J. R., Isaac, S., Tredan, O., Souquet, P. J., Perol, M., . . . Dumontet, C. (2005). cN-II expression predicts survival in patients receiving gemcitabine for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 49(3), 363-370. doi:10.1016/j.lungcan.2005.04.008
- Sgarrella, F., Poddie, F. P., Meloni, M. A., Sciola, L., Pippia, P., & Tozzi, M. G. (1997). Channelling of deoxyribose moiety of exogenous DNA into carbohydrate metabolism: role of deoxyriboaldolase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 117(2), 253-257. doi:10.1016/s0305-0491(96)00325-2
- Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T. A., . . . Koseki, H. (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*, 450(7171), 908-912. doi:10.1038/nature06397
- Sharma, N. K., Mahadevan, N., & Balakumar, P. (2013). Adenosine transport blockade restores attenuated cardioprotective effects of adenosine preconditioning in the isolated diabetic rat heart: potential crosstalk with opioid receptors. *Cardiovasc Toxicol*, 13(1), 22-32. doi:10.1007/s12012-012-9182-y
- Shen, F., Look, K. Y., Yeh, Y. A., & Weber, G. (1998). Increased uridine kinase (ATP: uridine 5'-phosphotransferase; EC 2.7.1.48) activity in human and rat tumors. *Cancer Biochem Biophys*, 16(1-2), 1-15.
- Shen, L., Wu, H., Diep, D., Yamaguchi, S., D'Alessio, A. C., Fung, H. L., . . . Zhang, Y. (2013). Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell*, 153(3), 692-706. doi:10.1016/j.cell.2013.04.002
- Sherley, J. L., & Kelly, T. J. (1988). Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem*, 263(17), 8350-8358.
- Shewach, D. S., Ellero, J., Mancini, W. R., & Ensminger, W. D. (1992). Decrease in TTP pools mediated by 5-bromo-2'-deoxyuridine exposure in a human glioblastoma cell line. *Biochem Pharmacol*, 43(7), 1579-1585. doi:10.1016/0006-2952(92)90217-7

- Shewach, D. S., & Mitchell, B. S. (1986). Characterization of arabinosylguanine resistance in a lymphoblastoid cell line. *Adv Exp Med Biol*, 195 Pt B, 605-609. doi:10.1007/978-1-4684-1248-2_94
- Shi, M. M., Wu, J. S., Lee, C. M., & Young, J. D. (1984). Nucleoside transport. Photoaffinity labelling of high-affinity nitrobenzylthioinosine binding sites in rat and guinea pig lung. *Biochem Biophys Res Commun*, 118(2), 594-600. doi:10.1016/0006-291x(84)91344-5
- Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P., & Levine, R. L. (2012). The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*, 12(9), 599-612. doi:10.1038/nrc3343
- Shin, H. C., Landowski, C. P., Sun, D., Vig, B. S., Kim, I., Mittal, S., . . . Amidon, G. L. (2003). Functional expression and characterization of a sodium-dependent nucleoside transporter hCNT2 cloned from human duodenum. *Biochem Biophys Res Commun*, 307(3), 696-703. doi:10.1016/s0006-291x(03)01259-2
- Shryock, J. C., & Belardinelli, L. (1997). Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol*, 79(12A), 2-10. doi:10.1016/s0002-9149(97)00256-7
- Shu, Y., Brown, C., Castro, R. A., Shi, R. J., Lin, E. T., Owen, R. P., . . . Giacomini, K. M. (2008). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*, 83(2), 273-280. doi:10.1038/sj.clpt.6100275
- Shu, Y., Sheardown, S. A., Brown, C., Owen, R. P., Zhang, S., Castro, R. A., . . . Giacomini, K. M. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest*, 117(5), 1422-1431. doi:10.1172/JCI30558
- Simmer, J. P., Kelly, R. E., Rinker, A. G., Jr., Scully, J. L., & Evans, D. R. (1990). Mammalian carbamyl phosphate synthetase (CPS). DNA sequence and evolution of the CPS domain of the Syrian hamster multifunctional protein CAD. *J Biol Chem*, 265(18), 10395-10402.
- Sjoberg, A. H., Wang, L., & Eriksson, S. (1998). Substrate specificity of human recombinant mitochondrial deoxyguanosine kinase with cytostatic and antiviral purine and pyrimidine analogs. *Mol Pharmacol*, 53(2), 270-273. doi:10.1124/mol.53.2.270
- Slugoski, M. D., Ng, A. M. L., Yao, S. Y. M., Lin, C. C., Mulinta, R., Cass, C. E., . . . Young, J. D. (2009). Substituted cysteine accessibility method analysis of human concentrative nucleoside transporter hCNT3 reveals a novel discontinuous region of functional importance within the CNT family motif (G/A)XKX3NEFVA(Y/M/F). *J Biol Chem*, 284(25), 17281-17292. doi:10.1074/jbc.M109.009704
- Smid, K., Van Moorsel, C. J., Noordhuis, P., Voorn, D. A., & Peters, G. J. (2001). Interference of gemcitabine triphosphate with the measurements of deoxynucleotides using an optimized DNA polymerase elongation assay. *Int J Oncol*, 19(1), 157-162.
- Smiley, J. A., Kundracik, M., Landfried, D. A., Barnes, V. R., Sr., & Axhemi, A. A. (2005). Genes of the thymidine salvage pathway: thymine-7-hydroxylase from a *Rhodotorula glutinis* cDNA library and iso-orotate decarboxylase from *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta*, 1723(1-3), 256-264. doi:10.1016/j.bbagen.2005.02.001
- Smith, K. M., Bauer, L., Fischer, M., Barkley, R., & Navia, B. A. (2005). Identification and characterization of human NR4A2 polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 133B(1), 57-63. doi:10.1002/ajmg.b.30127
- Smith, K. M., Ng, A. M., Yao, S. Y., Labeledz, K. A., Knaus, E. E., Wiebe, L. I., . . . Young, J. D. (2004). Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 558(Pt 3), 807-823. doi:10.1113/jphysiol.2004.068189
- Smith, K. M., Slugoski, M. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A., Karpinski, E., & Young, J. D. (2007). Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3. *Mol Membr Biol*, 24(1), 53-64. doi:10.1080/09687860600942534

- Smith, K. M., Slugoski, M. D., Loewen, S. K., Ng, A. M., Yao, S. Y., Chen, X. Z., . . . Young, J. D. (2005). The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *J Biol Chem*, 280(27), 25436-25449. doi:10.1074/jbc.M409454200
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 14(3), 204-220. doi:10.1038/nrg3354
- Sobrero, A. F., Moir, R. D., Bertino, J. R., & Handschumacher, R. E. (1985). Defective facilitated diffusion of nucleosides, a primary mechanism of resistance to 5-fluoro-2'-deoxyuridine in the HCT-8 human carcinoma line. *Cancer Res*, 45(7), 3155-3160.
- Sokolina, K., Kittanakom, S., Snider, J., Kotlyar, M., Maurice, P., Gandia, J., . . . Stagljjar, I. (2017). Systematic protein-protein interaction mapping for clinically relevant human GPCRs. *Mol Syst Biol*, 13(3), 918. doi:10.15252/msb.20167430
- Soler, C., Felipe, A., Casado, F. J., Celada, A., & Pastor-Anglada, M. (2000). Nitric oxide regulates nucleoside transport in activated B lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 67(3), 345-349. doi:10.1002/jlb.67.3.345
- Soler, C., Felipe, A., Garcia-Manteiga, J., Serra, M., Guillen-Gomez, E., Casado, F. J., . . . Celada, A. (2003). Interferon-gamma regulates nucleoside transport systems in macrophages through signal transduction and activator of transduction factor 1 (STAT1)-dependent and -independent signalling pathways. *Biochem J*, 375(Pt 3), 777-783. doi:10.1042/BJ20030260
- Soler, C., Felipe, A., Mata, J. F., Casado, F. J., Celada, A., & Pastor-Anglada, M. (1998). Regulation of nucleoside transport by lipopolysaccharide, phorbol esters, and tumor necrosis factor-alpha in human B-lymphocytes. *J Biol Chem*, 273(41), 26939-26945. doi:10.1074/jbc.273.41.26939
- Soler, C., Garcia-Manteiga, J., Valdes, R., Xaus, J., Comalada, M., Casado, F. J., . . . Felipe, A. (2001). Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *FASEB J*, 15(11), 1979-1988. doi:10.1096/fj.01-0022com
- Soler, C., Valdes, R., Garcia-Manteiga, J., Xaus, J., Comalada, M., Casado, F. J., . . . Pastor-Anglada, M. (2001). Lipopolysaccharide-induced apoptosis of macrophages determines the up-regulation of concentrative nucleoside transporters Cnt1 and Cnt2 through tumor necrosis factor-alpha-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 276(32), 30043-30049. doi:10.1074/jbc.M101807200
- Somasekaram, A., Jarmuz, A., How, A., Scott, J., & Navaratnam, N. (1999). Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal. *J Biol Chem*, 274(40), 28405-28412. doi:10.1074/jbc.274.40.28405
- Song, A., Zhang, Y., Han, L., Yegutkin, G. G., Liu, H., Sun, K., . . . Xia, Y. (2017). Erythrocytes retain hypoxic adenosine response for faster acclimatization upon re-ascent. *Nat Commun*, 8, 14108. doi:10.1038/ncomms14108
- Song, C. X., Diao, J., Brunger, A. T., & Quake, S. R. (2016). Simultaneous single-molecule epigenetic imaging of DNA methylation and hydroxymethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(16), 4338-4343. doi:10.1073/pnas.1600223113
- Song, C. X., Szulwach, K. E., Dai, Q., Fu, Y., Mao, S. Q., Lin, L., . . . He, C. (2013). Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell*, 153(3), 678-691. doi:10.1016/j.cell.2013.04.001
- Song, I. S., Shin, H. J., Shim, E. J., Jung, I. S., Kim, W. Y., Shon, J. H., & Shin, J. G. (2008). Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin. *Clin Pharmacol Ther*, 84(5), 559-562. doi:10.1038/clpt.2008.61
- Song, J., Rechkoblit, O., Bestor, T. H., & Patel, D. J. (2011). Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science*, 331(6020), 1036-1040. doi:10.1126/science.1195380
- Song, J. H., Cho, K. M., Kim, H. J., Kim, Y. K., Kim, N. Y., Kim, H. J., . . . Kim, T. S. (2015). Concentrative nucleoside transporter 3 as a prognostic indicator for favorable outcome

- of t(8;21)-positive acute myeloid leukemia patients after cytarabine-based chemotherapy. *Oncol Rep*, 34(1), 488-494. doi:10.3892/or.2015.3959
- Sonoda, T., & Tatibana, M. (1978). Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochim Biophys Acta*, 521(1), 55-66. doi:10.1016/0005-2787(78)90248-4
- Soo, R. A., Wang, L. Z., Ng, S. S., Chong, P. Y., Yong, W. P., Lee, S. C., . . . Soong, R. (2009). Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 63(1), 121-127. doi:10.1016/j.lungcan.2008.04.010
- Spada, F., Schiffrers, S., Kirchner, A., Zhang, Y., Arista, G., Kosmatchev, O., . . . Carell, T. (2020). Active turnover of genomic methylcytosine in pluripotent cells. *Nat Chem Biol*, 16(12), 1411-1419. doi:10.1038/s41589-020-0621-y
- Spasokoukotskaja, T., Sasvari-Szekely, M., Hullan, L., Albertioni, F., Eriksson, S., & Staub, M. (1998). Activation of deoxycytidine kinase by various nucleoside analogues. *Adv Exp Med Biol*, 431, 641-645. doi:10.1007/978-1-4615-5381-6_124
- Spiegel, R., Cliffe, S. T., Buckley, M. F., Crow, Y. J., Urquhart, J., Horovitz, Y., . . . Shalev, S. A. (2010). Expanding the clinical spectrum of SLC29A3 gene defects. *Eur J Med Genet*, 53(5), 309-313. doi:10.1016/j.ejmg.2010.06.012
- Spingardi, P., & Kriaucionis, S. (2020). How m(6)A sneaks into DNA. *Nat Chem Biol*, 16(6), 604-605. doi:10.1038/s41589-020-0534-9
- Spratlin, J., Sangha, R., Glubrecht, D., Dabbagh, L., Young, J. D., Dumontet, C., . . . Mackey, J. R. (2004). The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(20), 6956-6961. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0224
- Sproul, D., & Meehan, R. R. (2013). Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. *Brief Funct Genomics*, 12(3), 174-190. doi:10.1093/bfpg/els063
- Spruijt, C. G., Gnerlich, F., Smits, A. H., Pfaffeneder, T., Jansen, P. W., Bauer, C., . . . Vermeulen, M. (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*, 152(5), 1146-1159. doi:10.1016/j.cell.2013.02.004
- Spychala, J., Madrid-Marina, V., & Fox, I. H. (1989). Evidence for "low Km" and "high Km" soluble 5'-nucleotidases in human tissues and rat liver. *Adv Exp Med Biol*, 253B, 129-134.
- Srimaroeng, C., Perry, J. L., & Pritchard, J. B. (2008). Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica*, 38(7-8), 889-935. doi:10.1080/00498250801927435
- Stecula, A., Schlessinger, A., Giacomini, K. M., & Sali, A. (2017). Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 (hCNT3, SLC28A3) Forms a Cyclic Homotrimer. *Biochemistry*, 56(27), 3475-3483. doi:10.1021/acs.biochem.7b00339
- Stegmann, A. P., Honders, M. W., Kester, M. G., Landegent, J. E., & Willemze, R. (1993). Role of deoxycytidine kinase in an in vitro model for AraC- and DAC-resistance: substrate-enzyme interactions with deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Leukemia*, 7(7), 1005-1011.
- Steigenberger, B., Schiesser, S., Hackner, B., Brandmayr, C., Laube, S. K., Steinbacher, J., . . . Carell, T. (2013). Synthesis of 5-hydroxymethyl-, 5-formyl-, and 5-carboxycytidine-triphosphates and their incorporation into oligonucleotides by polymerase chain reaction. *Org Lett*, 15(2), 366-369. doi:10.1021/ol3033219
- Stiles, G. L. (1992). Adenosine receptors. *J Biol Chem*, 267(10), 6451-6454.
- Stoetzer, O. J., Pogrebniak, A., Scholz, M., Pelka-Fleischer, R., Gullis, E., Darsow, M., . . . Wilmanns, W. (1999). Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 13(11), 1873-1880. doi:10.1038/sj.leu.2401572
- Stolarczyk, E., Guissard, C., Michau, A., Even, P. C., Grosfeld, A., Serradas, P., . . . Le Gall, M. (2010). Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(5), E1078-1087. doi:10.1152/ajpendo.00737.2009

- Stolarski, R., Dudycz, L., & Shugar, D. (1980). NMR studies in the syn-anti dynamic equilibrium in purine nucleosides and nucleotides. *Eur J Biochem*, 108(1), 111-121. doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb04701.x
- Stolk, M., Cooper, E., Vilks, G., Litchfield, D. W., & Hammond, J. R. (2005). Subtype-specific regulation of equilibrative nucleoside transporters by protein kinase CK2. *Biochem J*, 386(Pt 2), 281-289. doi:10.1042/bj20041571
- Stresemann, C., & Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*, 123(1), 8-13. doi:10.1002/ijc.23607
- Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D. A., Jones, D. T., Konermann, C., . . . Pfister, S. M. (2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*, 22(4), 425-437. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024
- Su, M., Kirchner, A., Stazzoni, S., Muller, M., Wagner, M., Schroder, A., & Carell, T. (2016). 5-Formylcytosine Could Be a Semipermanent Base in Specific Genome Sites. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(39), 11797-11800. doi:10.1002/anie.201605994
- Sun, J., & Zheng, N. (2015). Molecular Mechanism Underlying the Plant NRT1.1 Dual-Affinity Nitrate Transporter. *Front Physiol*, 6, 386. doi:10.3389/fphys.2015.00386
- Sun, Z., Dai, N., Borgaro, J. G., Quimby, A., Sun, D., Correa, I. R., Jr., . . . Guan, S. (2015). A sensitive approach to map genome-wide 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine at single-base resolution. *Mol Cell*, 57(4), 750-761. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.035
- Sundaram, M., Yao, S. Y., Ingram, J. C., Berry, Z. A., Abidi, F., Cass, C. E., . . . Young, J. D. (2001). Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *J Biol Chem*, 276(48), 45270-45275. doi:10.1074/jbc.M107169200
- Sundaram, M., Yao, S. Y., Ng, A. M., Griffiths, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (1998). Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *J Biol Chem*, 273(34), 21519-21525. doi:10.1074/jbc.273.34.21519
- Suomalainen, A., & Isohanni, P. (2010). Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord*, 20(7), 429-437. doi:10.1016/j.nmd.2010.03.017
- Suttle, D. P., Bugg, B. Y., Winkler, J. K., & Kanalas, J. J. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(6), 1754-1758. doi:10.1073/pnas.85.6.1754
- Suzuki, N. N., Koizumi, K., Fukushima, M., Matsuda, A., & Inagaki, F. (2004). Structural basis for the specificity, catalysis, and regulation of human uridine-cytidine kinase. *Structure*, 12(5), 751-764. doi:10.1016/j.str.2004.02.038
- Szkotak, A. J., Ng, A. M., Sawicka, J., Baldwin, S. A., Man, S. F., Cass, C. E., . . . Duszyk, M. (2001). Regulation of K(+) current in human airway epithelial cells by exogenous and autocrine adenosine. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(6), C1991-2002. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.6.C1991
- Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C. X., Han, J. W., Kim, S., . . . Jin, P. (2011). Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. *PLoS Genet*, 7(6), e1002154. doi:10.1371/journal.pgen.1002154
- Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C. X., Wu, H., Dai, Q., . . . Jin, P. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*, 14(12), 1607-1616. doi:10.1038/nn.2959

T

- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., . . . Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), 930-935. doi:10.1126/science.1170116
- Takahashi, T., Otsuguro, K., Ohta, T., & Ito, S. (2010). Adenosine and inosine release during hypoxia in the isolated spinal cord of neonatal rats. *Br J Pharmacol*, 161(8), 1806-1816. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01002.x
- Takai, H., Masuda, K., Sato, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., . . . Akiyama, T. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell Rep*, 9(1), 48-60. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.071
- Takeda, M., Khamdang, S., Narikawa, S., Kimura, H., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., . . . Endou, H. (2002). Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3), 918-924. doi:10.1124/jpet.300.3.918
- Takenaka, I., Aoyama, K., Nakamura, M., Fukuyama, H., Urakami, Y., Takenaka, Y., & Kadoya, T. (2002). Oral styletted intubation under video control in a patient with a large mobile glottic tumour and a difficult airway. *Can J Anaesth*, 49(2), 203-206. doi:10.1007/BF03020497
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., . . . Nakamura, Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, 404(6773), 42-49. doi:10.1038/35003506
- Tanaka, T., Doe, J. M., Horstmann, S. A., Ahmad, S., Ahmad, A., Min, S. J., . . . Vandivier, R. W. (2014). Neuroendocrine signaling via the serotonin transporter regulates clearance of apoptotic cells. *J Biol Chem*, 289(15), 10466-10475. doi:10.1074/jbc.M113.482299
- Tanaka, M. & Yoshida, S. (1982). Altered sensitivity to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate of DNA polymerase alpha from leukemic blasts of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 42(2), 649-653.
- Tao, H., Xu, W., Qu, W., Gao, H., Zhang, J., Cheng, X., . . . Shu, Q. (2021). Loss of Ten-Eleven Translocation 2 induces cardiac hypertrophy and fibrosis through modulating ERK signaling pathway. *Hum Mol Genet*. doi:10.1093/hmg/ddab046
- Tao, Q. F., Yuan, S. X., Yang, F., Yang, S., Yang, Y., Yuan, J. H., . . . Zhou, W. P. (2015). Aldolase B inhibits metastasis through Ten-Eleven Translocation 1 and serves as a prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*, 14, 170. doi:10.1186/s12943-015-0437-7
- Tattersall, M. H., Slowiaczek, P., & De Fazio, A. (1983). Regional variation in human extracellular purine levels. *J Lab Clin Med*, 102(3), 411-420.
- Taylor, B. S., Alarcon, L. H., & Billiar, T. R. (1998). Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)*, 63(7), 766-781.
- Tefferi, A. (2014). Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 89(9), 915-925. doi:10.1002/ajh.23703
- Tefferi, A., Rumi, E., Finazzi, G., Gisslinger, H., Vannucchi, A. M., Rodeghiero, F., . . . Barbui, T. (2013). Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*, 27(9), 1874-1881. doi:10.1038/leu.2013.163
- Thevelein, J. M., & Voordeckers, K. (2009). Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Mol Biol Evol*, 26(11), 2407-2414. doi:10.1093/molbev/msp168
- Thienpont, B., Steinbacher, J., Zhao, H., D'Anna, F., Kuchnio, A., Ploumakis, A., . . . Lambrechts, D. (2016). Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature*, 537(7618), 63-68. doi:10.1038/nature19081
- Thomas, A., El Rouby, S., Reed, J. C., Krajewski, S., Silber, R., Potmesil, M., & Newcomb, E. W. (1996). Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship

- between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene*, 12(5), 1055-1062.
- Toan, S. V., To, K. K., Leung, G. P., de Souza, M. O., Ward, J. L., & Tse, C. M. (2003). Genomic organization and functional characterization of the human concentrative nucleoside transporter-3 isoform (hCNT3) expressed in mammalian cells. *Pflugers Arch*, 447(2), 195-204. doi:10.1007/s00424-003-1166-0
- Tolis, C., Peters, G. J., Ferreira, C. G., Pinedo, H. M., & Giaccone, G. (1999). Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer*, 35(5), 796-807. doi:10.1016/s0959-8049(98)00425-0
- Tomkova, M., McClellan, M., Kriaucionis, S., & Schuster-Bockler, B. (2018). DNA Replication and associated repair pathways are involved in the mutagenesis of methylated cytosine. *DNA Repair (Amst)*, 62, 1-7. doi:10.1016/j.dnarep.2017.11.005
- Tomkova, M., McClellan, M., Kriaucionis, S., & Schuster-Boeckler, B. (2016). 5-hydroxymethylcytosine marks regions with reduced mutation frequency in human DNA. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.17082
- Tozzi, V. (2010). Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res*, 85(1), 190-200. doi:10.1016/j.antiviral.2009.09.001
- Traube, F. R., & Carell, T. (2017). The chemistries and consequences of DNA and RNA methylation and demethylation. *RNA Biol*, 14(9), 1099-1107. doi:10.1080/15476286.2017.1318241
- Traube, F. R., Schiffers, S., Iwan, K., Kellner, S., Spada, F., Muller, M., & Carell, T. (2019). Isotope-dilution mass spectrometry for exact quantification of noncanonical DNA nucleosides. *Nat Protoc*, 14(1), 283-312. doi:10.1038/s41596-018-0094-6
- Tsang, R. Y., Santos, C., Ghosh, S., Dabbagh, L., King, K., Young, J., . . . Lai, R. (2008). Immunohistochemistry for human concentrative nucleoside transporter 3 protein predicts fludarabine sensitivity in chronic lymphocytic leukemia. *Mod Pathol*, 21(11), 1387-1393. doi:10.1038/modpathol.2008.110
- Tse, C. M., Belt, J. A., Jarvis, S. M., Paterson, A. R., Wu, J. S., & Young, J. D. (1985). Reconstitution studies of the human erythrocyte nucleoside transporter. *J Biol Chem*, 260(6), 3506-3511.
- Tseng, W. C., Derse, D., Cheng, Y. C., Brockman, R. W., & Bennett, L. L., Jr. (1982). In vitro biological activity of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and the biochemical actions of its triphosphate on DNA polymerases and ribonucleotide reductase from HeLa cells. *Mol Pharmacol*, 21(2), 474-477.
- Tsesmetzis, N., Paulin, C. B. J., Rudd, S. G., & Herold, N. (2018). Nucleobase and Nucleoside Analogues: Resistance and Re-Sensitisation at the Level of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Metabolism. *Cancers (Basel)*, 10(7). doi:10.3390/cancers10070240
- Tsuboi, K. K., Edmunds, N. H., & Kwong, L. K. (1977). Selective inhibition of pyrimidine biosynthesis and effect on proliferative growth of colonic cancer cells. *Cancer Res*, 37(9), 3080-3087.
- Turano, C., Gaucci, E., Grillo, C., & Chichiarelli, S. (2011). ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell Mol Biol Lett*, 16(4), 539-563. doi:10.2478/s11658-011-0022-z
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A., Fang, F., Yilmaz, E., . . . Chan, T. A. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 483(7390), 479-483. doi:10.1038/nature10866
- Tzvetkov, M. V., Saadatmand, A. R., Bokelmann, K., Meineke, I., Kaiser, R., & Brockmoller, J. (2012). Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT(3) antagonists tropisetron and ondansetron. *Pharmacogenomics J*, 12(1), 22-29. doi:10.1038/tpj.2010.75
- Tzvetkov, M. V., Vormfelde, S. V., Balen, D., Meineke, I., Schmidt, T., Sehr, D., . . . Brockmoller, J. (2009). The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1,

OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther*, 86(3), 299-306. doi:10.1038/clpt.2009.92

U

- Ungemach, F. R., & Hegner, D. (1978). Uptake of thymidine into isolated rat hepatocytes. Evidence for two transport systems. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 359(7), 845-856. doi:10.1515/bchm2.1978.359.2.845
- Urtasun, N., Boces-Pascual, C., Boix, L., Bruix, J., Pastor-Anglada, M., & Perez-Torras, S. (2017). Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 8(52), 90185-90196. doi:10.18632/oncotarget.21624

V

- Vainchenker, W., Dusa, A., & Constantinescu, S. N. (2008). JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol*, 19(4), 385-393. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.002
- Valdes, R., Arastu-Kapur, S., Landfear, S. M., & Shinde, U. (2009). An ab Initio structural model of a nucleoside permease predicts functionally important residues. *J Biol Chem*, 284(28), 19067-19076. doi:10.1074/jbc.M109.017947
- Valdes, R., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2002). Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(3), 575-579. doi:10.1016/s0006-291x(02)00919-1
- Valdes, R., Elferich, J., Shinde, U., & Landfear, S. M. (2014). Identification of the intracellular gate for a member of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *J Biol Chem*, 289(13), 8799-8809. doi:10.1074/jbc.M113.546960
- Valdes, R., Fernandez-Veledo, S., Aymerich, I., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2006). TGF-beta transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells. *Cell Mol Life Sci*, 63(21), 2527-2537. doi:10.1007/s00018-006-6240-2
- Valdes, R., Shinde, U., & Landfear, S. M. (2012). Cysteine cross-linking defines the extracellular gate for the *Leishmania donovani* nucleoside transporter 1.1 (LdNT1.1). *J Biol Chem*, 287(53), 44036-44045. doi:10.1074/jbc.M112.414433
- Valinluck, V., Tsai, H. H., Rogstad, D. K., Burdzy, A., Bird, A., & Sowers, L. C. (2004). Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*, 32(14), 4100-4108. doi:10.1093/nar/gkh739
- Valledor, A. F., Comalada, M., Xaus, J., & Celada, A. (2000). The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *J Biol Chem*, 275(10), 7403-7409. doi:10.1074/jbc.275.10.7403
- Vallon, V., Muhlbauer, B., & Osswald, H. (2006). Adenosine and kidney function. *Physiol Rev*, 86(3), 901-940. doi:10.1152/physrev.00031.2005
- Valvezan, A. J., Turner, M., Belaid, A., Lam, H. C., Miller, S. K., McNamara, M. C., . . . Manning, B. D. (2017). mTORC1 Couples Nucleotide Synthesis to Nucleotide Demand Resulting in a Targetable Metabolic Vulnerability. *Cancer Cell*, 32(5), 624-638 e625. doi:10.1016/j.ccell.2017.09.013
- Van Aubel, R. A., Masereeuw, R., & Russel, F. G. (2000). Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(2), F216-232. doi:10.1152/ajprenal.2000.279.2.F216

- Van Den Neste, E., Cazin, B., Janssens, A., Gonzalez-Barca, E., Terol, M. J., Levy, V., . . . Campas, C. (2013). Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase I/II study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71(3), 581-591. doi:10.1007/s00280-012-2033-5
- van Moorsel, C. J., Kroep, J. R., Pinedo, H. M., Veerman, G., Voorn, D. A., Postmus, P. E., . . . Peters, G. J. (1999). Pharmacokinetic schedule finding study of the combination of gemcitabine and cisplatin in patients with solid tumors. *Ann Oncol*, 10(4), 441-448. doi:10.1023/a:1008301522349
- Van Rompay, A. R., Johansson, M., & Karlsson, A. (1999). Phosphorylation of deoxycytidine analog monophosphates by UMP-CMP kinase: molecular characterization of the human enzyme. *Mol Pharmacol*, 56(3), 562-569. doi:10.1124/mol.56.3.562
- Van Rompay, A. R., Johansson, M., & Karlsson, A. (2000). Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol Ther*, 87(2-3), 189-198. doi:10.1016/s0163-7258(00)00048-6
- Van Rompay, A. R., Norda, A., Linden, K., Johansson, M., & Karlsson, A. (2001). Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Mol Pharmacol*, 59(5), 1181-1186. doi:10.1124/mol.59.5.1181
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
- Vasquez, G., Sanhueza, F., Vasquez, R., Gonzalez, M., San Martin, R., Casanello, P., & Sobrevia, L. (2004). Role of adenosine transport in gestational diabetes-induced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelium. *J Physiol*, 560(Pt 1), 111-122. doi:10.1113/jphysiol.2004.068288
- Verhoef, V., Sarup, J., & Fridland, A. (1981). Identification of the mechanism of activation of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine in human lymphoid cells using mutants deficient in nucleoside kinases. *Cancer Res*, 41(11 Pt 1), 4478-4483.
- Vernaleken, A., Veyhl, M., Gorboulev, V., Kottra, G., Palm, D., Burckhardt, B. C., . . . Koepsell, H. (2007). Tripeptides of RS1 (RSC1A1) inhibit a monosaccharide-dependent exocytotic pathway of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 with high affinity. *J Biol Chem*, 282(39), 28501-28513. doi:10.1074/jbc.M705416200
- Verstovsek, S. (2009). Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 636-642. doi:10.1182/asheducation-2009.1.636
- Veyhl, M., Keller, T., Gorboulev, V., Vernaleken, A., & Koepsell, H. (2006). RS1 (RSC1A1) regulates the exocytotic pathway of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(6), F1213-1223. doi:10.1152/ajprenal.00068.2006
- Vickers, M. F., Kumar, R., Visser, F., Zhang, J., Charania, J., Raborn, R. T., . . . Cass, C. E. (2002). Comparison of the interaction of uridine, cytidine, and other pyrimidine nucleoside analogues with recombinant human equilibrative nucleoside transporter 2 (hENT2) produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Cell Biol*, 80(5), 639-644. doi:10.1139/o02-148
- Vickers, M. F., Mani, R. S., Sundaram, M., Hogue, D. L., Young, J. D., Baldwin, S. A., & Cass, C. E. (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.
- Vickers, M. F., Zhang, J., Visser, F., Tackaberry, T., Robins, M. J., Nielsen, L. P., . . . Cass, C. E. (2004). Uridine recognition motifs of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23(1-2), 361-373. doi:10.1081/ncn-120028333
- Vijayalakshmi, D., Dagnino, L., Belt, J. A., Gati, W. P., Cass, C. E., & Paterson, A. R. (1992). L1210/B23.1 cells express equilibrative, inhibitor-sensitive nucleoside transport activity and lack two parental nucleoside transport activities. *J Biol Chem*, 267(24), 16951-16956.

- Villa, E., Ali, E. S., Sahu, U., & Ben-Sahra, I. (2019). Cancer Cells Tune the Signaling Pathways to Empower de Novo Synthesis of Nucleotides. *Cancers (Basel)*, 11(5). doi:10.3390/cancers11050688
- Visser, F., Vickers, M. F., Ng, A. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (2002). Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyridamole. *J Biol Chem*, 277(1), 395-401. doi:10.1074/jbc.M105324200
- Vivet-Boudou, V., Didierjean, J., Isele, C., & Marquet, R. (2006). Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication. *Cell Mol Life Sci*, 63(2), 163-186. doi:10.1007/s00018-005-5367-x
- Volonte, C., & D'Ambrosi, N. (2009). Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *FEBS J*, 276(2), 318-329. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06793.x
- von der Maase, H. (2001). Gemcitabine-containing regimens in bladder cancer: A new standard of care. *Semin Oncol*, 28(3 Suppl 10), 1-3. doi:10.1053/sonc.2001.22541
- von Meyenn, F., Iurlaro, M., Habibi, E., Liu, N. Q., Salehzadeh-Yazdi, A., Santos, F., . . . Stunnenberg, H. G. (2016). Impairment of DNA Methylation Maintenance Is the Main Cause of Global Demethylation in Naive Embryonic Stem Cells. *Mol Cell*, 62(6), 848-861. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.025
- Vu, L. P., Pickering, B. F., Cheng, Y., Zaccara, S., Nguyen, D., Minuesa, G., . . . Kharas, M. G. (2017). The N(6)-methyladenosine (m(6)A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells. *Nat Med*, 23(11), 1369-1376. doi:10.1038/nm.4416

W

- Wagner, J. R., & Cadet, J. (2010). Oxidation reactions of cytosine DNA components by hydroxyl radical and one-electron oxidants in aerated aqueous solutions. *Acc Chem Res*, 43(4), 564-571. doi:10.1021/ar9002637
- Wagner, M., Steinbacher, J., Kraus, T. F., Michalakakis, S., Hackner, B., Pfaffeneder, T., . . . Carell, T. (2015). Age-dependent levels of 5-methyl-, 5-hydroxymethyl-, and 5-formylcytosine in human and mouse brain tissues. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54(42), 12511-12514. doi:10.1002/anie.201502722
- Walko, C. M., & Lindley, C. (2005). Capecitabine: a review. *Clin Ther*, 27(1), 23-44. doi:10.1016/j.clinthera.2005.01.005
- Wang, C., & Buolamwini, J. K. (2019). A novel RNA variant of human concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) that is a potential cancer biomarker. *Exp Hematol Oncol*, 8, 18. doi:10.1186/s40164-019-0144-y
- Wang, H., Liu, L., Gou, M., Huang, G., Tian, C., Yang, J., . . . Liu, L. (2020). Roles of Tet2 in meiosis, fertility and reproductive aging. *Protein Cell*. doi:10.1007/s13238-020-00805-8
- Wang, J., & Giacomini, K. M. (1997). Molecular determinants of substrate selectivity in Na⁺-dependent nucleoside transporters. *J Biol Chem*, 272(46), 28845-28848. doi:10.1074/jbc.272.46.28845
- Wang, J., & Giacomini, K. M. (1999). Characterization of a bioengineered chimeric Na⁺-nucleoside transporter. *Mol Pharmacol*, 55(2), 234-240. doi:10.1124/mol.55.2.234
- Wang, J., & Giacomini, K. M. (1999). Serine 318 is essential for the pyrimidine selectivity of the N2 Na⁺-nucleoside transporter. *J Biol Chem*, 274(4), 2298-2302. doi:10.1074/jbc.274.4.2298
- Wang, J., Su, S. F., Dresser, M. J., Schaner, M. E., Washington, C. B., & Giacomini, K. M. (1997). Na⁺-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am J Physiol*, 273(6), F1058-1065. doi:10.1152/ajprenal.1997.273.6.F1058

- Wang, L., Giannoudis, A., Lane, S., Williamson, P., Pirmohamed, M., & Clark, R. E. (2008). Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther*, 83(2), 258-264. doi:10.1038/sj.clpt.6100268
- Wang, L., Karlsson, A., Arner, E. S., & Eriksson, S. (1993). Substrate specificity of mitochondrial 2'-deoxyguanosine kinase. Efficient phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine. *J Biol Chem*, 268(30), 22847-22852.
- Wang, L., Munch-Petersen, B., Herrstrom Sjoberg, A., Hellman, U., Bergman, T., Jornvall, H., & Eriksson, S. (1999). Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Lett*, 443(2), 170-174. doi:10.1016/s0014-5793(98)01711-6
- Wang, T., Pan, Q., Lin, L., Szulwach, K. E., Song, C. X., He, C., . . . Li, X. (2012). Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopmental genes in the developing human cerebellum. *Hum Mol Genet*, 21(26), 5500-5510. doi:10.1093/hmg/dds394
- Ward, J. L., Leung, G. P., Toan, S. V., & Tse, C. M. (2003). Functional analysis of site-directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2. *Arch Biochem Biophys*, 411(1), 19-26. doi:10.1016/s0003-9861(02)00718-x
- Ward, J. L., Serali, A., Mo, Z. P., & Tse, C. M. (2000). Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J Biol Chem*, 275(12), 8375-8381. doi:10.1074/jbc.275.12.8375
- Waschke, S., Reefschlager, J., Barwolff, D., & Langen, P. (1975). 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, a normal DNA constituent in certain *Bacillus subtilis* phages is cytostatic for mammalian cells. *Nature*, 255(5510), 629-630. doi:10.1038/255629a0
- Wasternack, C. (1980). Degradation of pyrimidines and pyrimidine analogs--pathways and mutual influences. *Pharmacol Ther*, 8(3), 629-651. doi:10.1016/0163-7258(80)90079-0
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738. doi:10.1038/171737a0
- Wattel, E., Preudhomme, C., Hecquet, B., Vanrumbeke, M., Quesnel, B., Dervite, I., . . . Fenaux, P. (1994). p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 84(9), 3148-3157.
- Wei, C. W., Lee, C. Y., Lee, D. J., Chu, C. F., Wang, J. C., Wang, T. C., . . . Hsu, C. L. (2018). Equilibrative Nucleoside Transporter 3 Regulates T Cell Homeostasis by Coordinating Lysosomal Function with Nucleoside Availability. *Cell Rep*, 23(8), 2330-2341. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.077
- White, D. L., Saunders, V. A., Dang, P., Engler, J., Zannettino, A. C., Cambareri, A. C., . . . Hughes, T. P. (2006). OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood*, 108(2), 697-704. doi:10.1182/blood-2005-11-4687
- Wildenhof, T. M., Schiffers, S., Traube, F. R., Mayer, P., & Carell, T. (2019). Influencing Epigenetic Information with a Hydrolytically Stable Carbocyclic 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Angew Chem Int Ed Engl*, 58(37), 12984-12987. doi:10.1002/anie.201904794
- Wiley, J. S., Jones, S. P., Sawyer, W. H., & Paterson, A. R. (1982). Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. *J Clin Invest*, 69(2), 479-489. doi:10.1172/jci110472
- Wiley, J. S., Smith, C. L., & Jamieson, G. P. (1991). Transport of 2'-deoxycoformycin in human leukemic and lymphoma cells. *Biochem Pharmacol*, 42(3), 708-710. doi:10.1016/0006-2952(91)90338-6
- Wilkins, M. H., Stokes, A. R., & Wilson, H. R. (1953). Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature*, 171(4356), 738-740. doi:10.1038/171738a0

- Willems, L., Ashton, K. J., & Headrick, J. P. (2005). Adenosine-mediated cardioprotection in the aging myocardium. *Cardiovasc Res*, 66(2), 245-255. doi:10.1016/j.cardiores.2004.11.008
- Wohlhueter, R. M., Mclvor, R. S., & Plagemann, P. G. (1980). Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol*, 104(3), 309-319. doi:10.1002/jcp.1041040305
- Wojtal, K. A., Eloranta, J. J., Hruz, P., Gutmann, H., Drewe, J., Staumann, A., . . . Vavricka, S. R. (2009). Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients. *Drug Metab Dispos*, 37(9), 1871-1877. doi:10.1124/dmd.109.027367
- Wundergem, R., Cregan, M., Strickler, L., Miller, R., & Suttles, J. (1998). Membrane potassium channels and human bladder tumor cells: II. Growth properties. *J Membr Biol*, 161(3), 257-262. doi:10.1007/s002329900332
- Wong, A., Soo, R. A., Yong, W. P., & Innocenti, F. (2009). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metab Rev*, 41(2), 77-88. doi:10.1080/03602530902741828
- Woodfork, K. A., Wonderlin, W. F., Peterson, V. A., & Strobl, J. S. (1995). Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *J Cell Physiol*, 162(2), 163-171. doi:10.1002/jcp.1041620202
- Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., . . . Walter, J. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun*, 2, 241. doi:10.1038/ncomms1240
- Wright, A. M., Paterson, A. R., Sowa, B., Akabutu, J. J., Grundy, P. E., & Gati, W. P. (2002). Cytotoxicity of 2-chlorodeoxyadenosine and arabinosylcytosine in leukaemic lymphoblasts from paediatric patients: significance of cellular nucleoside transporter content. *Br J Haematol*, 116(3), 528-537. doi:10.1046/j.0007-1048.2001.03300.x
- Wright, N. J., & Lee, S. Y. (2019). Structures of human ENT1 in complex with adenosine reuptake inhibitors. *Nat Struct Mol Biol*, 26(7), 599-606. doi:10.1038/s41594-019-0245-7
- Wu, H., Wu, X., Shen, L., & Zhang, Y. (2014). Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing. *Nat Biotechnol*, 32(12), 1231-1240. doi:10.1038/nbt.3073
- Wu, J. S., & Young, J. D. (1984). Photoaffinity labelling of nucleoside-transport proteins in plasma membranes isolated from rat and guinea-pig liver. *Biochem J*, 220(2), 499-506. doi:10.1042/bj2200499
- Wu, S. C., & Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(9), 607-620. doi:10.1038/nrm2950
- Wu, T. P., Wang, T., Seetin, M. G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., . . . Xiao, A. Z. (2016). DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 532(7599), 329-333. doi:10.1038/nature17640
- Wu, X., Gutierrez, M. M., & Giacomini, K. M. (1994). Further characterization of the sodium-dependent nucleoside transporter (N3) in choroid plexus from rabbit. *Biochim Biophys Acta*, 1191(1), 190-196. doi:10.1016/0005-2736(94)90248-8
- Wu, X., Inoue, A., Suzuki, T., & Zhang, Y. (2017). Simultaneous mapping of active DNA demethylation and sister chromatid exchange in single cells. *Genes Dev*, 31(5), 511-523. doi:10.1101/gad.294843.116
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*, 18(9), 517-534. doi:10.1038/nrg.2017.33
- Wyatt, J. P., & Khoo, P. S. (1950). Genital tract tumours of an adenomatoid nature. *Br J Urol*, 22(3), 187-194. doi:10.1111/j.1464-410x.1950.tb02521.x

X

- Xaus, J., Cardo, M., Valledor, A. F., Soler, C., Lloberas, J., & Celada, A. (1999). Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity*, 11(1), 103-113. doi:10.1016/s1074-7613(00)80085-0
- Xia, L., Engel, K., Zhou, M., & Wang, J. (2007). Membrane localization and pH-dependent transport of a newly cloned organic cation transporter (PMAT) in kidney cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(2), F682-690. doi:10.1152/ajprenal.00302.2006
- Xiong, J., Zhang, Z., Chen, J., Huang, H., Xu, Y., Ding, X., . . . Zhu, B. (2016). Cooperative Action between SALL4A and TET Proteins in Stepwise Oxidation of 5-Methylcytosine. *Mol Cell*, 64(5), 913-925. doi:10.1016/j.molcel.2016.10.013
- Xu, G. L., & Bochtler, M. (2020). Reversal of nucleobase methylation by dioxygenases. *Nat Chem Biol*, 16(11), 1160-1169. doi:10.1038/s41589-020-00675-5
- Xu, S., Li, W., Zhu, J., Wang, R., Li, Z., Xu, G. L., & Ding, J. (2013). Crystal structures of isoorotate decarboxylases reveal a novel catalytic mechanism of 5-carboxyl-uracil decarboxylation and shed light on the search for DNA decarboxylase. *Cell Res*, 23(11), 1296-1309. doi:10.1038/cr.2013.107
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S. H., . . . Xiong, Y. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, 19(1), 17-30. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.014
- Xu, X., Tao, Y., Gao, X., Zhang, L., Li, X., Zou, W., . . . Hu, R. (2016). A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discov*, 2, 16009. doi:10.1038/celldisc.2016.9
- Xu, Y., Johansson, M., & Karlsson, A. (2008). Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *J Biol Chem*, 283(3), 1563-1571. doi:10.1074/jbc.M707997200
- Xue, J. H., Xu, G. F., Gu, T. P., Chen, G. D., Han, B. B., Xu, Z. M., . . . Du, Y. R. (2016). Uracil-DNA Glycosylase UNG Promotes Tet-mediated DNA Demethylation. *J Biol Chem*, 291(2), 731-738. doi:10.1074/jbc.M115.693861
- Xue, J. H., & Xu, G. L. (2015). RNA Pol II as a sensor of 5caC. *Cell Res*, 25(10), 1089-1090. doi:10.1038/cr.2015.103
- Xue, L., Zhou, B., Liu, X., Qiu, W., Jin, Z., & Yen, Y. (2003). Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits. *Cancer Res*, 63(5), 980-986.

Y

- Yamaguchi, N., Kodama, M., & Ueda, K. (1985). Diadenosine tetraphosphate as a signal molecule linked with the functional state of rat liver. *Gastroenterology*, 89(4), 723-731. doi:10.1016/0016-5085(85)90565-7
- Yamamoto, T., Kuniki, K., Takekuma, Y., Hirano, T., Iseki, K., & Sugawara, M. (2007). Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *Eur J Pharmacol*, 557(1), 1-8. doi:10.1016/j.ejphar.2006.10.062
- Yamaoka, T., Kondo, M., Honda, S., Iwahana, H., Moritani, M., Ii, S., . . . Itakura, M. (1997). Amidophosphoribosyltransferase limits the rate of cell growth-linked de novo purine biosynthesis in the presence of constant capacity of salvage purine biosynthesis. *J Biol Chem*, 272(28), 17719-17725. doi:10.1074/jbc.272.28.17719
- Yamaoka, T., Yano, M., Kondo, M., Sasaki, H., Hino, S., Katashima, R., . . . Itakura, M. (2001). Feedback inhibition of amidophosphoribosyltransferase regulates the rate of cell growth via purine nucleotide, DNA, and protein syntheses. *J Biol Chem*, 276(24), 21285-21291. doi:10.1074/jbc.M011103200

- Yan, L., Yang, X., & Davidson, N. E. (2001). Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6(2), 183-192. doi:10.1023/a:1011308707512
- Yan, Q. (2005). Pharmacogenomics and systems biology of membrane transporters. *Mol Biotechnol*, 29(1), 75-88. doi:10.1385/MB:29:1:75
- Yang, H., Liu, Y., Bai, F., Zhang, J. Y., Ma, S. H., Liu, J., . . . Xiong, Y. (2013). Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*, 32(5), 663-669. doi:10.1038/onc.2012.67
- Yao, S. Y., Ng, A. M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (2011). Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J Biol Chem*, 286(37), 32552-32562. doi:10.1074/jbc.M111.236117
- Yao, S. Y., Ng, A. M., Muzyka, W. R., Griffiths, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (1997). Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J Biol Chem*, 272(45), 28423-28430. doi:10.1074/jbc.272.45.28423
- Yao, S. Y., Ng, A. M., Sundaram, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (2001). Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes. *Mol Membr Biol*, 18(2), 161-167. doi:10.1080/09687680110048318
- Yao, S. Y., Ng, A. M., Vickers, M. F., Sundaram, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (2002). Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase translocation. *J Biol Chem*, 277(28), 24938-24948. doi:10.1074/jbc.M200966200
- Yao, S. Y., Sundaram, M., Chomey, E. G., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Young, J. D. (2001). Identification of Cys140 in helix 4 as an exofacial cysteine residue within the substrate-translocation channel of rat equilibrative nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter rENT2. *Biochem J*, 353(Pt 2), 387-393. doi:10.1042/0264-6021:3530387
- Yao, S. Y. M., & Young, J. D. (2018). Inward- and outward-facing homology modeling of human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) predicts an elevator-type transport mechanism. *Channels (Austin)*, 12(1), 291-298. doi:10.1080/19336950.2018.1506665
- Ye, J. H., & Rajendran, V. M. (2009). Adenosine: an immune modulator of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 15(36), 4491-4498. doi:10.3748/wjg.15.4491
- Yee, S. W., Shima, J. E., Hesselson, S., Nguyen, L., De Val, S., Lafond, R. J., . . . Giacomini, K. M. (2009). Identification and characterization of proximal promoter polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter 2 (SLC28A2). *J Pharmacol Exp Ther*, 328(3), 699-707. doi:10.1124/jpet.108.147207
- Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*, 1783(5), 673-694. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.024
- Yin, R., Mao, S. Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., . . . Wang, H. (2013). Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc*, 135(28), 10396-10403. doi:10.1021/ja4028346
- Yoo, C. B., Cheng, J. C., & Jones, P. A. (2004). Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 6), 910-912. doi:10.1042/BST0320910
- Young, J. D., Yao, S. Y., Baldwin, J. M., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 529-547. doi:10.1016/j.mam.2012.05.007

- Young, J. D., Yao, S. Y., Sun, L., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2008). Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica*, 38(7-8), 995-1021. doi:10.1080/00498250801927427
- Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C. X., Zhang, L., Kim, A., . . . He, C. (2012). Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell*, 149(6), 1368-1380. doi:10.1016/j.cell.2012.04.027

Z

- Zafar, M., Naydenova, Z., & Coe, I. R. (2016). Extended exposure to substrate regulates the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 35(10-12), 631-642. doi:10.1080/15257770.2016.1200074
- Zaja, F., Di Loreto, C., Amoroso, V., Salmaso, F., Russo, D., Silvestri, F., . . . Baccarani, M. (1998). BCL-2 immunohistochemical evaluation in B-cell chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia before treatment with fludarabine and 2-chloro-deoxy-adenosine. *Leuk Lymphoma*, 28(5-6), 567-572. doi:10.3109/10428199809058365
- Zauri, M., Berridge, G., Thezenas, M. L., Pugh, K. M., Goldin, R., Kessler, B. M., & Kriaucionis, S. (2015). CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature*, 524(7563), 114-118. doi:10.1038/nature14948
- Zhang, G., Huang, H., Liu, D., Cheng, Y., Liu, X., Zhang, W., . . . Chen, D. (2015). N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 161(4), 893-906. doi:10.1016/j.cell.2015.04.018
- Zhang, J., Tackaberry, T., Ritzel, M. W., Raborn, T., Barron, G., Baldwin, S. A., . . . Cass, C. E. (2006). Cysteine-accessibility analysis of transmembrane domains 11-13 of human concentrative nucleoside transporter 3. *Biochem J*, 394(Pt 2), 389-398. doi:10.1042/BJ20051476
- Zhang, J., Visser, F., King, K. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (2007). The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 26(1), 85-110. doi:10.1007/s10555-007-9044-4
- Zhang, J., Visser, F., Vickers, M. F., Lang, T., Robins, M. J., Nielsen, L. P., . . . Cass, C. E. (2003). Uridine binding motifs of human concentrative nucleoside transporters 1 and 3 produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol*, 64(6), 1512-1520. doi:10.1124/mol.64.6.1512
- Zhang, L., Gorset, W., Dresser, M. J., & Giacomini, K. M. (1999). The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. *J Pharmacol Exp Ther*, 288(3), 1192-1198.
- Zhang, R. R., Cui, Q. Y., Murai, K., Lim, Y. C., Smith, Z. D., Jin, S., . . . Xu, G. L. (2013). Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Cell Stem Cell*, 13(2), 237-245. doi:10.1016/j.stem.2013.05.006
- Zhang, W., Xia, W., Wang, Q., Towers, A. J., Chen, J., Gao, R., . . . Xie, W. (2016). Isoform Switch of TET1 Regulates DNA Demethylation and Mouse Development. *Mol Cell*, 64(6), 1062-1073. doi:10.1016/j.molcel.2016.10.030
- Zhao, H., French, J. B., Fang, Y., & Benkovic, S. J. (2013). The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. *Chem Commun (Camb)*, 49(40), 4444-4452. doi:10.1039/c3cc41437j
- Zhao, Z., Chen, L., Dawlaty, M. M., Pan, F., Weeks, O., Zhou, Y., . . . Xu, M. (2015). Combined Loss of Tet1 and Tet2 Promotes B Cell, but Not Myeloid Malignancies, in Mice. *Cell Rep*, 13(8), 1692-1704. doi:10.1016/j.celrep.2015.10.037
- Zheng, L., Zhang, W., Zhou, Y., Li, F., Wei, H., & Peng, J. (2016). Recent Advances in Understanding Amino Acid Sensing Mechanisms that Regulate mTORC1. *Int J Mol Sci*, 17(10). doi:10.3390/ijms17101636

- Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., . . . Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527(7579), 525-530. doi:10.1038/nature16064
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., . . . Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108(8), 1167-1174. doi:10.1172/JCI13505
- Zhou, M., Duan, H., Engel, K., Xia, L., & Wang, J. (2010). Adenosine transport by plasma membrane monoamine transporter: reinvestigation and comparison with organic cations. *Drug Metab Dispos*, 38(10), 1798-1805. doi:10.1124/dmd.110.032987
- Zhou, X., Levin, E. J., Pan, Y., McCoy, J. G., Sharma, R., Kloss, B., . . . Zhou, M. (2014). Structural basis of the alternating-access mechanism in a bile acid transporter. *Nature*, 505(7484), 569-573. doi:10.1038/nature12811
- Zhu, C., Gao, Y., Guo, H., Xia, B., Song, J., Wu, X., . . . Yi, C. (2017). Single-Cell 5-Formylcytosine Landscapes of Mammalian Early Embryos and ESCs at Single-Base Resolution. *Cell Stem Cell*, 20(5), 720-731 e725. doi:10.1016/j.stem.2017.02.013
- Zhu, J., & Thompson, C. B. (2019). Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(7), 436-450. doi:10.1038/s41580-019-0123-5
- Zhu, Z., & Buolamwini, J. K. (2008). Constrained NBMPR analogue synthesis, pharmacophore mapping and 3D-QSAR modeling of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) inhibitory activity. *Bioorg Med Chem*, 16(7), 3848-3865. doi:10.1016/j.bmc.2008.01.044
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5), 299-309. doi:10.1007/s002100000309
- Zolk, O., Solbach, T. F., König, J., & Fromm, M. F. (2009). Structural determinants of inhibitor interaction with the human organic cation transporter OCT2 (SLC22A2). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379(4), 337-348. doi:10.1007/s00210-008-0369-5
- Zollner, G., Wagner, M., Fickert, P., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Zatloukal, K., . . . Trauner, M. (2005). Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 25(2), 367-379. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01033.x
- Zoulim, F. (2005). Combination of nucleoside analogues in the treatment of chronic hepatitis B virus infection: lesson from experimental models. *J Antimicrob Chemother*, 55(5), 608-611. doi:10.1093/jac/dki095
- Zuo, S., Boorstein, R. J., & Teebor, G. W. (1995). Oxidative damage to 5-methylcytosine in DNA. *Nucleic Acids Res*, 23(16), 3239-3243. doi:10.1093/nar/23.16.3239

