



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**IDENTIFICACIÓ DELS NODES GENÒMICS DE
RESPOSTA AL TRACTAMENT QUIMIOTERAPÈUTIC:
TERÀPIA COMBINADA AMB siRNA.**

ELISABET SELGA I COMA
2009

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
Programa de Doctorat de Biotecnologia
Bienni 2004-2006

**IDENTIFICACIÓ DELS NODES GENÒMICS DE
RESPOSTA AL TRACTAMENT QUIMIOTERAPÈUTIC:
TERÀPIA COMBINADA AMB siRNA.**

Memòria presentada per Elisabet Selga i Coma per optar al títol de doctor
per la universitat de Barcelona

Dr. Carles J. Ciudad Gómez

Dra. Verónica Noé Mata

Elisabet Selga i Coma

Barcelona, 2009

Donar les GRÀCIES és un senyal d'agraïment i de respecte, és un sentiment afectuós que hom té envers el qui li ha fet un bé, un servei, un favor; i també representa el que desitjaria fer-vos arribar a tots.

Al Carles, per oferir-me la oportunitat de viure l'experiència de ser part del Ciudadlab. Per les activitats enzimàtiques a les fosques i pels viatges en moto, o en cotxe-moto. Per les coincidències en els colors. Pels networks i els nodes que finalment hem trobat, després de quatre anys perseguint-los. Per les "discussions" a l'hora d'escriure els papers, que tan els han fet créixer al final. Pels consells, professionals i personals.

A la Véro, per tot el que m'has ensenyat, tan a nivell dels experiments pròpiament dits com en el treball dia a dia al laboratori. Pels comentaris crítics dels papers, i per la rapidesa amb les correccions de la tesi. Gràcies altre cop!

A les becàries del laboratori amb qui he compartit més temps. A la Cris, per la teva manera de veure les coses i per les llargues caminades per Estocolm. A la Carlota, pels moments de "bogeria transitòria", i pel Kit-Kat. A la Alicia, per totes les coses que hem compartit, dinars, discussions, i sobretot consells. Et trobo a faltar... A la Sílvia Coma, va ser genial compartir amb tu els viatges en tren, i molt formatives totes les teves ensenyances. A la Sílvia Peñuelas, per obrir la porta dels microarrays. M'hagués agradat poder intercanviar més ciència amb tu.

A les companyes i company de laboratori durant la recta final de l'escriptura d'aquesta memòria. A l'Estela i la Sara, un duet casi perfecte! Al Pau, algun dia aconseguiràs el Premi Nobel. A la Mariana, sort amb Sp. A l'Audrey, a poc a poc també s'aconsegueixen moltes coses! A la Núria, tal com em van dir a mí quan començava: ànims, el camí és dur però compensa! A tots, ara que ja he dipositat podré ajudar-vos més!

A les companyes i companys de laboratori "esporàdics". A la Isabel, per tots els estudis de la S100A4. A la Andrea i al Gerard, vam entrar casi junts al laboratori però vam prendre camins diferents. Gerard, que tot et vagi molt bé. Sempre et recordarem, Andrea.

A tota la gent que ha passat pel laboratori, antics becaris, alumnes de treball dirigit, intercanvi d'alumnes de Farmàcia... Hem set molts, però entre tots hem construït la història del Ciudadlab.

A tots els compays del departament, amb qui he compartit dinars i xerrades; i a tot el personal del departament, professors, secretaries, tècnics i personal de neteja. Gràcies per tota la ajuda que m'heu ofert, que ha estat molta!

Al Miquel Àngel Peinado i a la Cristina Morales. Ha estat una col·laboració molt enriquidora i amb un resultat perfecte, el reconeixement per la publicació.

Al Pedro Jares i a tota la gent del servei de genòmica de l'hospital Clínic, per tota l'ajuda i l'eficiència en la realització dels microarrays.

Agraïments

Al Jaume Comas, al Ricard i a la Chari, del servei de citometria. Gràcies per l'ajuda en les hores inacabables contant cèl·lules amb el citòmetre.

Al Jose Luís i a tota la gent de Leitat, ha estat una gran experiència treballar amb vosaltres. I tot el que encara tenim entre mans és molt prometedor!

Al grup de la Marta Cascante, a l'Adrià per l'intercanvi d'informació i seqüències d'siRNAs.

Al grup de la Maria Inés Roldán a la Universitat de Girona, en especial a la Marta i a la Sandra, que van seguir els meus primers passos en un laboratori.

Als meus amics. Als de Sant Joan, a la Neus, al Sergi i a l'Anna. Per tots els sopars de festa major i pels cafès per decidir la disfressa de cada any. Als de Ripoll, al Marc, al Jose i la Marta, al Joan i a la Véro, a l'Imma, als Jordis, a l'Esteve i a tots els altres. Força Ferrari! També al Carlus, per oferir-nos us lloc on reunir-nos i passar les estones. Als de la carrera, en especial a la Helen i en Pages, alias trio lalala (actualment sextet). A la Sílvia, la Mireia i la resta de companys de classe i d'experiències a Tunissia, irrepètible! I a les companyes de pis, a totes les que han anat passant, però en especial a la Cris i a la Aïda; viure amb vosaltres ha set com viure a Sant Joan. Gràcies per l'ajuda amb les imatges i amb la portada! A tots, pel vostre interès en saber a què em dedico.

A tota la meva família, als meus tiets pels sopars i pels retalls de diari relacionats amb ciència.

Als meus pares, per donar-me suport en tot el que he volgut fer. A la meva àvia.

A l'Oscar, Gràcies. Ja sé que ho saps, però m'agrada dir-t'ho: T'estimo!

*We shall not cease from exploration,
and the end of all exploring will be
to arrive where we started
and know the place for the first time.*

T.S. Eliot

ÍNDEX	1
ABREVIATURES	3
PRESENTACIÓ	7
1- INTRODUCCIÓ	11
1.1- Bases moleculars del càncer	13
1.2- DHFR i Metotrexat	15
1.2.1- El gen <i>dhfr</i> i el metabolisme de folats	15
1.2.1.1- Expressió regulada del gen <i>dhfr</i>	17
1.2.1.1.1- Els factors de transcripció Sp1 i Sp3	18
1.2.2- Metotrexat	20
1.2.2.1- Transport	20
1.2.2.2- Poliglutamació	21
1.2.2.3- Determinants en l'estructura	23
1.2.3- Resistència a quimioteràpics	24
1.2.3.1- Resistència al MTX	25
1.2.3.1.1- Prevenició de la resistència al MTX	27
1.3- Genòmica funcional	29
1.3.1- Microarrays i xips de DNA	29
1.3.1.1- Utilitat	29
1.3.1.2- Estructura i tipus	30
1.3.1.2.1- Xips d'Affymetrix	30
1.3.1.3- Validació dels resultats dels xips	32
1.3.2- RNA d'interferència	33
1.3.2.1- El mecanisme de silenciament post-transcripcional	33
1.3.2.2- Utilització d'siRNAs en teràpia gènica	35
1.3.3- Teràpia combinada amb Metotrexat	37
1.3.3.1- Les Aldo-Ceto Reductases	37
1.3.3.1.1-La Aldo-Ceto Reductasa 1C1	39
1.3.3.2- La Proteïna quinasa C alfa	40
1.3.3.3- La Caveolina 1	41
1.3.3.4- L'Enolasa 2	42
1.3.3.5- L'E-Cadherina	43
1.3.3.6- El Dikkopf homolog 1	44
1.3.3.7- Les UDP-glucuronosil transferases	45
1.3.3.8- El factor d'elongació 1 alfa 1	46
1.3.4- Mètodes per la integració dels resultats	47
1.3.4.1- Anàlisi d'agrupament	47
1.3.4.2- Mapes biològics pre-establerts i Xarxes d'associació biològica	49
2- OBJECTIUS	53

3- MATERIALS I MÈTODES	57
3.1- Materials	57
3.1.1- Línies cel·lulars	57
3.1.2- Medis de cultiu	57
3.1.3- Oligonucleòtids d'RNA d'interferència (siRNAs)	58
3.1.4- Vectors plasmídics	59
3.1.4.1- Vectors d'expressió eucariota	59
3.1.4.2- Vectors amb el gen <i>luc</i>	59
3.2- Mètodes	60
3.2.1- Generació de cèl·lules resistents al metotrexat	60
3.2.2- Extracció de l'RNA i comprovació de la qualitat	60
3.2.3- Marcatge, hibridació i escaneig	62
3.2.4- Anàlisi amb el programa GeneSpring GX v 7.3.1	63
3.2.4.1- Anàlisi bàsic	63
3.2.4.2- Comparació de llistes amb Diagrames de Venn	64
3.2.4.3- Agrupament jeràrquic	65
3.2.4.4- Mapes biològics pre-establerts	65
3.2.5- Construcció de BANs amb el programa Pathway Architect	65
3.2.5.1- Construcció bàsica	66
3.2.5.2- Sobreposició de la expressió gènica	66
3.2.6- Anàlisi integrat amb el programa GeneSpring GX v 10.0	67
3.2.6.1- Importació de les dades	67
3.2.6.2- Anàlisi de les dades	67
3.2.6.2.1- Anàlisi guiada	68
3.2.6.2.2- Anàlisi avançada	68
4- RESULTATS	71
4.1- ARTICLE I: Transcriptional regulation of aldo-keto reductase 1C1 in HT29 human colon cancer cells resistant to methotrexate: Role in the cell cycle and apoptosis	73
4.1.1- Annex a l'article I	89
4.2- ARTICLE II: Role of Caveolin 1, E-Cadherin, Enolase 2 and PKCalpha on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells	91
4.3- ARTICLE III: Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate	107
5- DISCUSSIÓ	151
6- CONCLUSIONS	165
7- BIBLIOGRAFIA	169

AICARFT	Fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferasa
AKR1C1	Aldo-ceto reductasa 1 alfa 1
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APRT	Adenosina fosforibosil transferasa
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAN	<i>Biological Association Network</i>
bp	<i>Base pair</i>
CAV1	Caveolina 1
cDNA	DNA complementari
cRNA	RNA complementari
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat Reductasa
DKK1	<i>Dkkopf homolog 1</i>
DM	<i>Double minutes</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTPs	Deoxiribonucleòtids trifosfat
dTMP	Timidina monofosfat
dUMP	Uridina monofosfat
E-CDH	E-cadherina
EDIL3	<i>EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EEF1A1	<i>Euchariotic elongation factor 1 alpha 1</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ENO2	Enolasa 2
FPGS	Folil poliglutamat sintasa
FR	<i>Folate receptor</i>
GARFT	Glicinamida ribonucleòtid formiltransferasa
GenMAPP	<i>Gene Map Annotator and Pathway Profiler</i>
GGH	γ -glutamil hidrolasa
-GHT	Sense glicina, hipoxantina ni timidina
HAPLN1	<i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>
IMP	Inosina 5'-monofosfat
KEGG	<i>Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes</i>
LEF	<i>Lymphocyte enhancer factor</i>
Luc	Luciferasa
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MRP	<i>Multidrug resistance protein</i>
MSH3	<i>mutS homolog 3 (E. coli)</i>
MTC	<i>Multiple testing correction</i>
MTX	Metotrexat
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
PBS	Tampó fosfat salí
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PKC α	Proteïna quinasa C alfa
RAP-PCR	<i>RNA-based arbitrarily primed Polimerase chain reaction</i>
RASGRF2	<i>Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2</i>
RFC	<i>Reduced folate carrier</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Àcid ribonucleic

Abreviatures

RNAi	<i>RNA interference</i>
rRNA	<i>RNA ribosomal</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
Sp	<i>Specificity Protein</i>
SSBP2	<i>single-stranded DNA binding protein 2</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
THF	<i>Tetrahidrofolat</i>
TS	<i>Timidilat sintasa</i>
UGT	<i>UDP- glucuronosil transferasa</i>
XRCC4	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4</i>
ZFYVE16	<i>Zinc finger, FYVE domain containing 16</i>

Presentació

El treball presentat en aquesta memòria es troba emmarcat en un projecte d'estudi de l'expressió gènica diferencial derivada de la resistència al metotrexat (MTX) en diferents línies cel·lulars humanes. El MTX és un inhibidor de l'enzim dihidrofolat reductasa (DHFR) utilitzat en el tractament del càncer. Malauradament, la utilització d'aquest quimioteràpic es veu compromesa per l'aparició de resistència.

S'ha proposat que l'aparició de cèl·lules resistents implica que no s'ha assolit una concentració suficient de droga per ser letal per a les cèl·lules, fet que permetria la generació de certs canvis adaptatius que donen lloc a la resistència (Bertino, 1963). La definició de les característiques biològiques de les cèl·lules tumorals resistents a drogues és important per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques (Leteurtre, 2004). L'estratègia utilitzada per identificar el conjunt complet de gens afectats pels efectes farmacològics d'un determinat tractament s'anomena farmacogenòmica. Aquesta estratègia inclou la identificació de les variacions de gens individuals, l'avaluació de les interaccions entre els seus productes i la caracterització dels fenotips derivats de la resposta a la droga (Cheok, 2006). El treball realitzat en aquesta memòria representa un estudi farmacogenòmic de la resistència al MTX.

Estudis anteriors del nostre grup de recerca van demostrar la regulació transcripcional del promotor del gen *dhfr* al llarg del cicle cel·lular (Noé, 1997), mitjançada per la unió del factor de transcripció Sp1 (Ciudad, 1992) a la caixa GC del promotor proximal (Ciudad, 1988). Posteriorment, es va determinar que les proteïnes Rb i Sp1 formaven un complex capaç d'unir-se al promotor del gen *dhfr* a través de la caixa d'unió d'Sp1, que causava un augment en l'activitat DHFR (Noé, 1998).

Complementàriament, al grup s'havia descrit que tan l'activació de la proteïna quinasa C (PKC) per TPA (un éster de forbol), com la sobreexpressió de la PKC α , causen un augment en la resistència al MTX (Noé, 1997). Ambdues accions deriven en una major activitat transcripcional del gen *dhfr*, mitjançada per Sp1 (Noé, 2001).

Presentació

En una primera aproximació per identificar mRNAs diferencialment expressats en la resistència al MTX, es va utilitzar la tècnica de RAP-PCR (*RNA-based arbitrarily primed polymerase chain reaction*). Aquesta tècnica va permetre demostrar que la subunitat II de la citocrom *c* oxidasa (COX II) estava sobreexpressada en cèl·lules tractades amb MTX, i que el tractament combinat amb un inhibidor de la seva activitat enzimàtica i MTX causava un decrement en el número de colònies resistents al quimioteràpic (Alemany, 2000).

Estudis posteriors utilitzant arrays de niló que contenien 1176 transcrits relacionats amb càncer van permetre l'estudi i la validació de gens implicats en el metabolisme de nucleòtids (IMPDH2 i IMPCH), en la reparació del DNA (Topoisomerasa I) i en l'apoptosi (survivina i vimentina). La modulació de l'expressió d'aquestes dianes va permetre sensibilitzar les cèl·lules vers el MTX (Peñuelas, 2005a; Peñuelas, 2005b).

El número de gens presents als assaigs realitzats fins a aquest moment limitava l'estudi de l'expressió gènica diferencial en la resistència al MTX. És per això que vam realitzar experiments amb microarrays que contenien 22.300 transcrits i variants, que ens va permetre identificar l'AKR1C1 com a gen sobreexpressat a les cèl·lules HT29 resistents al quimioteràpic. Vam estudiar la regulació transcripcional del gen, mitjançada principalment per Sp1, vam establir un paper per l'AKR1C1 en la resistència al MTX, i vam determinar la seva relació amb el cicle cel·lular i amb l'apoptosi (Selga, 2008a).

Posteriorment, vam realitzar experiments amb microarrays que comprenien el genoma humà complet. Aquesta aproximació, a més de corroborar la sobreexpressió de l'AKR1C1 a les cèl·lules resistents, ens va permetre identificar un conjunt de gens sobreexpressats amb localització cromosòmica propera al gen *dhfr*. Tots aquests gens estaven amplificats, probablement com a conseqüència de l'amplificació del gen *dhfr*, però no contribuïen directament a la resistència al MTX. L'estudi complementari d'altres gens diferencialment expressats en les cèl·lules resistents, anomenats CAV1, E-Cadherina, PKC α i ENO2, ens va permetre determinar un paper per a tots ells en la resistència al MTX, essent els dos primers gens diana potencials per a una teràpia coadjuvant.







També vam voler estudiar la resposta gènica associada a la resistència al MTX en altres línies cel·lulars, representatives de diferents orígens tissulars. Les anàlisis dels resultats dels microarrays de tot el genoma humà corresponents a cadascuna de les 7 línies cel·lulars estudiades ens va permetre observar que línies cel·lulars derivades d'un mateix teixit presenten patrons d'expressió similars. La construcció de xarxes d'associació biològica a partir de llistes de gens comuns diferencialment expressats en càncer de colon, en càncer de mama o entre línies cel·lulars de càncer de pàncrees, leucèmia i osteosarcoma van evidenciar gens que representaven nodes de les respectives xarxes. Les validacions funcionals d'aquests gens, anomenats DKK1, UGT1A i EEF1A1, van mostrar una sensibilització de les cèl·lules vers el MTX.

Introducci3

1.1- Bases moleculars del càncer.

El desenvolupament del càncer és el resultat de l'acumulació de múltiples alteracions genètiques. La progressió de la malaltia sol veure's condicionada per de-regulacions patofisiològiques seqüencials i coordinades, que augmenten l'expressió d'oncogens i propicien l'activació constitutiva de vies de transducció de senyals que causen un increment la proliferació i una disminució en la sensibilitat a la apoptosi, i afavoreixen la pèrdua d'adhesió. Aquests tres fenòmens donen lloc al creixement cel·lular aberrant (Aronson, 1991).

En una extensa revisió, Hanahan i Weinberg van proposar que el càncer involucrava canvis dinàmics al genoma (Hanahan, 2000). D'acord amb aquests autors, la tumorogènesi és un procés que es dona en diferents passos, que reflecteixen les alteracions genètiques necessàries per a la transformació progressiva de les cèl·lules humanes normals en malignes. Els autors també suggereixen que els genotips de totes les cèl·lules canceroses s'originen per 6 tipus d'alteracions essencials en la fisiologia cel·lular, descrites a la taula següent:

Símbol	Capacitat adquirida	Exemple de mecanisme
	Autosuficiència en senyals de creixement	Activació de l'oncogen Ras i síntesi de factors de creixement
	Insensibilitat als senyals antiproliferatius	Pèrdua de funció de pRb o p53
	Evasió de la apoptosi	Producció de factors de supervivència, inactivació de gens pro-apoptòtics i sobreexpressió de gens anti-apoptòtics
	Potencial replicatiu il·limitat	Activació de la telomerasa
	Angiogènesi sostinguda	Producció de factors angiogènics (VEGF) i inhibició d'inhibidors (trombospondina-1)
	Capacitat invasiva i metastàtica	Inactivació de la E-Cadherina i producció de proteases extracel·lulars

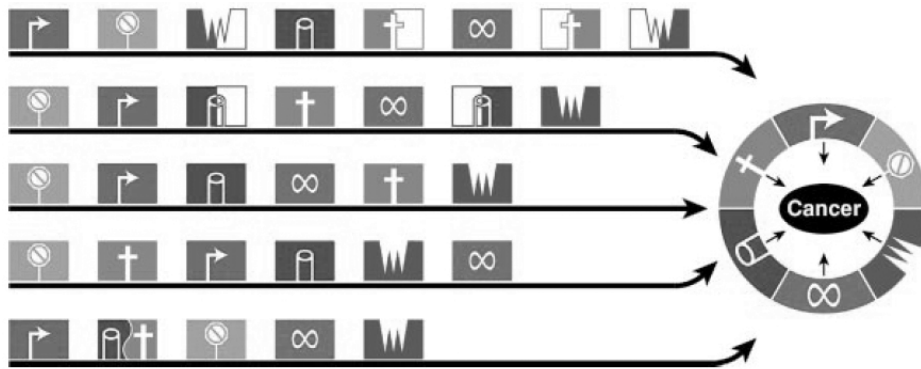
Taula 1. Relació de les capacitats que han d'adquirir les cèl·lules canceroses.

Perquè una cèl·lula adquireixi tota aquesta sèrie de capacitats, cal que el seu genoma sigui inestable. També cal que s'incrementi la seva capacitat de mutació (Loeb, 1991), a

Introducció

conseqüència d'un mal funcionament dels punts de control del cycle cel·lular (tot originant mutacions, insercions o delecions d'uns pocs nucleòtids) o a defectes en la segregació dels cromosomes durant la mitosi (tot generant alteracions en el número de cromosomes) (Lengauer, 1998). També s'han descrit tanslocacions cromosòmiques i amplificacions gèniques d'oncogens com a mecanismes per la generació d'inestabilitat genètica.

De totes maneres, la via que les cèl·lules prenen per esdevenir malignes pot variar molt. Les mutacions en oncogens i l'adquisició de capacitats biològiques pot ser primerenca en certs càncers i tardana en d'altres. A més, la seqüència particular d'adquisició de capacitats pot ser molt diferent, inclús en tumors d'un mateix tipus (Esquema 1).



Esquema 1. Exemples de variacions en l'ordre d'adquisició de les diferents capacitats. Els símbols corresponen als descrits a la taula 1.

S'ha comprovat que un cert nombre de gens de resposta primerenca són induïts per drogues, i representen els inductors de tota una sèrie d'interaccions proteïna-DNA que regulen la transcripció (Ciaccio, 1993).

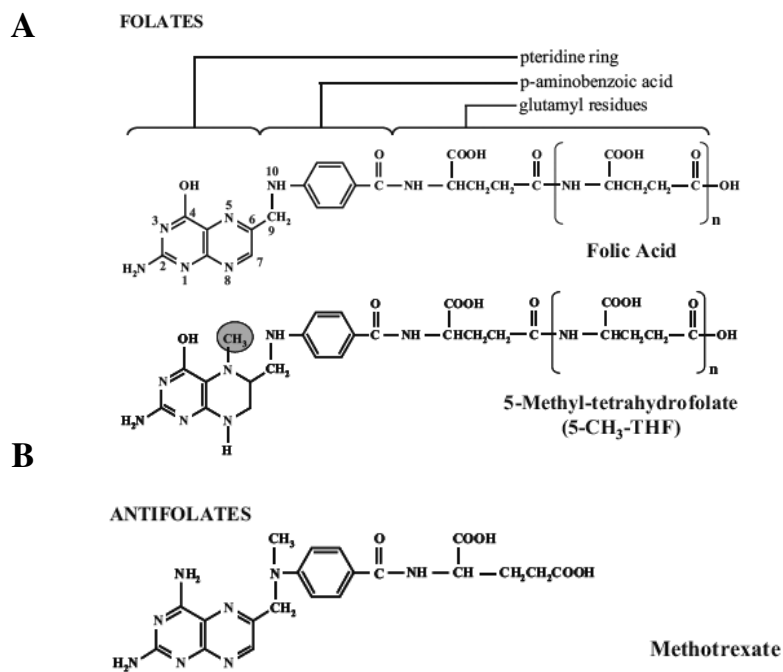
El resultat de tots els canvis descrits és la variació en els programes genètics de les cèl·lules canceroses, fet que resulta en la expressió gènica diferencial (Orian-rousseau, 2004). És per això que actualment, s'està identificant i caracteritzant la funció de gens que podrien afavorir la progressió del càncer. La modulació de les dianes cel·lulars presumptament responsables del càncer o de la resistència permetrà comprendre millor la naturalesa de la malaltia i establir règims de tractament més racionals (Liang, 1992; Ciaccio, 1993).

1.2- DHFR i Metotrexat

1.2.1- La DHFR i el metabolisme de folats

El gen de la dihidrofolat reductasa (DHFR) està localitzat al braç llarg del cromosoma cinc. El seu producte proteic és un enzim necessari pel manteniment del conjunt de folats reduïts intracel·lulars de les cèl·lules en divisió. La DHFR catalitza la reducció del dihidrofolat (DHF) a tetrahydrofolat (THF), el qual és necessari com a cofactor de diferents vies biosintètiques que impliquin transferència de grups carbonats, com pot ser la síntesi de purines i de pirimidines. La DHFR és, per tant, un enzim que participa en la replicació del DNA per a la divisió cel·lular.

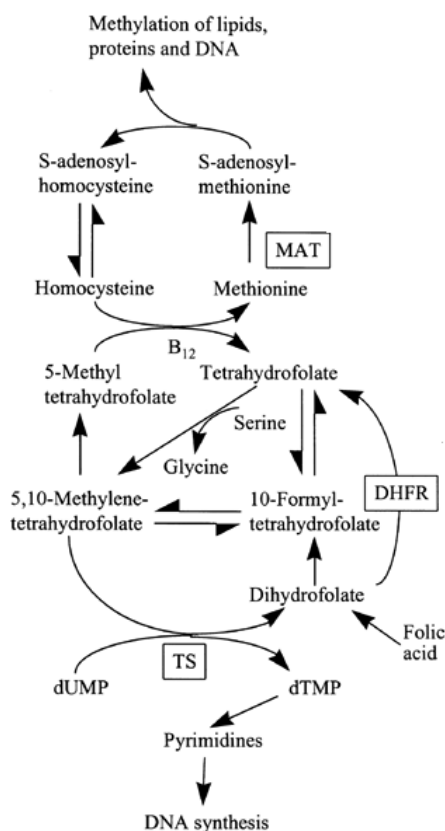
Els folats naturals estan formats per tres components estructurals: un anell de pteridina, un àcid p-aminobenzoic i un glutamat (Esquema 2a). Els antifolats també mantenen aquesta estructura, amb lleugeres variacions (Esquema 2b).



Esquema 2. Estructura dels folats (A) i del Metotrexat (B).

Introducció

El THF i els seus derivats (5,10-metilen-THF; 5-metil-THF; 5-formil-THF i 10-formil-THF) són donadors d'unitats de carboni en una sèrie de vies metabòliques interconnectades que deriven en la síntesi *de novo* de purines, timidilat i aminoàcids (glicina, serina i metionina) (Assaraf, 2007) (Esquema 3). A més de la DHFR, altres enzims estan implicats en aquest conjunt de donacions d'unitats de carboni. La timidilat sintasa (TS) catalitza la formació de timidina monofosfat (dTMP) a partir de uridina monofosfat (dUMP). La reacció suposa la transferència d'una molècula de carboni del 5,10-metilen-THF al dUMP, alliberant DHF, substrat de la DHFR. Aquesta reacció representa un pas important en el reciclatge dels derivats del THF.



Esquema 3. Principals reaccions dependents de folats. MAT, Metionina S-adenosil transferasa; DHFR, Dihidrofolat reductasa; TS, Timidilat sintasa.

Paral·lelament, existeixen altres enzims que utilitzen derivats del THF. La glicinamida ribonucleòtid formiltransferasa (GARTF) està involucrada en la síntesi de l'anell

imidazol de les purines, i la fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferasa (AICARTF) genera l'intermediari de la síntesi de purines anomenat inosina 5'-monofosfat (IMP). Ambdues reaccions utilitzen el 10-formil-THF com a donador de carbonis.

S'ha descrit que la manca de folats i de precursors de nucleòtids causa alteracions en la síntesi del DNA, ja que es bloquegen les reaccions de transferència d'àtoms de carboni. Aquest bloqueig indueix l'apoptosi en cèl·lules humanes HepG2, cèl·lules d'ovari d'hàmsster xinès, pro-eritroblasts murins i cèl·lules de càncer de colon (Novakovic, 2005). La falta de folats també s'ha relacionat amb el desenvolupament de diferents malalties, entre les que es troba el càncer de colon (Kim, 2003). Per l'altra banda, també s'ha descrit que la manca de folats actua sinèrgicament amb agents alquilants incrementant els trencaments a les cadenes del DNA i les mutacions (Branda, 2001). Així, la deficiència de folats sembla tenir un paper dual en el desenvolupament, progressió i tractament del càncer, condicionat pel seu estat de transformació.

1.2.1.1- Expressió regulada del gen *dhfr*

L'activitat DHFR és indispensable per la replicació del DNA i, per tant, està estretament lligada a la progressió del cicle cel·lular. De fet, l'activitat DHFR augmenta durant la fase S del cicle, i aquest increment és degut a un augment en els nivells de proteïna DHFR (Wiedemann, 1979; Marinai, 1981). S'ha demostrat la regulació transcripcional de la DHFR durant el cicle cel·lular, i s'ha comprovat que l'activitat transcripcional del seu promotor s'incrementa en la fase S del cicle (Noé, 1997). També s'ha demostrat que l'mRNA corresponent a la DHFR sintetitzat per cèl·lules en creixement exponencial és més estable que en cèl·lules quiescents, ja que aquest darrer presenta una cua de poli (A) més curta (Noé, 1999). Estudis posteriors van concloure que és necessària la presència d'un intró per la traducció i l'estabilitat de la proteïna DHFR (Noé, 2003).

El promotor del gen *dhfr* humà presenta diferents caixes putatives d'unió per Sp1 (caixes GC). De fet, Sp1 juga un paper molt important en la regulació transcripcional d'aquest gen. S'ha determinat que la caixa GC situada entre -48 i -43 respecte l'inici de transcripció major és crucial per a l'activitat del promotor. La delecció d'aquesta caixa

GC aboleix l'activitat transcripcional del promotor (Ciudad, 1988), i la seva mutació causa la pèrdua de la unió d'Sp1 i una reducció de l'activitat transcripcional del gen *dhfr* (Ciudad, 1992). També s'ha demostrat que Sp1 pot formar un complex amb Rb que és capaç d'estimular la transcripció del promotor de la DHFR a través de la caixa GC del promotor proximal del gen (Noé, 1998).

1.2.1.1.1- Els factors de transcripció Sp1 i Sp3

Sp1 és el primer membre d'una família de factors de transcripció amb estructura de dits de zinc que li permeten la unió a seqüències riques en GC del DNA. Aquestes caixes GC apareixen freqüentment a les regions reguladores d'un gran nombre de gens (Suske, 1999), entre ells, la *dhfr*. Així, és fàcil entendre que els membres d'aquesta família estan implicats en molts processos com la regulació del cicle cel·lular, l'activació hormonal, l'apoptosi o l'angiogènesi entre altres.

S'ha descrit la importància de l'estat de fosforilació d'Sp1 en la regulació de la fisiologia cel·lular (Chu, 2005). De fet, és la forma fosforilada d'aquest factor de transcripció la que principalment exerceix la regulació del promotor de la DHFR (Noé, 2001). S'ha demostrat que la PKC és capaç d'interaccionar, fosforilar i activar Sp1 (Pal, 1998), i s'ha suggerit que la PKC α forma part de la via que deriva en resistència al MTX (Noé, 1995) a través d'un increment en l'activitat DHFR deguda a una major unió d'Sp1 fosforilat (Noé, 2001). De totes maneres, existeix un extens espectre de quinases que poden fosforilar aquest factor de transcripció, pel que també existeix un ampli rang de vies de senyalització que transmeten senyals patofisiològics a les seves dianes a través de canvis en la fosforilació d'Sp1. Un d'aquests senyals pot ser el tractament amb drogues (Pan, 2002). La funció de les proteïnes fosfatases en el manteniment de l'estat de fosforilació d'Sp1 és tan important com la de les quinases. S'ha demostrat que les principals proteïnes fosfatases que regulen Sp1 són la PP1 i la PP2A.

Sp3 és un altre membre de la família de factors de transcripció Sp. Malgrat que inicialment es va descriure com un supressor dominant de la transcripció, Sp3 pot presentar activitat activadora o supressora dependent del context cel·lular (Grekova, 2000). S'ha proposat que és la sumoilació d'una lisina qui determina que Sp3 funcioni com a activador o com a repressor (Valin, 2007).

Tal com passa amb Sp1, Sp3 regula l'expressió de gens implicats en multitud de processos cel·lulars. Algunes de les funcions descrites per Sp3 són redundants amb altres membres de la família, però també s'han descrit funcions específiques en la diferenciació de diversos tipus cel·lulars (Bouwman, 2000). Donat que Sp1 i Sp3 són força semblants en estructura, s'expressen a tots els teixits i competeixen per els mateixos llocs d'unió *in vivo*, és la abundància relativa d'ambdós factors de transcripció el que determina la regulació gènica global (Suske, 1999).

1.2.2- Metotrexat

El metotrexat (MTX), també anomenat ametopterina, és una droga hidrofílica de tipus antifolat que inhibeix competitivament i reversiblement la DHFR, fet que afecta la síntesi *de novo* de purines i pirimidines. Per tant, el tractament amb MTX resulta en la inhibició de la síntesi del DNA i la mort cel·lular. Les cèl·lules tumorals, que proliferen sense aturar-se, són peculiarment susceptibles als efectes letals del MTX (Hryniuk, 1969), i també s'ha demostrat que la deprivació de purines causada pel MTX indueix la diferenciació cel·lular (Singh, 2006).

El metotrexat es va dissenyar fa uns 60 anys, i actualment encara s'utilitza pel tractament de malalties neoplàsiques, com limfomes, leucèmies, càncer de cap i coll o osteosarcoma, però també per a algunes malalties autoimmunes, com l'artritis reumatoide i la psoriasi, i per prevenir el rebuig després de trasplantaments (Pignatello, 2004). A més de tractaments amb MTX sol, s'han descrit règims combinats de MTX i altres drogues, com 5-fluorouracil o oxaliplatí, que s'han mostrat efectius per al tractament de diferents càncers, entre ells el de colon (Guglielmi, 2004; Sobrero, 2005; Zampino, 2006).

1.2.2.1- Transport

El mecanisme principal pel qual el MTX i altres folats entren a les cèl·lules és a través del transportador de folats reduïts (*Reduced folate carrier*, RFC; producte del gen *SLC19A1*), una glicoproteïna localitzada a la membrana plasmàtica. Mutacions al gen *SLC19A1* en cèl·lules tumorals poden donar lloc a un menor transport del MTX, el que origina resistència a la droga (veure apartat 1.2.3.1).

Un altre dels mecanismes descrits per al transport de folats és a través del transportador de folats acoblat a protons o transportador de folats en pH baix (SLC46A1 o PCFT). Aquest transportador funciona òptimament a pH àcid (5.5) i és el responsable de l'influx unidireccional de folats tan oxidats com reduïts, incloent el MTX (Sierra, 1997; Sierra, 1998; Assaraf, 1998). Degut a les seves característiques, la funció d'aquest transportador és rellevant en l'absorció de folats i antifolats a l'intestí prim. També s'ha proposat un

paper clau per a aquest transportador en l'incorporació de MTX al lumen acídic de tumors sòlids (Helmlinger, 1997; Wike-hooley, 1984).

Un altre mecanisme descrit pel transport de MTX involucra els receptors de folats (FR), glicoproteïnes de membrana que presenten alta afinitat pels folats (Elnakat, 2004; Elnakat, 2006). La incorporació de folats i antifolats per aquest sistema es dona per un mecanisme clàssic d'endocitosi mitjançada per receptor. Cal tenir en compte, però, que aquests receptors mostren un patró d'expressió restringit a certs teixits, i que la incorporació via RFC és cent vegades més ràpida que per FR.

També s'ha descrit l'eflux dependent d'ATP de l'àcid fòlic, dels derivats del THF i d'alguns antifolats hidrofílics mitjançat per alguns membres de la família de proteïnes de resistència a múltiples drogues (MRPs) (Assaraf, 2006). Les MRPs formen part de la superfamília de transportadors ABC (*ATP-binding cassette*), que acoblen l'energia de la hidròlisi d'ATP amb la translocació de diferents drogues i substrats endògens a través de les membranes biològiques (Borst, 2002). De fet, s'ha establert que MRP1 (altrament anomenada P-glicoproteïna), MRP2 i MRP3 poden transportar MTX. Encara que presenten una baixa afinitat per aquest antifolat, s'ha demostrat que la seva sobreexpressió confereix alts nivells de resistència a diferents antifolats hidrofílics (Assaraf, 2006).

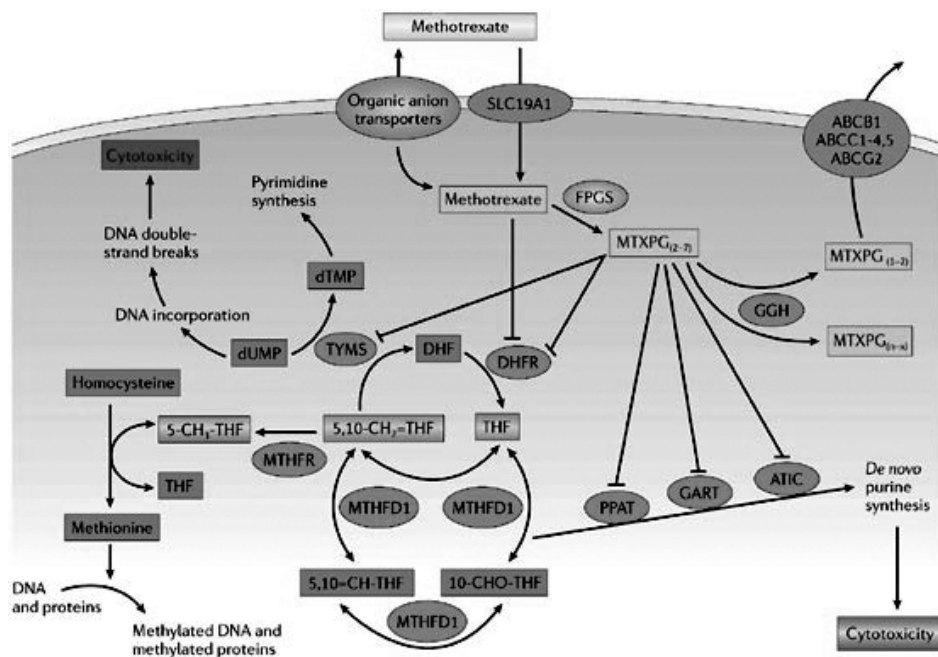
1.2.2.2- Poliglutamació

Tal com succeeix amb els folats fisiològics, el MTX és substrat de la folil poliglutamata sintasa (FPGS), que afegeix seqüencialment fins a cinc grups glutamat a la molècula de MTX. La formació de poliglutamats és un procés bioquímic amb un paper reconegut en la farmacologia molecular del MTX (Rosowsky, 1982). Les formes de MTX que contenen més de tres molècules de glutamat deixen de ser substrats del sistema de transport RFC, fet que causa l'acumulació de MTX poliglutamata dins la cèl·lula (Coran, 1976). S'ha descrit que la forma poliglutamada del MTX és fins i tot un inhibidor més potent de la síntesi de purines i pirimidines (Kimura, 2004), ja que és capaç d'inhibir sostingudament enzims dependents de THF, com són, a més de la DHFR, la timidilat sintasa (TS), la glicinamida ribonucleòtid formiltransferasa (GARFT) i la fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferasa (AICARFT) (Cheok, 2006). La inhibició

Introducció

d'aquesta gran varietat d'enzims, persistent fins i tot un cop un cop finalitzat el tractament amb el quimioteràpic (Cowan, 1984), fa que augmenti la activitat citotòxica del MTX.

L'enzim lisosomal γ -glutamil hidrolasa (GGH) presenta activitat cisteïna ecto- i/o endopeptidasa que hidrolitza les cadenes γ -poliglutamats unides als derivats del THF i als antifolats poliglutamables (Galivan, 2000; Schneider, 2006). També s'ha trobat que la metilació d'una illa CpG del promotor de la GGH humana està associada a una reducció tan dels nivells d'mRNA com de l'activitat catalítica del gen, així com també a una acumulació de MTX amb llargues cadenes de glutamat (Cheng, 2006). L'activitat d'aquest enzim en conjunt amb la FPGS permet el manteniment del balanç entre les diverses formes glutamades (Silink, 1975).



Esquema 4. Via metabòlica del metotrexat. En aquesta representació, s'utilitzen algunes abreviatures diferents a les utilitzades en el text. Així, la abreviatura utilitzada per la timidilat sintasa és TYMS, per la fosforibosilpirofosfat amidotransferasa, PPAT, per la fosforibosilglicinamida formiltransferasa, GART, i per la IMP ciclohidrolasa, ATIC.

1.2.2.3- Determinants en l'estructura

S'han realitzat diferents estudis de l'estructura del MTX, que han permès determinar que el pont C9-N10 no és important per l'activitat inhibidora del MTX (Graffner-nodberg, 2003). D'igual forma, també s'ha descrit que el canvi del grup COOH en posició gamma de la molècula per SO₃H tampoc decremента l'efecte terapèutic del MTX (Rosowsky, 1984). Pel contrari, s'ha demostrat que l'enllaç amida és un determinant estructural de l'activitat biològica del MTX: és un acceptor potencial de ponts d'hidrògen, pel que s'havia proposat la seva contribució en la unió de la droga al lloc actiu de la DHFR (Rosowsky, 1982). Posteriorment es va demostrar que aquest enllaç havia de ser capaç de girar per tal que el MTX pogués unir-se òptimament a l'enzim (Rosowsky, 2004). També s'ha proposat que aquest enllaç amida podria influenciar la unió del MTX amb els transportadors de folats de la membrana i que podria condicionar la formació de poliglutamats (Rosowsky, 1982). Paral·lelament, s'ha descrit que el grup alfa carboxil del MTX és el responsable de la unió al centre actiu de la folilpoliglutamata sintasa (Rosowsky, 1988).

1.2.3- Resistència a quimioteràpics

La resistència a múltiples drogues anticanceroses (*Multidrug resistance*, MDR), tan inherent (propietat innata de les cèl·lules tumorals) com adquirida (deguda a l'exposició a la droga), és un problema important en el tractament quimioterapèutic de carcinomes de colon, de ronyó i de mama, així com de leucèmies, mieloma múltiple i càncers pediàtrics entre d'altres (Sharom, 1997). S'han investigat molts mecanismes de resistència fins ara i cal tenir en compte que la resistència adquirida a drogues anticanceroses és un esdeveniment multifactorial en el qual diversos mecanismes estan activats simultàniament.

La MDR clàssica és el resultat, almenys en part, de la sobreexpressió de la P-glicoproteïna (el producte del gen *mdr1*) i d'altres proteïnes de resistència múltiple (*Multidrug resistance protein*, MRP), les quals actuen decremantant la concentració intracel·lular de droga a través del seu eflux dependent d'ATP cap a l'exterior de la cèl·lula. De fet, la P-glicoproteïna és una translocasa dependent d'ATP de la superfamília de transportadors ABC, que presenta una especificitat molt àmplia per substrats hidrofòbics. La P-glicoproteïna es troba en alguns teixits humans normals, on es creu que fa la funció de protecció enfront de productes naturals que són tòxics per a la cèl·lula. També s'ha descrit la seva capacitat per transportar una gran varietat de drogues quimioterapèutiques (Sharom, 1997), entre elles el MTX.

El desenvolupament de MDR no clàssica està generalment associada a alteracions en els nivells i/o activitat de la topoisomerasa II i la sobreexpressió d'enzims detoxificadors de drogues, com per exemple la glutatíon S-transferasa, UDP-glucuronosil transferases, aldehid deshidrogenases i aldo-ceto reductases (Ax, 2000; Inoue 1993). Cal tenir en compte, però, que la inducció d'enzims inactivadors de drogues pot veure's emmascarada per una activació de l'eflux de la droga via MDR i MRP.

1.2.3.1- Resistència al metotrexat

La utilització del MTX en la quimioteràpia del càncer està limitada per l'aparició de resistència (Hryniuk, 1969). En cèl·lules animals en cultiu, la resistència es pot desenvolupar per un dels cinc mecanismes diferents que es descriuen a continuació, o per combinació d'alguns d'ells (Sharma, 1991).

A) **Transport deficient del MTX** cap a l'interior de la cèl·lula. Cal citar que el transport defectiu d'antifolats s'ha correlacionat àmpliament amb la infraexpressió del gen *SLC19A1* humà en leucèmia, osteosarcoma, limfomes i càncer colorectal (Wetgren, 2005; Gorlick, 1997; Zhang, 1998; Guo, 1999; Belkov, 1999; Ferreri, 2004), a vegades deguda a la pèrdua o delecció del *locus SLC19A1*, (Kaufman, 2006; Zhao, 2004; Ding, 2001) que codifica pel transportador de folats reduïts (RFC). La disminució en els nivells de proteïna RFC s'ha observat en diferents línies cel·lulars resistents a antifolats (Rothem, 2002; Kobayashi, 1998; Ma, 2000; Worm, 2001; Rothem, 2003). També s'han descrit mutacions d'aquest transportador que alteren la seva funció, ja sigui modulant la seva afinitat vers els folats i els antifolats o pertorbant la seva activitat translocadora. Aquest tipus de mutacions inactivadores representen un mecanisme freqüent de resistència a antifolats hidrofílics que utilitzen el transportador RFC com a principal via per entrar a les cèl·lules tumorals, tan humanes com de ratolí (Rothem, 2002; Kaufman, 2006; Roy, 1998). També s'ha descrit el possible silenciament transcripcional d'RFC degut a la pèrdua de funció dels factors de transcripció que regulen la seva expressió en condicions fisiològiques normals, com per exemple Sp1 (Whetstone, 2002; Liu, 2004; Liu, 2006).

B) **Increment del fenotip MDR.** S'ha descrit que l'exposició a concentracions molt altes de MTX pot afectar a la P-glicoproteïna, donant lloc a resistència a altres drogues (Assaraf, 1989). També ha estat descrit que la sobreexpressió de diferents membres de la família MRP (catalitzadors de l'eflux de MTX) confereix resistència a antifolats. Malgrat tot, no s'ha descrit la sobreexpressió de cap membre MRP en línies cel·lulars seleccionades amb antifolats (Assaraf, 2007).

C) **Amplificació del gen *dhfr*,** descrita tan en cèl·lules humanes (Alt, 1978; Srimatkandada, 1983) com murines (Schimke, 1978) i d'hàmsster xinès (Noé, 1994).

Introducció

S'ha proposat que l'augment en el número de còpies del gen *dhfr* es pot originar per intercanvis desiguals en les cromàtides germanes, tot generant regions cromosòmiques estables de tinció homogènia (*homogeneously staining regions*, HSR). El procés de multiplicació gènica pot estar promogut per les seqüències flanquejants. També s'ha descrit la generació de còpies extracromosòmiques del gen, conegudes com a diminuts dobles (de l'angès *double minutes*, DM), que normalment es perden en les cèl·lules filles per manca de centòmer. Altres estudis proposen una relació directa entre la mutació de *p53* i la amplificació de la *dhfr* (Livingstone, 1992).

D) **Mutacions al gen *dhfr*** en cèl·lules resistents al MTX (Haber, 1981; Srimatkandada, 1989). Aquestes mutacions fan que disminueixi la afinitat de la proteïna DHFR pel MTX, pel que la inhibició de l'enzim és menor i, per tant, s'afavoreix la resistència. Tot i que s'han descrit mutacions del gen *dhfr* en línies cel·lulars tumorals resistents a MTX, sembla que aquestes no són el mecanisme principal de resistència adquirida en pacients exposats al MTX (Spencer, 1996).

E) **Disminució de la poliglutamació del MTX**, que és el mecanisme fisiològic que reté els folats i els seus antagonistes dins de la cèl·lula. La manca de poliglutamació fa que sigui necessària la exposició a nivells més elevats de MTX per tal d'aconseguir nivells intracel·lulars de droga comparables als de cèl·lules amb capacitat de poliglutamació (Cowan, 1984). L'habilitat per formar MTX amb cadenes llargues de poliglutamats correlaciona amb el resultat terapèutic del tractament amb MTX (Sinold, 1994; Barredo, 2004). També s'han descrit disminucions en la poliglutamació d'antifolats en cèl·lules tumorals resistents al MTX (Liani, 2003; Mauritz, 2002; McCloskey, 1991).

La disminució en l'acumulació de MTX poliglutamats pot ser deguda a una menor activitat de la Folil poliglutamats sintasa (FPGS) o a una major activitat de la γ -glutamil hidrolasa (GGH). Múltiples línies cel·lulars tumorals resistents a antifolats mostren una supressió de la activitat FPGS, provablement deguda a alteracions post-transcripcionals (Roy, 1997). També s'han detectat mutacions de FPGS, encara que no representen un mecanisme freqüent de pèrdua de funció del gen. Complementàriament, existeixen estudis preclínic que demostren que la resistència al MTX inherent en

diferents línies cel·lulars de sarcoma és deguda a un increment en l'activitat GGH (Li, 1993).

Per altra banda, també s'ha proposat que la pèrdua de la forma funcional de la proteïna retinoblastoma (pRb) pot contribuir a la resistència a antimetabolits. pRb fosforilat deixa de ser funcional i allibera el factor de transcripció E2F, que un cop lliure és capaç d'activar la transcripció d'enzims relacionats amb la proliferació cel·lular, entre els quals es troben la DHFR i la TS (Banerjee, 2002).

Existeixen publicacions que han intentat determinar la **seqüència d'esdeveniments en la generació de resistència al MTX**. S'ha descrit que en un primer pas de selecció amb MTX, les cèl·lules solen presentar una menor incorporació del MTX. En els passos següents poden entrar majors concentracions de MTX a les cèl·lules per processos independents de transportador (p.ex. difusió), pel que es requereix una sobreproducció de la DHFR (en certs casos per amplificació gènica) per tal d'aconseguir uns nivells majors de resistència (Sharma, 1991). La resistència a una baixa concentració de MTX en fibroblasts murins s'ha atribuït a una multiplicació selectiva de la DHFR. La incubació amb concentracions majors de MTX causava un augment en la quantitat de DHFR amb baixa afinitat pel MTX (Haber, 1981).

1.2.3.1.1- Prevenció de la resistència al MTX

S'han proposat diferents aproximacions per tal d'evitar la resistència al MTX.

A) Incidir sobre els nivells dels transportadors que mitjancen la incorporació de MTX cap a dins la cèl·lula. Assaigs preclínic suggereixen que la resistència adquirida als antifolats de diversos tumors humans podria ser revertida per co-tractaments amb anàlegs de cAMP i cGMP, que permetrien recuperar la transcripció d'RFC tot modulant els factors de transcripció que regulen el gen (Rothem, 2004; Stark, 2006). També s'han proposat estratègies basades en sobreexpressar el receptor de folats (FR) com a nova teràpia combinada amb antifolats.

Introducció

B) Modificar els grups carboxil lliures de la part glutàmica de la molècula de MTX per tal de reduir la polaritat total de la droga, permetent així la penetració passiva a través de la membrana cel·lular (Rahman, 1988). La combinació terapèutica del MTX amb aquests derivats lipofílics podria prevenir el desenvolupament de resistència a la droga originada per problemes de transport (Pignatello, 2004). De fet, assaigs amb antifolats lipofílics van demostrar la seva efectivitat fins que les cèl·lules van amplificar la DHFR (Assaraf, 1989).

C) Identificar gens addicionals associats a la resposta alterada a drogues. Aquest procés aporta coneixement al mecanisme de la resistència adquirida (Cheok, 2006) i permet el disseny de teràpies combinades amb MTX. Aquesta aproximació és la que s'ha desenvolupat en aquesta tesi.

1.3- Genòmica funcional

1.3.1- Microarrays i xips de DNA

1.3.1.1- Utilitat

La seqüenciació del genoma humà va suposar un repte encara major: l'assignació de funció a cadascun dels gens identificats, tan en condicions normals com patològiques. L'aparició dels microarrays està facilitant aquest procés, ja que permet la mesura simultània dels nivells d'expressió de milers de gens. D'aquesta manera s'obtenen perfils d'expressió gènica associats a cadascuna de les condicions assajades. Després d'aplicar tota una sèrie de criteris d'inclusió o exclusió, s'obtenen llistes de candidats que compleixen unes característiques prèviament determinades per l'investigador.

Els microarrays han contribuït a la classificació de malalties i a l'assignació de mostres de pacients a una classe tumoral coneguda, han revelat alteracions en vies moleculars relacionades amb patologies, han ajudat a la predicció de la progressió clínica i han contribuït a la identificació de noves dianes farmacològiques de drogues. Els microarrays de DNA s'apliquen en el procés de descobriment de dianes terapèutiques, en l'optimització d'aquestes dianes i en la seva validació clínica (Gerhold, 2002).

Els primers arrays es van construir unint cDNAs a paper de filtre. La utilització de microarrays per l'establiment de patrons d'expressió es va descriure l'any 1995 (Schen, 1995), i el primer microarray que contenia un genoma eucariota complet (el de *Saccharomyces cerevisiae*) data del 1997 (Deval, 1997).

Apart dels microarrays, existeixen altres tècniques que permeten la determinació dels nivells d'mRNA a escala global, per comparació dels patrons d'expressió gènica diferencial de milers de gens en un sol experiment. La tècnica més comuna és el SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*; Velculescu, 1995), encara que també s'ha utilitzat el *differential display* (Hedge, 2000). Ambdues tècniques permeten obtenir perfils transcripcionals rics en dades que es poden utilitzar per completar el coneixement de la funció gènica, així com de la seva regulació i de les seves interaccions (Quackenbush, 2001). Malgrat el potencial del SAGE i del *differential display*, els microarrays representen una de les eines de genòmica funcional més utilitzades actualment.

Existeixen bases de dades on es poden dipositar els resultats obtinguts amb diferents tècniques d'obtenció de dades a gran escala (*high-throughput*), incloent microarrays que mesurin mRNA, miRNA o DNA genòmic, com també resultats obtinguts amb SAGE, perfils peptídics obtinguts per espectrometria de masses o altres tipus de dades de quantificació de seqüències. Una d'aquestes bases de dades és el *Gene Expression Omnibus* (GEO), dependent de l'NCBI.

1.3.1.2- Estructura i tipus

En termes generals, un microarray és un suport de vidre sobre el qual s'han immobilitzat, en una localització determinada i coneguda, molècules de DNA de cadena senzilla. Un array pot contenir desenes de milers de molècules de DNA, cadascuna representativa d'un gen concret (Brazma, 2001).

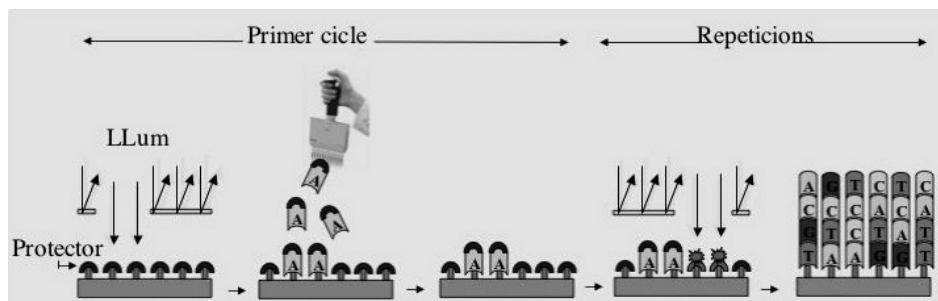
Cal distingir entre els microarrays i els xips de DNA, ambdós es basen en el mateix principi però divergeixen en el mètode d'addició de les sondes al suport. Per generar un microarray cal amplificar cada seqüència de DNA mitjançant PCR per generar tota una sèrie de sondes que posteriorment se situen en llocs concrets del suport mitjançant un robot. En canvi, als xips de DNA els oligonucleòtids es sintetitzen directament sobre el suport amb tècniques fotolitogràfiques, emprades bàsicament per la casa comercial Affymetrix.

A més dels microarrays o xips comercials, també es poden dissenyar microarrays que incloguin una selecció àmplia no esbiaixada de gens, que fins i tot pot comprendre sondes per gens de funció desconeguda. D'altra banda, també es poden dissenyar microarrays enriquits en gens rellevants en una disciplina particular, que s'utilitzaran per testar una hipòtesi preconcebuda (Pennie, 2000). En qualsevol dels dos casos, cal sintetitzar els oligonucleòtids per PCR i unir-los al suport al seu lloc corresponent.

1.3.1.2.1- Xips d'Affymetrix

La casa comercial Affymetrix utilitza la tècnica de la fotolitografia com a base per sintetitzar els seus xips. Aquesta tècnica permet la síntesi *in situ* d'oligonucleòtids complementaris a cadascun dels gens que inclourà el xip. S'utilitza una màscara que

determina el lloc on s'han d'unir els primers nucleòtids. L'aplicació de llum elimina el protector fotosensible dels punts on no hi ha màscara, i permet la unió del nucleòtid en aquests llocs desprotegits. El nucleòtid afegit també porta un grup protector que fa possible repetir el cicle d'unió de nucleòtids a llocs concrets del suport. Així, en els cicles següents, s'utilitzen màscares específiques segons la localització del següent nucleòtid que s'hagi d'incorporar, i es va repetint el procés fins a obtenir sondes de 25 nucleòtids de longitud corresponents la seqüència de cadascun dels gens del xip (veure esquema 5).



Esquema 5. Representació de la seqüència de passos per a la síntesi dels xips d'Affymetrix.

La tecnologia d'Affymetrix utilitza onze parelles de sondes oligonucleotídiques de seqüència diferent per a cada gen que ha de ser analitzat, fet que proporciona mesures múltiples i independents de cada gen, permetent així l'obtenció de resultats més acurats, reproduïbles i fiables. Cada parella està formada per un oligonucleòtid de seqüència complementària a un gen particular i el mateix oligonucleòtid però amb bases desaparellades. Aquesta característica permet la estimació d'unions inespecífiques, i s'utilitza per corregir els resultats d'hibridació en les primeres anàlisis, que es realitzen utilitzant el programa d'Affymetrix Microarray Suite (MAS) 5.0.

Els xips també inclouen un conjunt de gens de manteniment que s'expressen constitutivament i que faciliten la normalització dels experiments prèvia a l'anàlisi de les dades.

Els xips d'Affymetrix presenten l'avantatge que permeten la comparació de resultats entre laboratoris. Però tenen l'inconvenient de la manca d'informació sobre la seqüència de les sondes utilitzades per representar un gen concret, fet que força a l'usuari a confiar en les anotacions que proporciona el fabricant.

1.3.1.3- Validació dels resultats dels xips

Degut al grau de variació entre dades de microarrays, és essencial validar els resultats de manera independent. Tot i que les validacions es poden realitzar utilitzant microarrays, normalment es duen a terme assaigs de *northern blotting* o de RT-PCR en temps real per tal de confirmar les troballes interessants dels microarrays.

Les hipòtesis generades a partir dels microarrays requereixen d'estudis convencionals per relacionar gens o vies a la patologia estudiada (Grehold, 2002). És per això que resulta interessant realitzar validacions funcionals dels gens d'estudi. En sistemes de cultiu cel·lular, la sobreexpressió o la supressió de l'expressió de gens candidats a diana terapèutica representen mètodes adequats per tal d'identificar la seva funció biològica. L'RNA d'interferència representa una aproximació prometedora a l'hora de silenciar gens, ja que facilita la supressió rutinària de l'expressió gènica amb una alta eficiència en cèl·lules vives (Hannon, 2002).

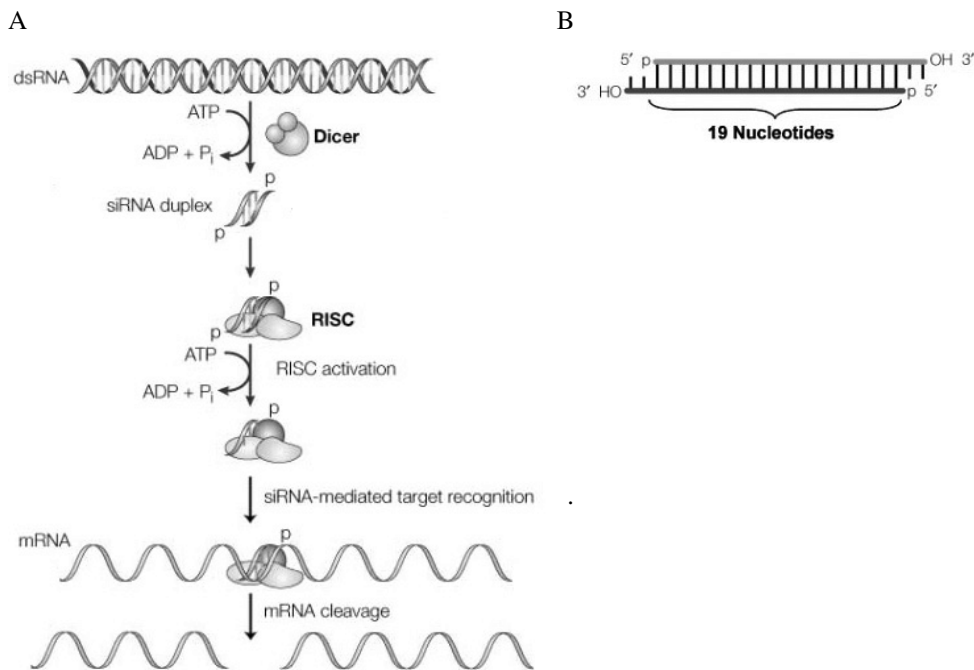
1.3.2- RNA d'interferència

El mecanisme d'RNA d'interferència (RNAi), altrament anomenat silenciament gènic post-transcripcional, representa una resposta biològica conservada dirigida contra molècules d'RNA de doble cadena. Aquest procés està principalment implicat en la regulació natural de l'expressió de gens codificants. També s'ha descrit la seva activitat sobre àcids nucleics endògens parasitaris i exògens patogènics.

El procés d'RNAi ha estat descrit en una gran varietat d'organismes, des d'unicel·lulars fins a metazous, incloent *Drosophila*, *C. Elegans* i mamífers. Els primers estudis, realitzats en *C. Elegans*, indicaven que el silenciament induït per RNA de doble cadena era operatiu a nivell post-transcripcional (Fire, 1998). Aquestes conclusions es basaven en el fet que l'exposició a RNA de doble cadena resultava en la pèrdua dels corresponents RNAs missatgers (mRNAs), i que les seqüències promotores i intròniques no eren dianes de silenciament efectives. El fet que la reducció en el nombre d'mRNAs no suposava una reducció en la taxa de transcripció també recolzava l'idea d'un mecanisme post-transcripcional.

1.3.2.1- El mecanisme de silenciament post-transcripcional

L'interferència s'inicia amb Dicer, un enzim conservat evolutivament de la família de les ribonucleases III, que reconeix RNAs llargs de doble cadena procedents de transposons, virus o seqüències genòmiques (incloent microRNAs), i els talla específicament en RNAs petits d'interferència (siRNAs) d'uns 21 nucleòtids de longitud. S'ha comprovat que l'estructura de dúplex amb dos nucleòtids no aparellats a 3' i amb fosfats en 5' dels siRNAs (Esquema 6b) és important pel seu processament. Només els siRNAs que tinguin aquesta estructura podran ser incorporats a RISC (*RNA-induced silencing complex*), un complex proteic amb activitat nucleasa que reconeix i destrueix els mRNAs diana. De fet, és la seqüència de la cadena antisentit de l'siRNA la que s'incorpora a RISC i serveix de guia per la selecció del substrat a degradar. La unió amb la diana es dona per interaccions Watson-Crick, que permeten un alt grau d'especificitat. El trencament és aparentment endonucleolític, i es dona solament a les regions homòlogues a l'siRNA.



Esquema 6. (A) Mecanisme d'RNAi; (B) Estructura d'un siRNA.

Estudis de Elbashir i col·laboradors (Elbashir, 2001) van demostrar que ambdues cadenes de l'siRNA poden dirigir el silenciament. Posteriorment, es va suggerir que la cadena que era incorporada a RISC era sempre la que presentava un extrem 5' menys unit a la seva complementària i que, per tant, era més propensa a alliberar-se del duplex (Schwarz, 2003); posteriorment, la cadena no incorporada és degradada. Independentment de la cadena que dirigeixi el silenciament, la estructura de duplex és necessària, ja que els siRNAs de doble cadena són molt més efectius a l'hora de produir l'interferència que qualsevol de les dues cadenes individualment (Fire, 1998).

Tot i que el mecanisme de silenciament post-transcripcional és el més acceptat, en plantes s'ha descrit que el silenciament induït per RNA de doble cadena pot afavorir la metilació de seqüències homòlogues a la seqüència diana, tot produint el silenciament transcricional si aquesta seqüència es localitza en una regió promotora (Mette, 2000). També s'ha suggerit que la maquinària d'RNAi pot interferir en l'expressió gènica tot

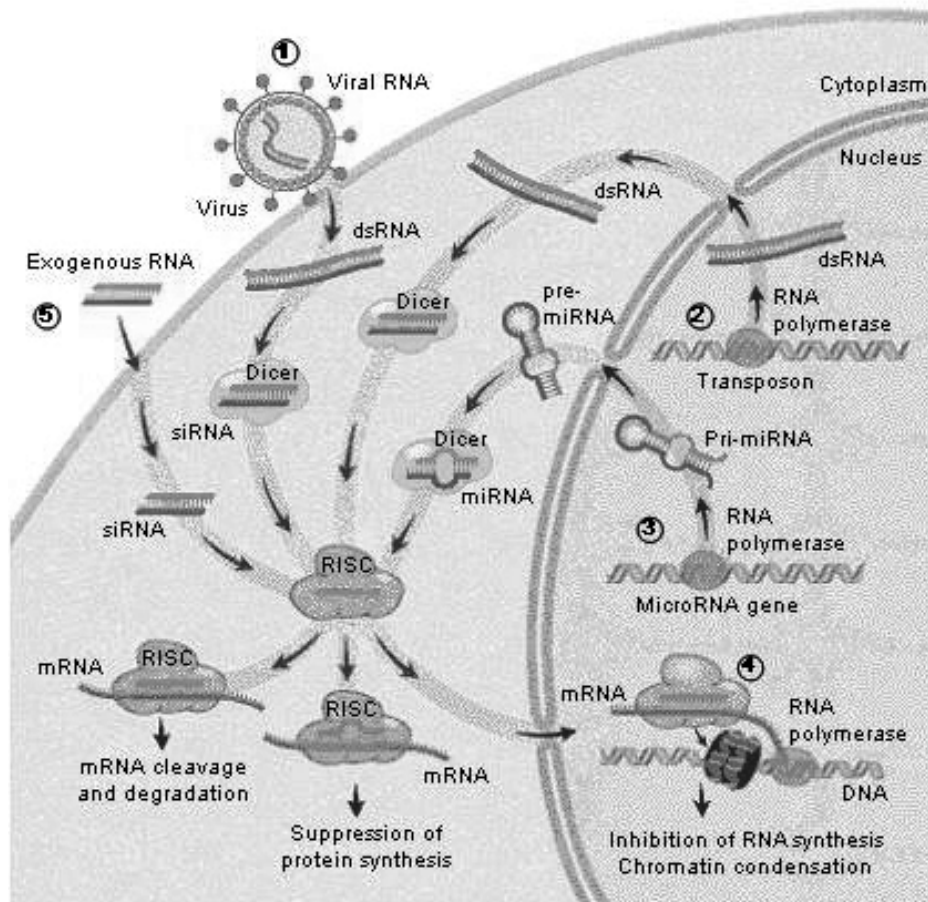
afectant l'estructura de la cromatina en *Drosophila*, *C. Elegans* i fongs (Pal-Bhadra, 1997).

1.3.2.2- Utilització d'siRNAs en teràpia gènica

Paral·lelament a la seva funció cel·lular natural, l'RNAi suposa un mecanisme per manipular l'expressió gènica experimentalment. La seqüenciació del genoma humà va donar un gran impuls a les estratègies que utilitzaven àcids nuclèics amb seqüències complementàries a gens diana específics. Aquestes estratègies permeten demostrar la funció d'un gen particular i presenten potencials aplicacions terapèutiques.

Les molècules de doble cadena de l'RNA d'interferència (siRNAs) són uns silenciadors molt més estables i potents que els oligonucleòtids antisentit (cadena senzilles clàssicament utilitzades en teràpia gènica). A més, són efectius a concentracions molt més baixes que els RNAs antisentit o els ribozims. Actualment es poden dissenyar siRNAs tot emprant programes bioinformàtics específics, que es sintetitzen químicament, i que imiten els productes de Dicer. Així, un cop transfectades dins les cèl·lules, aquestes molècules són incorporades a RISC i activen la degradació de les seves dianes (Esquema 7).

L'inhibició de gens que contribueixen a la progressió tumoral ha estat la finalitat principal de les estratègies basades en teràpia dirigida, amb l'expectativa que aquesta aproximació causés l'inhibició selectiva del creixement tumoral amb els mínims efectes adversos sobre les cèl·lules normals. Nombrosos estudis han demostrat el potencial clínic dels siRNAs, capaços d'inhibir selectivament l'expressió de gens involucrats en diferents patologies, entre elles infeccions virals, desordres neurodegeneratius i càncer (Devi,2006).



Esquema 7. Processos cel·lulars dependents de la maquinària de l'RNAi. Els complexos Dicer i RISC juguen un paper central en la destrucció d'RNA viral exògen (1), en la eliminació de transcrits provinents de DNA repetitiu i d'elements mòbils com els transposons (2), en el bloqueig de la síntesi proteica mitjançada per miRNAs generats endògenament (3), i en la supressió de la transcripció mitjançada per RNAi (4). La mateixa maquinària s'utilitza quan s'introdueixen siRNAs a la cèl·lula per tal de inhibir la activitat de gens específics experimentalment (5).

1.3.3- Teràpia combinada amb Metotrexat

L'expressió "teràpia combinada" es refereix, en sentit àmpli, a l'administració de dos o més medicacions per tractar una sola malaltia. La teràpia combinada pot semblar més costosa que la monoteràpia, però a la llarga augmenta l'èxit dels tractaments i retarda el desenvolupament de resistència.

El disseny de teràpies combinades amb MTX podria ajudar a evitar l'aparició de resistència al quimioteràpic. Amb aquesta finalitat, s'han estudiat els gens descrits a continuació, diferencialment expressats a les cèl·lules resistents al MTX, i que, per tant, representen bones dianes potencials per a teràpies combinades amb MTX.

1.3.3.1- Les Aldo-Ceto Reductases

Els aldehids i les cetones són compostos perjudicials per les cèl·lules, ja que poden reaccionar covalentment amb els grups amino i tiol de les proteïnes (Stadtman, 1997). A més, alguns aldehids són mutagènics, ja que poden interaccionar amb el DNA (Henle, 1997). A la cèl·lula existeixen diferents famílies d'enzims detoxificadors que protegeixen d'aquest tipus de compostos: les aldehyd oxidases i deshidrogenases, les alcohol deshidrogenases, la glutatió S-transferasa i les aldo-ceto reductases (AKRs) (O'connor, 1999).

Les AKRs són una superfamília d'oxido-reductases dependents de NAD(P)H que poden jugar molts papers fisiològics en una gran varietat d'organismes, des de procariotes fins a l'home (Jez, 2001). Tots els membres de la superfamília són proteïnes monomèriques amb estructura de barril (α/β)₈, d'uns 320 aminoàcids de longitud i localització citoplasmàtica, que presenten un tètrade catalític conservat compost per una tirosina, una lisina, un aspartat i una histidina.

Aquests enzims presenten activitat enzimàtica sobre una gran varietat de molècules, i poden catalitzar tan l'activació com la inactivació d'alguns xenobiòtics (Smithgall, 1988), drogues i carcinògens, pel que poden ser considerats enzims de metabolisme de fase I. L'especificitat de substrat vé determinada per variacions en l'extrem C-terminal de l'estructura (Zhong, 1998).

Introducció

El mecanisme cinètic que regeix l'activitat enzimàtica de les AKRs és un mecanisme ordenat bi-bi, en el qual el cofactor és el primer d'unir-se a l'enzim, i l'últim en alliberar-se (Penning, 2001). Les estructures dels complexos binaris (enzim-cofactor) i ternaris (enzim-cofactor-substrat) van revelar que el cofactor es situa perpendicularment al substrat, i que tenen lloc canvis conformacionals significatius durant la unió seqüencial del substrat, que determinen la velocitat de reacció (Penning, 2003).

La majoria de les AKRs de mamífer comparteixen més del 40% d'identitat de seqüència, pel qual estan agrupades com a membres de la família AKR1. Dins d'aquesta gran família, existeixen subfamílies amb característiques distintives.

Les AKR1A, o aldehid reductases, catalitzen preferentment la reducció dependent de NADPH d'aldehids, tan alifàtics com aromàtics, i amines biogèniques. Presenten un tret estructural molt característic: una inserció de 9 residus que determina una especificitat de substrat i d'inhibidor pròpies (Barski, 1996).

Les AKR1B, també anomenades aldosa reductases, catalitzen la reducció dependent de NADPH d'aldopentoses i aldohexoses. S'han publicat diferents treballs que proposen per les AKR1B una funció lligada al control de la proliferació cel·lular (Ramana, 2002; Ramana, 2003).

Les AKR1D, o esteroïd 5 β -reductases, utilitzen com a substrat intermediaris d'àcids biliars i hormones esteroïdees, com el cortisol i la testosterona, però no progesterona ni androstenodiona (Kondo, 1994).

Les AKR1C, conegudes també com dihidrodiol deshidrogenases (DD), poden catalitzar la oxido-reducció dels dihidrodiols dels hidrocarbons policíclics aromàtics, de les hormones esteroïdees i d'àcids biliars (Penning, 1996). En humans existeixen 4 isoenzims, que comparteixen el 84% d'identitat de seqüència, però diferent especificitat de substrat i distribució tissular, característiques que condicionen el paper metabòlic de cada isoforma. S'anomenen AKR1C1 (també DD1 o 20 α (3 α)-hidroxiesteroïd deshidrogenasa), AKR1C2 (DD2, 3 α -hidroxiesteroïd deshidrogenasa de tipus III o proteïna d'unió a àcids biliars), AKR1C3 (3 α (17 β)-hidroxiesteroïd deshidrogenasa de

tipus II) i AKR1C4 (DD4 o 3 α -hidroxiesteroid deshidrogenasa de tipus I). La nomenclatura de la superfamília AKR es pot consultar a la pàgina www.med.upenn.edu/akr. Tots quatre membres es localitzen al cromosoma 10p14, fet que suggereix un procés evolutiu per duplicació gènica. De fet, l'AKR1C1 i l'AKR1C2 només difereixen en 7 aminoàcids de la seva seqüència.

S'ha proposat que la funció principal de l'AKR1C4, bàsicament expressada en fetge, és la protecció contra excessos d'hormones esteroidees circulants (Penning, 2000). L'AKR1C3 és idèntica a la prostaglandina F sintasa (Suzuki-yamamoto, 1999), i és capaç de catalitzar la reducció de la prostaglandina (PG) D2, de la PGH2 i de la fenantrenequinona, i la oxidació del 9 α , 11 β -PGF2 a PGD2. S'ha proposat que pot controlar el creixement i/o la diferenciació cel·lular. L'AKR1C2 és idèntica a la proteïna humana d'unió a àcids biliars, i aquests compostos inhibeixen la seva activitat enzimàtica (Hara, 1996). Aquesta isoforma està sobreexpressada en mostres de càncer de pròstata (Rizner, 2003).

1.3.3.1.1- L'Aldo-Ceto Reductasa 1C1

Aquest enzim catalitza el pas de progesterona a la seva forma inactiva 20 α -hidroxi-progesterona. Malgrat que s'ha descrit un paper en la finalització de l'embaràs en rates i conills, la funció de l'AKR1C1 en humans no està massa definida (Zhang, 2000). De totes maneres, l'AKR1C1 converteix hidrocarbons policíclics aromàtics en catecol al fetge de manera natural (Vogel, 1980). També és capaç de metabolitzar àcid etacrínic i 4-hidroxinonal (Ciaccio, 1993; Burczynski, 2001) i s'ha descrit l'activació de la AKR1C1 per t-butylhidroquinona, àcid etacrínic (Ciaccio, 1994) i etanol (O'connor, 1997) en cèl·lules HT29. De fet, l'AKR1C1 pot ser induïda en cèl·lules HepG2 (Burczynski, 1999).

L'AKR1C1 està infraexpressada en mostres de càncer de mama respecte a teixits normals (Ji, 2004; Lewis, 2004) i també presenta una menor expressió en línies tumorogèniques de mama, com MCF-7, que en línies no tumorogèniques (Wiebe, 2003). El mateix cas es dona en mostres de càncer d'ovari (Ji, 2005). Tot i així, s'ha descrit la seva sobreexpressió en línies cel·lulars de càncer de mama positives per HER-

Introducció

2/neu (Zhang, 2005), en càncer d'endometri (Rizner, 2005) i en pacients amb ESCC (*esophageal squamous cell carcinoma*), on els nivells d'expressió d'AKR1C1 es correlacionaven amb el número de nodes limfàtics metastàsics, amb l'estadi tumoral, amb la recurrència i la supervivència dels pacients (Wang, 2004).

La correlació directa entre els nivells d'expressió d'AKR1C1 i la resistència a drogues, concretament a àcid etacrínic, va ser descrita per primer cop per Ciaccio i col·laboradors (Ciaccio, 1994; Ciaccio 1994b). Posteriorment, s'ha demostrat la sobreexpressió de la AKR1C1 en cèl·lules HT29 resistents a àcid etacrínic (Shen, 1997) i s'ha comprovat que la sobreexpressió de la AKR1C1 en cèl·lules de carcinoma d'ovari causa resistència a cisplatí (Deng, 2002). Hsu i col·laboradors van identificar la sobreexpressió d'AKR1C1 en pacients de NSCLC (*non-small cell lung cancer*) (Hsu, 2001). En aquest estudi, els nivells d'expressió correlacionaven amb el pronòstic i els autors van suggerir una relació amb resistència a drogues quimioterapèutiques.

1.3.3.2- La Proteïna Quinasa C alfa

La proteïna quinasa C alfa (PKC α) és un membre de la família de quinases de serina i treonina, amb un domini catalític que conté les seqüències típiques de les proteïnes quinases, i un domini regulador, que inclou una regió autoinhibitòria (Martelli, 1999). La PKC α és capaç de fosforilar una gran quantitat de proteïnes, i aquesta modificació post-traduccional desencadena la transducció de senyals associats a una àmplia varietat de respostes cel·lulars, incloent proliferació, diferenciació, transport a través de la membrana, expressió gènica i promoció tumoral (Martelli, 1999; Wang, 1999).

L'isoenzim α de la PKC s'expressa a tots els teixits, però s'han detectat nivells anòmals en moltes línies cel·lulars transformades i en varis tumors humans (Basu, 1993). La seva sobreexpressió ha estat correlacionada amb fenotips neoplàstics més agressius (Ways, 1995), així com amb invasió i metàstasi (Takenaga, 1986; Gopalakrishna, 1988; Korczak, 1989) i amb una menor dependència de factors de creixement externs (Eldar, 1990).

S'ha demostrat que la transfecció estable de la PKC α causa resistència a doxorubicina i a vinblastina. Aquesta resistència podria estar associada a un increment en la fosforilació de la P-glicoproteïna, fet que causaria un decrement en la acumulació de les drogues i afavoria la MDR (Yu, 1991). La disminució dels nivells d'mRNA de la PKC α atenua el fenotip MDR en cèl·lules tumorals (Ahmad, 1993) i incrementa la sensibilitat enfront a drogues anticanceroses tan *in vitro* (Wang, 1998; Isonishi, 2000; Lahn, 2004) com *in vivo* (Geiger, 1998). La utilització d'inhibidors farmacològics de la PKC α han permès disminuir el creixement i la supervivència de tumors, reduir les seves propietats neoplàstiques, promoure l'apoptosi i modular la resistència a quimioteràpics, com és el cas del MTX (Basu, 1993; Noé, 1995).

1.3.3.3- La Caveolina 1

La caveolina 1 (CAV1), proteïna integral de membrana de 21 KDa, és el principal component de les caveoles, invaginacions de la membrana plasmàtica que es troben a la majoria de cèl·lules de mamífer (Rothberg, 1992). Té l'habilitat d'interaccionar amb altres molècules de caveolina, i també amb altres proteïnes (Okamoto, 1998). S'ha descrit la implicació de les caveoles en processos de transport de la membrana plasmàtica tals com endocitosi, transcitosi, i eflux de colesterol. A més, les caveoles són riques en molècules senyalitzadores, en receptors i en transductors. Les proteïnes efectores són reclutades a les caveoles després de la activació dels receptors de membrana (Fairchild, 1990). De fet, Cavallo-Medved i col·laboradors van hipotetitzar que les caveoles podien actuar de lloc d'agrupament per proteases de la superfície cel·lular, facilitant d'aquesta manera la iniciació d'esdeveniments proteolítics involucrats en la migració cel·lular i la invasió tumoral (Cavallo-Medved, 2005). Els mateixos autors van demostrar que la infraexpressió de la CAV1 mitjançada per tecnologia antisentit redueix tan la degradació de la matriu extracel·lular com la invasivitat cel·lular.

Malgrat que se li ha suggerit una funció com a gen supressor de tumors (de fet està cromosòmicament localitzat en una regió considerada supressor tumoral), i que està infraexpressat en cèl·lules tumorals (Lavie, 1998), s'ha detectat la sobreexpressió de la CAV1 en càncers de prostata (Yang, 1998; Li, 2001; Mouraviev, 2002; Haeusler, 2005), esòfag (Kato, 2002), pàncrees (suzuoki, 2002) i ronyó (campbell, 2003). Aquesta

varietat de dades impliquen que la CAV1 presenta diferent activitat dependent de les molècules senyalitzadores amb les que interaccioni i del context cel·lular o tissular (Lu, 2003). Nivells elevats de CAV1 han estat associats amb la progressió de càncers de colon i de mama (Thompson, 1998; Yang, 1998) i amb una estimulació de la invasivitat en cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó (Ho, 2002). S'ha descrit que la CAV1 afavoreix la resistència a l'apoptosi en cèl·lules MCF-7 (Fiucci, 2002). A més, s'ha descrit la re-expressió de la CAV1 en els últims estadis del desenvolupament tumoral d'adenocarcinomes de pròstata humans i de ratolí (Yang, 1998), un escenari que podria recordar la resistència a quimioteràpics. De fet, Bender i col·laboradors (Bender, 2000) van quantificar uns nivells significativament més elevats de CAV1 en una línia cel·lular resistent a MTX derivada de la línia HT29. Els mateixos autors van correlacionar la sobreexpressió de la CAV1 amb increments en el potencial metastàtic.

La sobreexpressió de la CAV1 ha estat descrita en cèl·lules MDR, fet que podria indicar que l'adquisició del fenotip MDR de les cèl·lules canceroses estaria associat a un increment en el número de caveoles. De fet, cèl·lules HT29-MDR contenen 5 vegades més estructures semblants a caveoles que les HT29 parentals. S'ha proposat que les caveoles podrien mitjançar o facilitar l'exportació de drogues lipofíliques per un mecanisme similar al descrit per l'eflux de colesterol, però probablement amb baixa eficiència. Així, les cèl·lules que expresessin uns nivells més alts de caveolina (i per tant tinguessin més caveoles) presentarien un avantatge selectiu en les primeres fases d'exposició a la droga. Aquesta propietat seria seleccionada positivament en cèl·lules tractades amb la droga (Lavie, 1998).

1.3.3.4- L'Enolasa 2

L'enolasa 2 (ENO2) és un enzim que forma part del procés de glicòlisi i catalitza el pas de 2-fosfoglicerat a fosfoenolpiruvat. Una major glicòlisi i la formació *de novo* de vasculatura són dues característiques universals dels tumors sòlids, i es creu que ambdues juguen un paper important en l'adaptació al microclima hipòxic. De fet, s'ha demostrat la inducció de l'ENO2 per hipòxia.

S'ha comprovat la sobreexpressió en càncer colorectal de gens involucrats en la glicòlisi (Zhang, 1997). Concretament, s'ha descrit un paper important de la ENO2 en càncers

colorectals (Yeh, 2008). De fet, la ENO2 està sobreexpressada en diferents càncers (Karnak, 2005; Fujiwara, 2002; Kitakata, 2007) i l'alfa enolasa està sobreexpressada significativament en una línia cel·lular de càncer de colon metastàtica, la qual cosa suggereix una possible associació entre els nivells d'expressió del gen i el procés metastàtic, tan *in vitro* com *in vivo* (Katayama, 2006).

1.3.3.5- L'E-Cadherina

L'E-Cadherina és una molècula d'adhesió cel·lular dependent de calci que interacciona directament amb la β -catenina, donant lloc a les unions adherents. Aquest tipus d'unions cel·lulars uneixen l'E-Cadherina al citoesquelet d'actina i microtúbuls, i juguen un paper clau en el manteniment de la integritat epitelial (Perez-Moreno, 2003). Alteracions en l'expressió de l'E-Cadherina han estat associades a canvis en la migració i en el fenotip de les cèl·lules (Hynes, 1992). És per això que l'E-Cadherina s'ha classificat com a gen supressor de tumors (Hedrich, 1993).

S'han proposat un gran nombre de mecanismes que podrien explicar la disminució en E-Cadherina en cèl·lules que sofreixen transformació maligne, com són mutacions del gen (Taddei, 2000), desordres en la traducció (Frixen, 1991) o increments en la degradació mediada per proteases (Katayama, 1994). De totes maneres, la delecció a nivell genòmic de l'*E-Cadherina* és l'esdeveniment més freqüent en tumors epitelials, fet que s'ha associat amb la progressió tumoral (Behrens, 1989; Perl, 1998) i que és considerat un pas crucial que afavoreix la metastasi i l'invasió (Cavallaro, 2004; Frixen, 1991). Els nivells d'E-Cadherina disminueixen seqüencialment amb el pas de la mucosa de colon normal a adenoma, i amb el pas d'adenoma a carcinoma (Gagliardi, 1995). De fet, els nivells d'mRNA de l'E-cadherina en cèl·lules d'adenocarcinoma són la meitat dels que es troben en les cèl·lules normals del colon (Munro, 1995). L'expressió de l'E-Cadherina en carcinoma de colon s'ha associat a l'estadi tumoral, metastasi a nodes limfàtics i supervivència dels pacients (Bellovin, 2005; Dorudi, 1995; Dorudi, 1993). Aquestes observacions evidencien una correlació funcional entre els nivells d'E-cadherina i la malignitat. S'ha descrit la pèrdua de la heterozigositat de la banda cromosòmica 16.1q, on es localitza l'*E-cadherina*, en la majoria de càncers humans de prostata (Suzuki, 1996), pèrdua que està associada amb el grau del tumor, amb estadis

clínic avançats i escassa supervivència (Cheng, 1996). També s'ha suggerit que la pèrdua d'*E-cadherina* pot estar involucrada en la adquisició de resistència a la apoptosi (Derksen, 2006).

Tot i que la pèrdua de l'E-Cadherina contribueix clarament al procés tumoral, com a esdeveniment aïllat no predisposa al càncer ni indueix la formació tumoral (Derksen, 2006). Tot i això, cal tenir en compte que la pèrdua de l'*E-Cadherina* allibera la β -catenina de les unions adherents, permetent que aquesta estigui lliure per dur a terme les altres funcions que se li han atribuït (Veure la discussió d'aquesta memòria).

1.3.3.6- El Dickkopf homolog 1

El Dickkopf homolog 1 (DKK1), és una proteïna secretada que intervé en el desenvolupament embrionari (Forget, 2007) i que forma part de la via de senyalització canònica per Wnt (Rothbacher, 2002). La senyalització hiperactiva d'aquesta via contribueix a la gènesi de càncers en un àmpli ventall de teixits humans (Howe, 2004). El nostre grup va proposar la activació de la via Wnt / β -catenina com un pas important en la resistència al MTX en cèl·lules HT29 de càncer de colon (Selga, 2008b). El promotor de DKK1 està regulat transcripcionalment per TCF, un factor de transcripció que, junt amb Lef-1 i β -catenina, és capaç de regular la transcripció de molts gens, alguns dels quals estan relacionats amb la proliferació. Així, DKK1 és una diana de la senyalització per la via Wnt / β -catenina (Gonzalez-Sancho, 2005).

No obstant, s'ha proposat que DKK1 inhibeix la senyalització via Wnt tot formant un complex ternari amb ambdós receptors de Wnt, complex que és ràpidament incorporat dins la cèl·lula per endocitosi (Semenov, 2001; Mao, 2002), fet que atura la cascada de senyalització (Nelson, 2004). Malgrat la inhibició mediada per DKK1, l'activació primerenca de la via Wnt / β -catenina és freqüent en la majoria de càncers de colon i d'altres tipus, a causa de mutacions als gens APC (*adenomatous polyposis coli*) o β -catenina (Gonzalez-sancho, 2005; Polakis, 2000). Aquestes mutacions desconnecten la part efectora de la cascada de senyalització dels receptors de Wnt.

S'han corelacionat els nivells d'expressió de DKK1 amb el càncer (Forget, 2007). El gen s'expressa a les cèl·lules de càncer de mama però no als teixits normals, i la seva

sobreexpressió ha estat relacionada amb la metàstasi (Voorzanger-Rousselot, 2007) i amb l'agressivitat tumoral. S'ha suggerit un paper per DKK1 en la transformació epitelio-mesenquimal (Monaghan, 1999) i s'ha proposat com a diana potencial per immunoteràpia (Forget, 2007). A més, s'ha comprovat que DKK1 és capaç d'induir la proliferació de cèl·lules mare humanes del moll de l'os, tot permetent la seva re-entrada al cicle cel·lular (Gregory, 2003).

1.3.3.7- Les UDP-glucuronosil transferases

Les UDP-glucuronosil transferases (UGTs) són una família de glicoproteïnes de membrana que deriven d'un sol gen localitzat al cromosoma 2q37 que dona lloc a nou proteïnes UGT1A funcionals generades per empalmament alternatiu de 13 primers exons amb els exons 2-5 (Mackenzie, 1997). Les UGTs estan involucrades en el metabolisme de fase II d'una gran varietat de metabolits, tan endògens com exògens (Guillemette, 2003). La glucuronidació és un procés metabòlic important ja que converteix les molècules lipofíliques en molècules més hidrofíliques, facilitant així la seva secreció fora del cos.

Representen productes glucuronidables els analgèsics, les hormones sexuals, els flavonoides, la rifampicina, la bilirubina i també carcinògens específics del tabac (Strassburg, 1998 i Kiang, 2005). Algunes drogues anticanceroses, com per exemple el topotecan, l'irinotecan, el SN-38 (el metabolit actiu de l'irinotecan), la doxorubicina i el 4-hidroxitamoxifè, han estat descrites com a substrats de l'activitat UGT1A (Nagar, 2006; McCague, 1990; Platzer, 1998; Rosing, 1998; Andersen, 1999; Iyer, 1998).

De fet, la inactivació de drogues a les cèl·lules tumorals és un mecanisme important de resistència a aquestes drogues, i s'ha proposat que la glucuronidació mitjançada pels enzims de la família de les UGTs contribueix a la resistència a múltiples drogues quimioterapèutiques (Meijerman, 2008), com per exemple la daunorubicina (resistència descrita tan en línies cel·lulars com en nòduls hiperplàstics de fetge de rata) (Cowan, 1986; Gessner, 1990), l'àcid micofenòlic (Franklin, 1996; Franklin, 1997), la mitoxantrona (Rekha, 1997), el SN-38 (Takahashi, 1997; Cummings, 2003) i la camptotecina (Brangi, 1999), entre d'altres (Zembutsu, 2002; Thornton, 2003).

1.3.3.8- El factor d'elongació 1 alfa 1

El factor d'elongació 1 alfa 1 (EEF1A1) és l'encarregat de reclutar tRNAs aminoacetilats al lloc A del ribosoma (Thornton, 2003). La seva funció fa necessari que s'expressi a tots els teixits, pel que ha estat tradicionalment etiquetat com a enzim de manteniment amb expressió constitutiva. De totes maneres, EEF1A1 es troba sobreexpressat en melanomes i en tumors de pàncrees, mama, pulmó, pròstata i colon (Alon, 1999; Hassell, 1976). S'ha demostrat que un augment en els nivells d'expressió de EEF1A correlacionen amb una major proliferació cel·lular (Hassell, 1976; Grassi, 2007), amb la transformació oncogènica (Tatsuka, 1992), amb un retràs en la senescència cel·lular (Shepherd, 1989) i amb la metàstasi (Edmonds, 1996).

La sobreexpressió d'EEF1A1 ha estat relacionada amb resistència a drogues, entre elles el cisplatí (Johnsson, 2000), la doxorubicina (Bertram, 1998) i el MTX (Beyersheim, 1999). S'ha proposat que la resistència podia ser deguda a la seva habilitat d'inhibir l'apoptosi (Talapatra, 2002). També s'ha demostrat que la sobreexpressió d'EEF1A promou el creixement cel·lular i la replicació, tot contribuint a un increment global de la traducció proteica. La reducció dels nivells d'expressió del gen mitjançada per oligonucleòtids antisentit inhibeix la tumorogènesi i la replicació cel·lular independent d'ancoratge en cèl·lules tumorals de prostata (Su, 1998).

1.3.4- Mètodes per la integració dels resultats

Un dels passos més crítics en l'anàlisi de dades és la situació de les troballes estadísticament significatives en un context biològic. En lloc de centrar-se en gens individuals, és més útil explorar quins processos biològics, funcions moleculars o vies de senyalització estan implicades o afectades per una condició particular. La determinació de les interaccions moleculars que tenen lloc entre els gens d'interès pot ajudar al coneixement del mecanisme d'acció del procés biològic objecte de l'estudi. Cal tenir en compte, però, que aquests tipus d'anàlisi no donen respostes absolutes, sinó que evidencien relacions que han de ser explorades i validades.

1.3.4.1- Anàlisi d'agrupament

L'objectiu principal de les anàlisis d'agrupament és col·locar junts objectes (ja siguin gens o mostres) amb propietats similars. També es pot concebre com una reducció de la dimensionalitat del sistema. Existeixen diferents tipus d'agrupament, entre els quals els més comuns són:

A) L'agrupament anomenat ***K-means***, que utilitza les propietats euclidianes del vector espai. Cal fixar el número de grups (K) en els que dividir els objectes, i establir uns criteris que determinaran l'assignació d'un objecte a un dels grups. D'aquesta manera, els objectes són reassignats iterativament al grup més òptim segons els criteris preestablerts (Tavazoie, 1999). Aquest tipus d'agrupament simplement reparteix els objectes en els diferents grups, sense especificar les relacions existents entre els components de cada grup (Quackenbush, 2001).

B) L'**agrupament jeràrquic** (*hierarchical clustering*), que es basa en la unió iterativa dels dos objectes més semblants. Un cop units, les distàncies entre tots els objectes i la nova unió són recalculats. El procés es repeteix fins a unir tots els objectes (Eisen, 1998) i els resultats s'agrupen en forma de dendrograma. Aquesta és una de les tècniques més utilitzades per a l'anàlisi de les dades d'expressió gènica.

La representació de l'agrupament jeràrquic crea una matriu d'expressió en la qual cada columna representa un experiment o una condició, i cada fila representa un

Introducció

gen particular. La coloració de cada element de la matriu està basada en el seu valor d'expressió, i ajuda a crear una representació visual dels patrons d'expressió gènica associada a un conjunt d'experiments. Existeixen diferents mètodes per acolorir les matrius d'expressió. El mètode més comú associa els gens sobreexpressats al color vermell, els gens infraexpressats al color verd i els gens que no presenten variacions en els nivells d'expressió amb el color negre. Els elements amb color més brillant representen un major grau d'expressió diferencial, i amb més confiança. Aquestes representacions s'anomenen *Heatmap*.

Dins dels agrupaments anteriorment descrits, es distingeix entre dos tipus d'agrupaments: agrupament de gens i agrupament de mostres. El primer identifica gens que es comporten de manera similar entre les condicions experimentals assajades, i que, per tant, poden estar relacionats d'alguna manera (com per exemple pertànyer a una mateixa via biològica)(Hess, 2001). El segon identifica mostres que presentin patrons d'expressió gènica similars, i pot generar subgrups que no s'havien identificat en l'anàlisi bàsica de les dades. Cal tenir en compte que l'agrupament de mostres dependrà del nombre de gens i de les mostres incloses, així com també de les normalitzacions realitzades.

Les anàlisis d'agrupament es solen acompanyar per altres mètodes de reducció de la dimensionalitat que faciliten la visualització, com pot ser l'anàlisi de components principals (*principal component analysis*, PCA). El PCA, també anomenat descomposició en valors singulars, és una tècnica matemàtica que redueix la dimensionalitat de grups de dades complexes tot identificant els components principals que representen els perfils dominants en el grup de dades. Aquest mètode permet una estimació visual del número de grups en els que es poden dividir les dades, informació que posteriorment pot ser utilitzada en anàlisis d'agrupament *K-means* (Quackenbush, 2001).

1.3.4.2- Mapes biològics pre-establerts i Xarxes d'associació biològica

Un gran repte de l'era post-genòmica és la obtenció d'una representació completa de la cèl·lula. Per dur a terme aquest propòsit, és més pràctic explorar quins processos biològics, funcions moleculars i vies biològiques estan involucrades o afectades en una condició determinada en lloc d'observar les dades a nivell de gens individuals. És amb aquesta finalitat que es va desenvolupar un recurs bioinformàtic anomenat KEGG (*Kyoto encyclopaedia of genes and genomes*), que inclou tota una col·lecció de mapes de vies de senyalització, dibuixades manualment, que representen el que es coneix actualment sobre les interaccions entre proteïnes relacionades amb diferents processos, i que s'anomenen *pathways*. S'ha proposat que aquesta base de dades també representa un recurs útil d'informació suplementària de gens d'interès (Pennie, 2000). A més de la KEGG, existeixen altres tipus de *pathways*, com és el *Gene Map Annotator and Pathway Profiler* (GenMAPP). Tots aquests *pathways* es poden importar dins de GeneSpring (veure la secció corresponent dins de Mètodes).

De totes maneres, és conegut que la cèl·lula no es regeix per vies aïllades de senyalització, sinó que certes proteïnes poden tenir un paper en més d'una via, de tal manera que finalment s'estableixen multitud d'interaccions entre diferents vies. És per això que és més útil la obtenció d'imatges a gran escala de les xarxes de regulació gènica (Bar-joseph, 2003), que permeten conèixer quins gens o proteïnes es veuen influenciats per una proteïna concreta, i de quina manera.

La majoria de les xarxes gèniques es poden descriure com a gràfics en els quals cada node representa un gen i la presència d'una connexió entre dos nodes indica la existència d'una interacció entre els dos nodes (Soinov, 2003).

Alguns exemples de programes informàtics útils per generar xarxes d'associació biològica (*Biological association networks*, BAN) són Ingenuity, Pathway Studio i Pathway Architect. En aquesta memòria s'ha utilitzat principalment el software Pathway Architect per la generació dels BANs presentats, pel que s'explica el funcionament d'aquest programa a l'apartat corresponent de Mètodes.

Objectius

2- Objectius

Aquesta tesi s'ha basat en l'estudi dels patrons d'expressió gènica diferencial associats a la resistència al MTX en diferents línies cel·lulars. És per aquest motiu que s'han establert dos objectius principals, amb diversos objectius secundaris.

1) Estudi de Genòmica Funcional en cèl·lules HT29 resistents al MTX.

- Definir els patrons d'expressió gènica diferencial en cèl·lules HT29 de càncer de colon resistents a 10^{-5} M de MTX mitjançant microarrays d'expressió representatius de tot el genoma humà.
- Confeccionar llistes de gens diferencialment expressats i seleccionar gens que putativament poguessin estar relacionats amb la resistència al MTX.
- Validar els gens seleccionats a nivell d'mRNA o proteïna. Anàlisi transcripcional de gens específics, que en un primer estudi es va concretar amb l'AKR1C1.
- Estudiar la funció de l'AKR1C1, tan en la sensibilitat vers el MTX com en el cicle cel·lular i l'apoptosi.
- Determinar el número de còpies a nivell de DNA del *locus dhfr* i gens flanquejants. Explorar la possible contribució dels gens presents en aquesta localització en la resistència al MTX.
- Estudiar els efectes sobre la sensibilitat vers el MTX d'altres gens diferencialment expressats en les cèl·lules resistents que es trobin en localitzacions diferents a la del *locus dhfr*.
- Realitzar tractaments combinats que reverteixin la sobreexpressió i/o supleixin la infraexpressió de gens associats a la resistència al MTX. Analitzar els efectes d'aquests tractaments sobre la sensibilitat vers el MTX.

2) Estudi de Genòmica Funcional en altres línies cel·lulars resistents al MTX.

- Establir línies cel·lulars resistents al MTX a partir de cèl·lules sensibles representatives de diferents orígens tissulars i definir els patrons de la seva expressió gènica diferencial, mitjançant microarrays d'expressió representatius de tot el genoma humà.
- Confeccionar llistes de gens diferencialment expressats en cadascuna de les línies resistents obtingudes i comparar-les amb la finalitat d'identificar gens comuns entre elles, per generar xarxes d'associació biològica que evidencin gens que representin els nodes d'aquestes xarxes.
- Validar funcionalment mitjançant tecnologia d'RNAi els gens node seleccionats, i comprovar si aquest tractament antisentit sensibilitza les cèl·lules al MTX.

Materials i Mètodes

La descripció dels mètodes més habituals en biologia molecular és part integrant dels articles publicats, que conformen la secció de Resultats d'aquesta memòria.

De totes maneres, en aquesta secció de la memòria es descriuen específicament alguns dels mètodes més emprats durant la tesi doctoral. Així mateix, es presenta una descripció del material biològic utilitzat.

3.1- Materials

3.1.1- Línies cel·lulars

En aquest treball s'han utilitzat línies cel·lulars representatives de diferents tipus de càncer. A partir de totes elles s'han generat les corresponents línies resistents al metotrexat, tot seguint el protocol descrit a l'apartat 3.2.1. La relació de totes les línies utilitzades és la que segueix:

- **HT29**: Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma colorectal. ATCC HTB-38.
- **HT29-R**: Línia derivada de la línia HT29, resistent a 10^{-5} M de MTX.
- **Caco-2**: Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma colorectal. ATCC HTB-37.
- **Caco-2-R**: Línia derivada de la línia Caco-2, resistent a 10^{-5} M de MTX.
- **MCF-7**: Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma mamari. ATCC HTB-22.
- **MCF-7-R**: Línia derivada de la línia MCF-7, resistent a 10^{-6} M de MTX.
- **MDA-MB-468**: Línia cel·lular humana d'adenocarcinoma mamari. ATCC HTB-132.
- **MDA-MB-468-R**: Línia derivada de la línia MDA-MB-468 resistent a 10^{-6} M de MTX.
- **MIA PaCa-2**: Línia cel·lular humana de carcinoma de pàncreas. ATCC CRL-1420.
- **MIA PaCa-2-R**: Línia derivada de la línia MIA PaCa-2, resistent a 10^{-6} M de MTX.
- **Saos-2**: Línia cel·lular humana d'osteosarcoma. ATCC HTB-85
- **Saos-2 -R**: Línia derivada de la línia Saos-2, resistent a 10^{-6} M de MTX.
- **K562**: Línia cel·lular humana de leucèmia mieloide crònica. ATCC CCL-243.
- **K562-R**: Línia derivada de la línia K562, resistent a 10^{-5} M de MTX.

3.1.2- Medis de cultiu

Les línies cel·lulars parentals o sensibles al MTX es mantenen en medi de cultiu HAM's F12 suplementat amb 14 mM de bicarbonat sòdic (1.176 g/l), penicil·lina G

Materials i Mètodes

sòdica (100 U/ml), estreptomina (100 mg/l) i sèrum boví fetal (7%, V/V). Tots els reactius són de Gibco. Les cèl·lules s'incubaven a 37°C en una atmosfera al 5% CO₂. En arribar a la confluència, s'expandien els cultius mitjançant el tractament amb tripsina al 0.05% (Sigma) en PBS 1x (136.9 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄ i 2.8 NaH₂PO₄, pH 7.4) per tal de desenganxar-les de la placa.

Les línies resistents al MTX es cultivaven en medi HAM's F12 desproveït de glicina, hipoxantina i timidina, productes finals de l'activitat DHFR (medi -GHT, Gibco). Aquest medi es suplementava amb un 7% (V/V) de sèrum boví fetal, prèviament dialitzat per tal d'eliminar molècules de baix pes molecular. La diàlisi es realitzava en PBS 1x a 4°C, canviant la solució cada 12h durant 3dies.

S'esterilitzaven ambdós medis de cultiu i la tripsina mitjançant la filtració a través de membranes de 0.2 µm de tamany de porus (Schleicher & Schuell).

3.1.3- Oligonucleòtids d'RNA d'interferència (siRNAs)

La utilització d'siRNAs ha estat bàsica en els experiments de validació funcional dels gens diferencialment expressats a les cèl·lules resistents. La relació de seqüències sentit dels siRNAs utilitzats es presenten a la taula següent.

Gen	Nom siRNA	Seqüència siRNA
AKR1C1	siAKR	5'- ATCACCAAGCAGGAGAGAT-3'
-	siAKR-4MIS	5'- ATGTGGAAGCAGGAGAGAT -3'
ZFYVE16	siZFYVE16	5'- GGATCACGGAGGATTCCTGTT -3'
DHFR	siDHFR	5'- AATGAGCTCCTTGTGGAGG -3'
MSH3	siMSH3	5'- GCAACATCACAGTCCTTGGTT -3'
SSBP2	siSSBP2	5'- AACCACAGTGAGTCAGCCCTT -3'
XRCC4	siXRCC4	5'- CTGATCTCTCTGGGTTGGCTT -3'
HAPLN1	siHAPLN1	5'- GTGTGAGGTGATTGAAGG -3'
EDIL3	siEDIL3	5'- GTGAAGCATACCGAGGGGATACATT -3'
ENO2	siENO2	5'- CTGCCCCTGTATCGCCACA -3'
PRKCA	siPRKCA	5'- TCCGCAGTGGAATGAGTCC -3'
CAV1	siCAV1	5'- CCAGAAGGGACACACAGTT -3'
Luciferasa	siLuc	5'- TAAGGCTATGAAGAGATAC -3'

Taula 2. Seqüències dels siRNAs utilitzats. Els 4 nucleòtids desaparellats de la seqüència de siAKR-4MIS respecte a siAKR estan subratllats.

3.1.4- Vectors plasmídics

3.1.4.1- Vectors d'expressió eucariota

Els vectors d'expressió s'utilitzen per introduir i expressar un gen específic en una línia cel·lular. Aquesta propietat també és d'utilitat per realitzar validacions funcionals. Els vectors utilitzats són:

- **pCMV6-XL5-AKR1C1:** Vector d'expressió eucariota, amb resistència a ampicil·lina, que conté com a insert el cDNA del gen *akr1c1*. Proporcionat pel Dr. Simpkins, Temple University, Philadelphia.
- **pBATEM2-CDH:** Vector d'expressió eucariota, amb resistència a ampicil·lina, que conté com a insert el cDNA del gen *E-Cadherina*. Proporcionat per la Dra. Duñach, Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.4.2- Vectors amb el gen *luc*

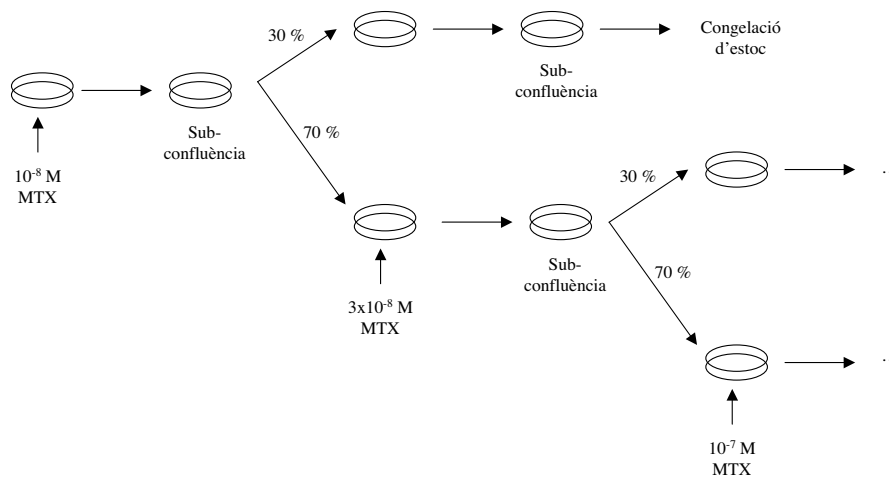
Els vectors que contenen el gen *luciferasa* permeten l'estudi de seqüències potencialment reguladores de la expressió gènica en eucariotes. Tots els vectors utilitzats en l'estudi del promotor de la AKR1C1 deriven del vector pGL3-Basic, en el qual es van clonar unidireccionalment diferents fragments de promotor generats per PCR.

- **pGL3-Basic:** Vector sense promotor eucariota ni seqüències potenciadores. Permet l'estudi de promotors o fragments d'aquests situats davant del gen de la luciferasa de la cuca de llum (*Photinus pyralis*). Presenta resistència a la ampicil·lina.
- **AKR-pr241:** Vector pGL3-basic amb un insert corresponent a 241 parells de bases de la seqüència proximal del promotor de la AKR1C1.
- **AKR-pr84:** Vector pGL3-basic amb un insert corresponent a 84 parells de bases de la seqüència proximal del promotor de la AKR1C1. Inclou la seqüència d'un lloc putatiu d'unió dels factors de transcripció de la família Sp.
- **AKR-prDeletionSp1:** Vector pGL3-basic amb un insert corresponent a 63 parells de bases de la seqüència proximal del promotor de la AKR1C1. Exclou el lloc putatiu d'unió per Sp.

3.2- Mètodes

3.2.1- Generació de cèl·lules resistents al metotrexat.

Es va partir d'una placa semi-confluent de cèl·lules sensibles al quimioteràpic i es va tractar amb una concentració de 10^{-8} M de MTX. Les cèl·lules que van sobreviure es van deixar créixer fins a sub-confluència. El 70 % d'aquesta població es va incubar amb 3×10^{-8} M de MTX i el 30 % restant es va mantenir a 10^{-8} M de MTX, fins obtenir suficient estoc per congelar. El mateix procediment es va repetir tot incrementant la concentració de MTX en factors de tres fins arribar a 10^{-6} M o 10^{-5} M de MTX, dependent de la tolerància de cada línia cel·lular.



Esquema 8. Passos a seguir per l'establiment de cèl·lules resistents al MTX.

3.2.2- Extracció de l'RNA per als xips de DNA i comprovació de la qualitat amb el Bioanalyzer 2100

Una de les aproximacions experimentals de genòmica funcional més utilitzades actualment és la comparació dels nivells d'mRNA en dues mostres diferents (o en una mostra problema i una control). Tot i que RNA missatger no és el producte final d'un gen, la transcripció és el primer procés regulat. A més, la mesura dels nivells d'mRNA és considerablement més econòmica que realitzar mesures directes de nivells de proteïna, i es fàcil realitzar experiments a gran escala.

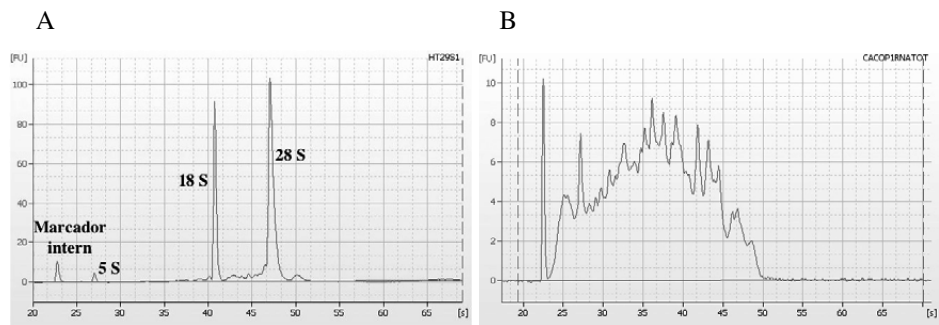
L'RNA total es va obtenir de les diferents línies cel·lulars tot utilitzant el kit RNeasy MiniKit de Qiagen. Aquest kit basa la seva tecnologia en la utilització de columnes amb membranes de sílica-gel i diferents passos de centrifugació. Les mostres es lisen i s'homogenitzen en un tampó que conté isotiocianat de guanidina, un agent altament denaturant que inactiva ràpidament les RNAses, tot assegurant la purificació d'RNA intacte. Posteriorment s'afegeix etanol, que proporciona les condicions adequades per la unió de l'RNA a la membrana. Aquesta mescla es col·loca dins les columnes de sílica-gel, que retenen l'RNA i deixen passar tots els possibles contaminants. S'elueix RNA d'alta qualitat en aigua lliure d'RNAses.

Per tal de quantificar i comprovar la qualitat dels RNAs preparats, s'utilitza el Bioanalyzer 2100. Aquest sistema presenta una major sensibilitat, resolució i precisió que els sistemes convencionals d'espectrofotometria (quantitat) i electroforesi (qualitat).

Les mostres es marquen amb fluorocroms, que s'intercalen entre les cadenes de l'RNA, i es realitza una electroforesi que permet separar les molècules de la mostra segons la seva mida. La utilització d'un làser permet la detecció dels complexos RNA-fluorocrom. Les dades es tradueixen en imatges tipus gel i en electroferogrames.

Quan s'analitzen les mostres d'RNA total, es generen electroferogrames en els quals apareixen dos pics molt marcats, que corresponen als RNA ribosomals 18S i 28S. També es pot arribar a observar un petit pic corresponent a l'rRNA 5S. Addicionalment, sempre apareix un primer pic en l'electroferograma, que correspon a un marcador intern. Aquest marcador és un fragment de DNA de 50 bp de longitud que s'utilitza per alinear les dades d'aquest marcador amb les dades obtingudes de les mostres, fet que ajuda a compensar els efectes inespecífics que hagin pogut succeir en el curs de la electroforesi (Esquema 9A).

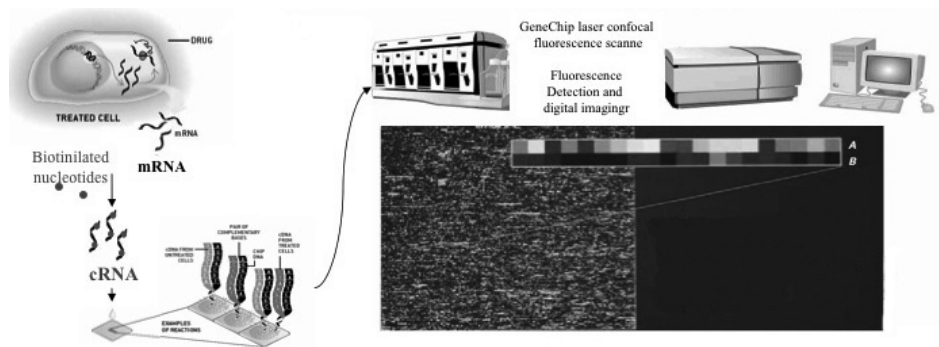
Els electroferogrames permeten estimar, a través del nombre d'integritat de l'RNA (*RNA integrity number*, RIN), el grau de degradació de la mostra. S'assigna un número que va de l'1 (mostra completament degradada) al 10 (mostra d'RNA perfecta, sense productes de degradació). L'aparició d'altres pics addicionals als anteriorment mencionats correspon a degradació de la mostra (Esquema 9B).



Esquema 9. Electroferogrames corresponents a una mostra en perfecte estat (A) i a una mostra degradada (B).

3.2.3- Marcatge, hibridació i escaneig

Un cop comprovada la bona qualitat de l'RNA de les mostres, es sintetitza el DNA complementari a partir d'un encebador amb una cua poli-T. Posteriorment es sintetitza un cRNA antisentit que incorpora ribonucleòtids biotinitats. Després de la purificació i fragmentació del cRNA, aquest es posarà en contacte amb el xip, i s'hibridarà a les seves seqüències complementàries. Les senyals d'hibridació es detecten utilitzant un escàner, i es generen imatges digitals. La quantitat de cRNA unit es mesura indirectament a partir de la quantificació de la intensitat de la fluorescència en cadascun dels punts de la imatge. Posteriorment, s'associa cadascuna de les intensitats al gen corresponent segons la seva localització i s'obtenen matrius d'expressió gènica que s'analitzaran posteriorment amb programes informàtics específics (Brazma i Hess, 2001). Es presenta una visió global de tot el procés a l'esquema 10.



Esquema 10. Representació del procés dels microarrays.

Per tal de separar els gens que verdaderament presenten expressió diferencial dels canvis estocàstics, es solen realitzar tres assaigs per a cada condició a partir d'extraccions independents d'RNA, i es defineix l'expressió diferencial basada en el consens entre els triplicats (Hedge, 2000).

3.2.4- Anàlisi amb el programa GeneSpring GX v 7.3.1

Es necessiten mètodes i eines bioinformàtiques per copsar la gran quantitat de dades obtingudes amb els microarrays. El programa GeneSpring GX permet la visualització i l'anàlisi de dades d'expressió obtingudes d'experiments de microarrays. Aquest programa proporciona una sèrie d'eines que permeten identificar, d'una manera simple i estadísticament fiable, gens diferencialment expressats, per exemple en la resistència al MTX.

3.2.4.1- Anàlisi bàsica

Un cop importat el genoma corresponent a l'organisme d'estudi, cal importar les dades d'expressió obtingudes amb els microarrays, que han d'incloure un identificador per a cada gen i el seu senyal d'hibridació associat. Cal normalitzar les dades per tal de corregir possibles diferències d'expressió entre les diferents mostres degudes als processos de marcatge o d'hibridació. S'utilitzen 3 normalitzacions, que s'apliquen en l'ordre que segueix, cadascuna sobre els resultats de la normalització anterior:

- 1) Tots els senyals inferiors a 0.01 s'ajusten a aquest valor, evitant així la obtenció de valors infinits o indeterminats derivats dels càlculs matemàtics que realitza el programa.
- 2) Cadascun dels senyals dins d'un mateix microarray es divideix per la mediana de tots els senyals d'aquell microarray.
- 3) El senyal de cadascun dels gens es divideix per la seva expressió mediana en els microarrays de la condició control.

Un cop aplicades les tres normalitzacions, s'obté un valor d'expressió per a cada gen en cadascun dels microarrays, que representa el tan per u d'expressió respecte la condició control. Així, els valors d'expressió seran sempre majors de zero. Aquesta relació

d'expressió també es pot representar en base logarítmica, de tal forma que els gens infraexpressats, amb valors de relació d'expressió entre zero i la unitat, adquiriran un signe negatiu en calcular-ne el logaritme.

Posteriorment, es defineix un paràmetre que permetrà al programa considerar com a rèpliques tots aquells microarrays que correspongin a una mateixa condició. Les dades es filtren mitjançant una sèrie de passos consecutius, que s'apliquen sobre la llista anterior:

1) Es calcula el *Cross-Gene Error Model* per a les rèpliques, valor que permet eliminar tots aquells gens que tenen uns nivells d'expressió massa propers al soroll de fons de la hibridació. Aquells gens que tinguin uns valors d'expressió per sobre d'aquest punt de tall es consideraran dades fiables.

2) Es realitza una anàlisi estadística (*Student's t-test*) per a la qual es descarten tots aquells valors que tinguin un valor de $p > 0.05$. Addicionalment, es pot aplicar *Multiple Testing Correction (Benjamini and Hochberg false discovery rate)*, correcció que es basa en re-calcular les probabilitats obtingudes amb el *t-test* per assegurar que tots els valors que passen aquest filtre són diferents dels valors control, és a dir, que presenten una expressió diferencial respecte al control.

3) Finalment, s'aplica un filtre que permet seleccionar els gens diferencialment expressats un número determinat de vegades a la condició problema respecte al control. Per exemple, si es vol generar una llista dels gens diferencialment expressats 2 vegades, es consideraran gens sobreexpressats aquells que presentin com a mínim una expressió del doble respecte al control, i seran gens infraexpressats aquells que tinguin, com a mínim, la meitat de la expressió present al control.

3.2.4.2- Comparacions de llistes amb Diagrames de Venn

Els diagrames de Venn són diagrames esquemàtics que s'utilitzen per tal de representar grups d'objectes tot representant les seves relacions (Chen, 2004). Els diagrames de Venn consisteixen en cercles solapats. Cada cercle representa un grup d'objectes. L'àrea solapada entre els cercles (intersercció) representa els objectes comuns entre els dos

grups. D'aquesta manera, si disposem en cadascun dels cercles els membres d'una llista de gens diferencialment expressats, la intersecció representaria els gens comuns entre les diferents llistes utilitzades.

3.2.4.3- Agrupament jeràrquic

En el cas de voler analitzar diferents línies cel·lulars conjuntament mitjançant agrupament jeràrquic (*hierarchical clustering*), cal importar totes les mostres conjuntament i crear un experiment amb totes elles. Els dos primers passos de la normalització són els mateixos que per una anàlisi bàsica, i en el tercer pas es normalitzen les mostres per la mediana de totes les mostres. Es genera una llista amb tots els gens que tinguin un valor de significació inferior a 0.05, incloent *Multiple Testing Correction (Benjamini and Hochberg false discovery rate)*, en almenys dues de les línies cel·lulars analitzades. S'utilitza un mètode d'agrupament jeràrquic inclòs a GeneSpring GX que permet agrupar els gens segons les semblances que presentin en els seus patrons d'expressió en cadascuna de les mostres. S'utilitza la matriu de distància anomenada correlació de Pearson i l'enllaç mitjà (*average linkage*) com a algoritme d'agrupament.

3.2.4.4- Mapes biològics pre-establerts

Existeixen vies de senyalització pre-establertes disponibles en diferents recursos d'internet que es poden importar al programa GeneSpring GX v7.3.1. Cal descarregar aquestes vies (les més comunes són de la *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG)* i la GenMAPP) i posteriorment incorporar-les al programa. La selecció d'una llista de gens diferencialment expressats prèviament generada i d'un dels mapes pre-importats permet visualitzar els nivells d'expressió de cadascun dels gens presents en la via seleccionada.

3.2.5- Construcció de BANs amb Pathway Architect

Les anàlisis tradicionals d'expressió gènica a partir de dades dels microarrays permeten identificar gens diferencialment expressats entre les condicions experimentals. De totes maneres, és difícil explorar per separat cadascun dels gens inclosos a les llistes obtingudes de les anàlisis estadístiques. És per això que, un cop identificats els gens

d'interés amb GeneSpring, és convenient situar aquestes troballes estadísticament significants en un context biològic. Aquesta aproximació es pot dur a terme utilitzant el programa informàtic Pathway Architect (Stratagene).

3.2.5.1- Construcció bàsica

És necessari importar una llista que inclogui, com a mínim, un identificador per a cada gen. A partir d'aquesta llista, el programa identifica els gens i crea una entitat per cadascun d'ells. Inicialment, es pot realitzar una anàlisi simple, en la qual es poden seleccionar categories pre-establertes, per exemple la visualització de les dianes o dels reguladors dels gens de la llista. També es pot realitzar una anàlisi de les interaccions rellevants a nivell de reguladors transcripcionals, modificacions post-traduccionals o regulació del metabolisme, entre d'altres. Ambdues aproximacions són útils per crear una visió que serveixi de punt de partida de la investigació. Complementàriament, es pot procedir a una anàlisi avançada de les interaccions rellevants, que permet especificar diferents criteris per filtrar les relacions que s'estableixen entre els gens. Normalment s'escull la opció d'expandir les interaccions i es seleccionen les relacions d'expressió, unió, regulació, unió al promotor, metabolisme i modificació, mostrant només les proteïnes en la visió final.

3.2.5.2- Sobreposició de la expressió gènica

En el cas de voler sobreposar els valors d'expressió al BAN construït tal com s'ha descrit anteriorment, cal haver importat prèviament els valors d'expressió amb la llista de gens. S'ha de tenir en compte que els valors decimals han de ser punts i no comes. Per fer efectiva la sobreposició, cal anar a la opció *data overlay* del navegador de la dreta de la pantalla i seleccionar, dins del tipus de visualització, "colorejar per columna". Un cop seleccionada la columna corresponent als valors d'expressió, es pot ajustar el color dels gens sobreexpressats (normalment el vermell) i dels gens infraexpressats (blau o verd). Normalment cal ajustar el valor de no variació a la unitat, i establir com a sobreexpressats valors a partir de cinc. Aquests ajustaments es realitzen per obtenir una coloració dels nodes més ajustada a la realitat.

3.2.6- Anàlisi integrada amb GeneSpring GX v 10.0

GeneSpring GX v10.0 permet realitzar anàlisis d'expressió gènica més ràpides, fàcils i robustes que amb la versió anterior. A més, inclou eines que permeten l'anàlisi integrada de les dades, tot facilitant el descobriment de relacions entre els gens i la comparació entre diferents tipus de dades. Així, el resultat final és la identificació de gens rellevants tan estadísticament com biològicament.

3.2.6.1- Importació de les Dades

GeneSpring GX v10.0 organitza les dades en projectes. Cada projecte pot incloure un o més experiments representatius de diferent tipus de dades, plataformes o organismes. Aquest tipus d'organització permet comparar fàcilment resultats d'experiments relacionats que estiguin englobats en un mateix projecte. Per a cada experiment, els resultats de les anàlisis es guarden de forma jeràrquica, tot mantenint l'ordre i la dependència dels resultats obtinguts seqüencialment.

Primer de tot cal generar un projecte, en el qual es poden crear diferents experiments. Per crear un nou experiment, cal definir el tipus d'experiment dins d'una llista pre-establerta. En el cas que el tipus d'experiment que vulguem analitzar no estigui comprès en aquesta llista, es pot crear una nova tecnologia.

El pas següent és la importació de les dades. Cal seleccionar els arxius referents a cadascuna de les mostres a analitzar, en format .cel o .chp en el cas d'experiments d'expressió o en format .txt en la majoria dels altres casos. Un cop importats dins de GeneSpring GX, aquests arxius es poden utilitzar en altres experiments a través de la opció 'seleccionar mostres' en el procés d'importació de les dades.

3.2.6.2- Anàlisi de les dades

El programa ofereix la opció de fer una anàlisi guiada dels resultats, que es podria considerar bàsica, o una anàlisi avançada.

3.2.6.2.1- Anàlisi guiada

Aquest tipus d'anàlisi passa per una sèrie de passos seqüencials que representen les anàlisis que es realitzen més freqüentment amb dades d'expressió. Aquests passos inclouen, primer de tot, un resum de les dades en el qual es mostra la distribució dels valors d'intensitat per a cada mostra. Les dades es normalitzen automàticament per la mediana de l'expressió de totes les mostres. En el pas següent, a l'igual que a la versió 7.3 del programa, cal afegir un paràmetre que permeti agrupar les mostres segons la condició a la que pertanyen (sensible o resistent al MTX). El tercer pas fa referència al control de qualitat de les mostres. Es presenta una representació de PCA indicativa de les semblances a nivell general entre les mostres de l'experiment. A continuació s'aplica un filtre basat en la intensitat del senyal de cada gen. Es seleccionen per defecte els gens que presenten valors entre el 20 i el 100 percentils. El següent filtre, basat en anàlisis estadístiques, selecciona els gens amb una expressió diferencial significativa. Els valors de defecte són: *T-test unpaired*, *p-value* de 0.05 i *Multiple testing correction* de Benjamini-Hochberg. Els gens que hagin passat el filtre de significació, són filtrats per *fold-change*, i els que presentin una expressió diferencial igual o superior a 2 seran classificats per Gene Ontology. Aquesta classificació permet categoritzar els gens en processos biològics, funcions moleculars o components cel·lulars. L'últim pas de l'anàlisi guiada permet trobar xarxes que hagin estat generades anteriorment i que continguin gens presents a la nostra llista. Totes les llistes generades es disposen jeràrquicament dins la carpeta d'anàlisis. Es poden canviar els valors que apareixen per defecte per tal d'adaptar els resultats derivats de les anàlisis a les expectatives de l'usuari. En aquest cas, però, és més pràctic realitzar una anàlisi avançada.

3.2.6.2.2- Anàlisi avançada

Amb l'anàlisi avançada, l'usuari pot escollir els passos a seguir per a l'anàlisi de les dades. Un cop importades les dades, existeix un pas de processament previ, que permet normalitzar totes les mostres per les mostres control, prèviament identificades com a tals. En aquest tipus d'anàlisi és útil seguir unes etapes que vénen marcades per diferents pestanyes localitzades a la part dreta de la pantalla.

A) Dins la pestanya **estructuració de l'experiment**, primer de tot cal agrupar les mostres segons la condició (sensible o resistent). Aquesta classificació permetrà crear dos tipus d'interpretació dels resultats, una en la que es mostren totes les mostres per separat, i que permet veure com de semblants són entre elles, i una altra interpretació amb la mitjana de les mostres en la mateixa condició, que posarà de manifest diferències entre les dues condicions assajades.

B) Dins la pestanya de **control de qualitat**, es sol utilitzar el control de qualitat sobre les mostres, que presenta una anàlisi de PCA, a l'igual que en l'anàlisi guiada. És un punt informatiu sense massa rellevància.

C) La pestanya d'anàlisi ens ofereix dos punts interessants, el filtre per volcano plot i l'anàlisi d'agrupament.

En el **filtre per volcano plot**, un cop seleccionada la llista a utilitzar (normalment la de tots els gens) i la interpretació (sensible vs resistent), el programa realitza un T-test i ofereix la possibilitat d'aplicar (o no) correccions a les dades (*multiple testing correction*, MTC). Tot i que no és indispensable, sí que és recomanable aplicar aquest tipus de correccions. Existeixen diferents tipus de MTC, però la correcció més permissiva entre les disponibles al programa i que a més és la més utilitzada en anàlisis de resultats de microarrays s'anomena *Benjamini Hochberg False discovery rate*. Es pot canviar el punt de tall de *p-value* així com també el *fold-change* segons les expectatives.

La opció d'**agrupament** (*clustering*) permet agrupar els gens o les condicions. Per tal de comprovar les similituds entre les diferents mostres, cal seleccionar la llista que inclou tots els gens, la interpretació que comprèn totes les mostres i l'algorisme jeràrquic. Cal també especificar que l'agrupament de les condicions es faci amb la mesura de distància centrada de Pearson i l'enllaç mitjà (*average linkage*). Aquesta anàlisi genera un dendrograma que haurà ajuntat, òptimament, les tres mostres sensibles per una banda i les tres resistents per l'altra.

D) La pestanya d'interpretació dels resultats ens permet crear **networks** (xarxes) amb les llistes prèviament generades. Es pot realitzar una anàlisi simple, que inclou categories pre-establertes per crear d'una manera ràpida una visió que serveixi de punt

de partida de la investigació. Aquesta anàlisi simple permet escollir entre diferents opcions, com la visualització de les dianes o dels reguladors dels gens de la llista, així com dels seus reguladors transcripcionals, o dels seus modificadors. L'anàlisi avançada permet especificar diferents criteris per filtrar les relacions que s'estableixen entre els gens. Normalment s'escull la opció d'expandir les interaccions i es seleccionen les relacions per expressió, unió, regulació, unió al promotor, metabolisme i modificació, mostrant només les proteïnes en la visió final.

3.2.7- Dipòsit dels resultats dels microarrays al GEO.

El Gene Expression Omnibus (GEO) és una base de dades dependent de l'NCBI on es poden dipositar els resultats obtinguts amb tècniques d'obtenció de dades a gran escala, com els microarrays.

Per dipositar les dades, cal connectar-se a GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) i seleccionar dipòsit a la web. Cal carregar cada mostra per separat, ajustar el tipus d'experiment a basat en arrays, canal senzill, i buscar la plataforma exacta que s'ha utilitzat dins d'una llista de possibilitats. També cal especificar que es tracta de dades processades. Es busca l'arxiu corresponent a la primera mostra en format .txt. Cada arxiu conté una columna anomenada *Value* que correspongui al senyal de la hibridació, una columna anomenada *Abs_Call* que indica si els senyals es consideren presents o absents, i una columna anomenada *Detection p-value* que informa dels valors estadístics de la detecció del senyal al microarray. Un cop reconegut l'arxiu, s'especifiquen les característiques de la mostra, tals com el tipus de mostra, l'organisme, els protocols de marcatge, hibridació i escaneig (Protocol d'Affymetrix pel tipus de microarray utilitzat), o el processament realitzat a la mostra (MAS 5.0 non-scaled). Els arxius també es carreguen sense processar en format .cel.

Un cop carregades totes les mostres, es crea una sèrie que agrupa totes les mostres referents a un mateix experiment. Es seleccionen totes les mostres que conformaran la sèrie i s'especifica un títol, un resum i una descripció del disseny global de l'experiment.

Resultats

4.1- ARTICLE I:

Transcriptional regulation of aldo-keto reductase 1C1 in HT29 human colon cancer cells resistant to methotrexate: Role in the cell cycle and apoptosis .

Elisabet Selga, Veronique Noe & Carlos J. Ciudad

Biochemical Pharmacology 75 (2008) 414 - 426

Estudis previs del grup utilitzant la tecnologia dels macroarrays, havien permès la identificació de gens diferencialment expressats en cèl·lules humanes HT29 de càncer de colon resistents a 10^{-5} M de MTX. Les validacions funcionals d'aquestes dianes emprant inhibidors químics, tecnologia antisentit o mitjançant vectors d'expressió van demostrar una sensibilització al MTX.

El número de gens analitzables amb un macroarray condiona la obtenció d'informació de les mostres. És per aquest motiu que es va realitzar un estudi de la expressió gènica diferencial en la resistència al MTX mitjançant la utilització de microarrays que comprenien 22.300 transcrits i variants. Entre els gens diferencialment expressats més de 5 vegades, amb un valor de significació estadística inferior a 0.05, existien diferents membres de la família de les Aldo-ceto reductases (AKRs). Ens vam centrar en la AKR1C1, ja que estava descrita la seva relació amb el càncer i amb la resistència a quimioteràpics.

Un cop validada la sobreexpressió de l'AKR1C1 a les cèl·lules resistents, tan a nivell d'mRNA com a nivell de proteïna (Figura 1), vam comprovar que aquesta sobreexpressió no era deguda a un augment en el número de còpies a nivell de DNA (Figura 2), pel que vam iniciar l'estudi de la regulació transcripcional del gen.

Vam comprovar, mitjançant assaigs de gen reporter, que el promotor de l'AKR1C1 estava principalment regulat a les cèl·lules resistents per la unió del factor de transcripció Sp1 a una caixa GC localitzada a -73 respecte l'inici de traducció. Sp3, un altre factor de transcripció de la mateixa família, també era capaç de regular aquest

Resultats

promotor, tot i que en menor grau (Figura 5). Complementàriament, es van realitzar assaigs de retardació de la movilitat electroforètica que van permetre comprovar que Sp1 i Sp3 eren capaços d'unir-se *in vitro* a la seqüència del promotor proximal de l'AKR1C1 (Figura 6).

Els nivells de proteïna Sp1 no explicaven les diferències de regulació observades en les cèl·lules resistents. El tractament dels extractes nuclears amb fosfatasa alcalina ens va permetre comprovar que la major unió de Sp1 i Sp3 a les cèl·lules resistents era deguda a un increment en l'estat de fosforilació d'ambdós factors de transcripció en aquesta línia cel·lular (Figura 7).

També vam realitzar validacions funcionals de la diana que ens van permetre demostrar la implicació de l'AKR1C1 en la resistència al MTX:

I) La utilització d'un siRNA dirigit contra l'mRNA de l'AKR1C1 va disminuir específicament els nivells d'mRNA de la diana. Aquest tractament va permetre sensibilitzar les cèl·lules al MTX (Figura 8).

II) La sobreexpressió de l'AKR1C1 mitjançant un plàsmid d'expressió va conferir una major resistència al MTX a les cèl·lules HT29 sensibles (Figura 9).

Per acabar d'esbrinar el paper que podia jugar la sobreexpressió de l'AKR1C1 a les cèl·lules HT29 resistents, vam realitzar estudis de cicle cel·lular i d'apoptosi (Figura 10). La sobreexpressió del gen mitjançant el seu plàsmid d'expressió va aconseguir revertir el bloqueig en la fase S del cicle i l'apoptosi causada pel MTX.

En resum, es va estudiar la regulació transcripcional de l'AKR1C1, principalment mitjançada per Sp1, i es va demostrar el paper del gen en la resistència al MTX, així com també la seva relació amb el cicle cel·lular i amb l'apoptosi.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Transcriptional regulation of Aldo-keto reductase 1C1 in HT29 human colon cancer cells resistant to methotrexate: Role in the cell cycle and apoptosis

Elisabet Selga, Véronique Noé, Carlos J. Ciudad*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 July 2007

Accepted 29 August 2007

Keywords:

Methotrexate

AKR1C1

Transcriptional regulation

Sp1 binding

DHFR

Drug-resistance

ABSTRACT

While studying differentially expressed genes between sensitive and 10^{-5} M Methotrexate (MTX) resistant HT29 human colon cancer cells, we identified some members of the Aldo-keto reductase (AKR) superfamily. The study was followed with the member AKR1C1 (EC 1.1.1.213), validating its increase in mRNA and protein levels in MTX resistant cells. The genomic content for AKR1C1 remained unchanged between sensitive and resistant cells, thereby excluding a mechanism of AKR1C1 gene amplification. Thus, we cloned the AKR1C1 human promoter and performed luciferase experiments that revealed a transcriptional regulation of the gene in the resistant cells. Computational studies showed a putative binding site for the transcription factor Sp1. The co-transfection of Sp1 or Sp3 with different constructs of AKR1C1 promoter deletions, including and excluding the proximal GC-box, demonstrated a key role for these factors in regulating AKR1C1 transcriptional activity. Gel-shift assays revealed an increase in Sp1 and Sp3 binding in resistant compared to sensitive cells, without differences in Sp1 protein levels. Dephosphorylation of the extracts coincided with a decrease in Sp1 binding, which is consistent with a process of regulation of Sp1 by phosphorylation. We also investigated the possible relationship between AKR1C1 expression and MTX action. Overexpression of AKR1C1 counteracted the S-phase accumulation of cells and apoptosis caused by MTX treatment. This suggests a role of AKR1C1 in cell proliferation. Finally, overexpression of AKR1C1 in MTX sensitive HT29 cells conferred resistance to the chemotherapeutic agent and silencing of AKR1C1 by means of iRNA technology sensitized the cells to MTX.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Dihydrofolate reductase (DHFR), a key enzyme of the folate cycle and the one carbon unit metabolism [1–3], catalyzes the NADPH-dependent reduction of 7,8-dihydrofolate (DHF) to 5,6,7,8-tetrahydrofolate (THF) [4]. DHFR enzymatic activity is

necessary for the biosynthesis of purines and thymidylate that are needed for cell proliferation. Methotrexate (MTX) is a 4-amino 10-methyl analog of folic acid that inhibits DHFR activity by competing with DHF for the active site. MTX was one of the first antimetabolite drugs developed and nowadays continues to play an important role in the chemotherapy of

* Corresponding author. Tel.: +34 93 403 4455; fax: +34 93 402 4520.
E-mail address: cciedad@ub.edu (C.J. Ciudad).

Abbreviations: AKR1C1, Aldo-keto reductase 1 member C1; MTX, methotrexate; DHFR, dihydrofolate reductase; Sp1, specificity protein 1; APRT, adenine phosphoribosyltransferase.

0006-2952/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcp.2007.08.034

human malignancies such as acute lymphoblastic leukemia, lymphoma, osteosarcoma, breast cancer, and head and neck cancer [5,6]. Unfortunately, the efficacy of this chemotherapeutic agent is often compromised by the development of resistance in cancer cells.

The identification of suitable genes to target in combination with MTX could be a strategy to minimize the development of resistance. To this end, we studied the gene expression profile in MTX resistance using the HG U133A 2.0 cDNA microarrays from Affymetrix containing 22,300 transcripts. The human colon adenocarcinoma cell line HT29 was chosen for this study because it can be adapted to grow in high concentrations of MTX [7] and concomitantly develop amplification of the *dhfr* gene [8]. Among the genes whose expression is changed in cells with acquired resistance to 10^{-5} M MTX, we noted some members of the aldo-keto reductase (AKR) superfamily.

Members of the AKR superfamily are monomeric cytoplasmic proteins of about 320 amino acid residues, which have related structures and common evolutionary origins [9]. These enzymes are present from prokaryotes to eukaryotes and they share similar sequences and properties [10–12]. The AKRs have been proposed to be involved in detoxification processes [11,13–15], as they can catalyze the NAD(P)H-dependent oxidation of a wide range of substrates [16]. Substrate specificity is dictated by the loops at the back of the structure. Fourteen families of AKRs exist, and the AKR1 family contains many of the human isoforms.

AKRs have previously been related to cancer. Hsu et al. [17] showed that AKR1C1, also known as Dihydrodiol dehydrogenase (DDH), is highly overexpressed in NSCLC patients and its high expression correlates with a poor prognostic outcome. Overexpression of AKR1C1 has also been found in esophageal cancer, and has been associated with disease progression [18]. This gene is upregulated in HER-2/neu-positive breast tumors, which could suggest an enhanced activation of the cellular detoxification processes within the breast tumor microenvironment [19]. In addition, AKRs contribute to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-induced oral carcinogenesis [20], as induced AKR1C isozymes can convert PAH trans-dihydrodiols to deleterious O-quinones that can cause oxidative DNA damage as well as change-in-function mutations in the p53 tumor suppressor gene [21].

AKR1C1 overexpression has also been related to drug-resistance in a variety of cancers. It has been proposed that the high similarity between the chemical structures of anticancer drugs and some compounds that can be metabolized by AKR1C1 could indicate that these drugs may be subject to this enzyme activity [17]. Several reports are in accordance with this hypothesis. On one hand, Ax et al. detected AKR1C1 overexpression in daunorubicin-resistant human stomach cancer cells and suggested an association of this enzyme to drug-resistance, which they postulated to be mediated through drug detoxification in these cancer cells [22], as it had been also proposed for NSCLC [17]. On the other hand, a study on human ovarian cancer cell lines indicated that overexpression of AKR1C1 was closely associated with resistance to cisplatin and probably to disease progression [23]. The same investigators suggested that an increase in AKR1C1 activity would be sufficient to detoxify ROS, induced by cisplatin, and could lead to apoptosis-related development

of drug-resistance [24]. Chen et al. [25] also correlated AKR1C1 expression with cisplatin-based chemotherapy resistance using epithelial ovarian cancer patient samples. In addition, Hung et al. [26] concluded that resistance to cisplatin, adriamycin and radiotherapy in lung adenocarcinoma cells was closely associated with AKR activity. Furthermore, increased expression of AKR1C1 in ethacrynic acid-induced drug-resistant human colon cancer cells has been also identified [27,28], and it has been proposed that this overexpression may give rise to an enhanced capacity to metabolize exogenous and endogenous substrates, thereby contributing to the drug-resistant phenotype.

In this work we detected an overexpression of AKR1C1 in HT29 MTX-resistant cells and proceeded with the study of the mechanism of action for this effect. We found that there is a transcriptional regulation of AKR1C1 in the resistant cells, which is mainly dependent on the transcription factor Sp1, and that AKR1C1 overexpression counteracts the effects of MTX both at the level of S-phase cell arrest and apoptosis.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Human colon adenocarcinoma cell line HT29 was routinely grown in Ham's F12 medium supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS, both from Gibco) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells resistant to 10^{-5} M MTX (HT29-R) were previously obtained in the laboratory upon incubation with stepwise concentrations of MTX (Lederle) in selective DHFR medium (–GHT medium) lacking glycine, hypoxanthine and thymidine, the final products of DHFR activity. This medium was supplemented with 7% dialyzed fetal bovine serum (above two from GIBCO). The starting conditions for obtaining the resistant cells were 3×10^6 HT29 parental cells treated with a concentration of 10^{-8} M MTX. The cells that survived were allowed to grow until subconfluence, and 70% of this population was incubated with 3×10^{-8} M MTX. The same process was repeated increasing the concentration of MTX by a factor of three until reaching 10^{-5} M. This subline is freely available upon request.

2.2. Microarrays

Gene expression was analyzed by hybridization to The GeneChip[®] Human Genome U133A 2.0 microarrays from Affymetrix, containing 22,300 transcripts and variants. Total RNA for cDNA arrays was prepared from triplicate samples using RNaseasy Mini kit (Qiagen) following the recommendations of the manufacturer. Labeling, hybridization and detection were carried out following the manufacturer's specifications.

2.3. Microarray data analysis

Quantification was carried out with GeneSpring GX 7.3 software (Silicon Genetics), which allows multi-filter comparisons using data from different experiments to perform the normalization, generation of restriction lists and the functional classification of

the differentially expressed genes. Normalization was applied in two steps: (i) "per Chip normalization" by which each measurement was divided by the 50th percentile of all measurements in its array; and (ii) "per Gene normalization" by which all the samples were normalized against the median of the control samples. The expression of each gene is reported as the ratio of the value obtained after each condition relative to control condition after normalization of the data. Then data were filtered using the control strength, a control value calculated using the Cross-Gene Error Model based on replicates [29]. Measurements with higher control strength are relatively more precise than measurements with lower control strength. Genes that did not reach this value were discarded. Additional filtering was performed to determine differentially expressed genes. On one hand, a restriction *p*-value of less than 0.05 was applied. The output of this analysis was then filtered by fold expression, selecting specifically those genes that had a differential expression of at least 5-fold.

2.4. RT-PCR

Levels of AKR1C1 mRNA were determined by RT-PCR under quantitative conditions. Total RNA was extracted from cells (4×10^6) using UltraspecTM RNA reagent (Biotecx) following the recommendations of the manufacturer. Complementary DNA was synthesized in a total volume of 20 μ l from RNA samples by mixing 1 μ g of total RNA, 125 ng of random hexamers (Roche), in the presence of 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 20 units of RNasin (Promega), 0.5 mM dNTPs (AppliChem), 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 60 min and the cDNA product was used for subsequent PCR amplification with specific primers. A standard 50 μ l mixture contained 5 μ l of the cDNA mixture, 1.2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2.5 μ Ci of [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol, Amersham Ibérica), 1.5 units of Taq polymerase (Ecogen), 500 ng of each primer and 20 mM Tris-HCl, pH 8.5. To avoid unspecific annealing, cDNA and Taq DNA polymerase were separated from primers and dNTPs by using a layer of paraffin (Fluka) (reaction components contact only when paraffin fuses, at 60 °C). PCR was performed in an MJ Research Thermocycler equipped with peltier system and temperature probe. Preliminary experiments were carried out using different number of cycles to determine the linear conditions of PCR amplification. The sequences of the forward and reverse specific primers used for PCR amplification and the length of the PCR product, are given below.

AKR1C1: 5'-GGTCACTTCATGCCTGTCTCG-3' and 5'-GTCTTCTCTC-TTCACACTGCCATC-3' (197 bp)
APRT: 5'-GCAGCTGGTTGAGCAGCGGAT-3' and 5'-AGAGTGGGGC-TGGCAGCTTC-3' (253 bp)

[α -³²P]dATP was used in the PCR to produce a radioactive product that could be detected with great sensitivity during the exponential phase of the reaction. After an initial denaturation for 2 min at 94 °C, PCR was performed for 20 cycles. Each cycle consisted of denaturation at 92 °C for 1 min, primer annealing at 59 °C for 1 min, and primer extension at 72 °C for 1 min. A final 7-min extension step at 72 °C was performed. Five microliters of each PCR sample was electro-

phoresed on a 1-mm-thick 5% polyacrylamide gel. The gels were dried and placed on contact with europium screens that were scanned using phosphorimaging. The expression of AKR1C1 mRNA is reported upon normalization using the APRT mRNA as internal control.

2.5. Preparation of cytoplasmic and total extracts for Western-blotting

Cytoplasmic extracts were obtained from HT29 or HT29-R cells. Cells were collected in ice-cold F-12 medium and centrifuged at $800 \times g$ for 5 min. The cell pellet was gently resuspended in 3 ml of hypotonic buffer (HB = 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM beta-mercaptoethanol, 15 mM Tris-HCl, pH 8). After centrifugation in the same conditions as above, it was resuspended in 100 μ l of hypotonic buffer containing 0.1% Triton X-100 and centrifuged at $13,000 \times g$ for 5 min. The resulting supernatant corresponded to the cytoplasmic extract. The entire procedure was carried out at 4 °C. Five microliters of the extract were used to determine protein concentration by the Bradford assay (Bio-Rad). The extracts were frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. One hundred micrograms of both cytoplasmic extracts were resolved on SDS 12%-polyacrylamide gels [30] and transferred to PVDF membranes (immobilon P, Millipore) using a semidry electroblotter. The membranes were probed with an antibody against AKR1C1 (Santa Cruz Biotechnology). Signals were detected by secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody and enhanced chemiluminescence, as recommended by the manufacturer (Amersham). To normalize the results, blots were re probed with an antibody against PPAR γ .

Total extracts from HT29 cells, either sensitive or MTX-resistant, were used to assay Sp1 protein levels. Cells were collected in ice-cold F-12 medium and centrifuged at $800 \times g$ for 5 min. The cell pellet was gently resuspended in 3 ml of HB and centrifuged in the same conditions than above. Afterwards, cells were resuspended in 100 μ l of deoxycholate buffer (100 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 1 M PMSF, 1% triton, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate) and centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min. The resulting supernatant corresponded to the total extract. The entire procedure was carried out at 4 °C. Protein concentration was determined by the Bradford assay and 40 μ g of both sensitive and resistant HT29 cells total extracts were resolved on SDS 7%-polyacrylamide gels. Transference to PVDF membranes was followed with incubation with an antibody against Sp1 (PEP2, Santa Cruz Biotechnology) and detection was accomplished by secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody and enhanced chemiluminescence.

2.6. Determination of AKR1C1 and DHFR copy number

HT29 or HT29-R cells (3×10^6) were washed twice in NaCl/P_i and scraped in 2 ml lysis buffer (400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, and 10 mM Tris/HCl, pH 7.4). Four hundred micrograms proteinase K was added to the lysate, which was then incubated for 2 h at 37 °C. Two purification steps and nucleic acid precipitation were followed by a 2 h-incubation at 37 °C in 40 μ g/ml RNase DNase free, and the same three steps were repeated after this incubation to obtain the genomic DNA. Five hundred nanograms of this DNA were used for PCR

amplification in a 50 μ l reaction containing 1.2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2.5 μ Ci of [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol, Amersham Ibérica), 1.5 units of Taq polymerase (Ecogen), 500 ng of each primer and 20 mM Tris-HCl, pH 8.5. The specific primers used for amplification were:

AKR1C1: 5'-GGTCACTTCATGCCTGTCCTG-3' and 5'-CTGTGACAA-GATGGCATTGCAG-3' Annealing in exon 1 and intron 2, respectively (PCR product of 194bp).
 APRT: 5'-CGGGAACCGCTCGTCTTTCGCC-3' and 5'-GCCTCGGGG-GCTCAATCTCAC-3' Annealing in intron 1 and intron 2, respectively (PCR product of 357 bp).

PCR was performed in an MJ Research Thermocycler equipped with peltier system and temperature probe and following the program described: after an initial denaturation for 3 min at 94 °C, PCR was performed for 22 cycles. Each cycle consisted of denaturation at 92 °C for 30 s, primer annealing at 59 °C for 1 min, and primer extension at 72 °C for 1 min. A final 7-min extension step at 72 °C was performed. Five microliters of each PCR sample was electrophoresed and scanned with Phosphorimaging.

DHFR copy number was assayed in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with 100 ng of genomic DNA and the assays-on-demand from Applied Biosystems: HS00758822-s1 for DHFR and HS00356991-m1 for APRT. The reaction was performed following the manufacturers recommendations.

2.7. Luciferase constructs

According to the NCBI mRNA reports, there could be complete AKR1C1 mRNA species initiating at -184 nt (NM_001353) and -17 nt (BC_00216) relative to the translational start. Taking into account this information, we proceeded to clone the AKR1C1 promoter from HT29 resistant cells. The PCR products

were sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v 2.0 (Applied Biosystems). No difference was observed when comparing this sequence with that reported in Genbank (Accession number AB032150). The Match™ software with TRANSFAC 6.0 database was used to determine the putative transcription factor binding sites present in AKR1C1 promoter. There is a putative Sp1 binding site at -74 from the translational start codon (ATG). Deletion constructs of the AKR1C1 promoter region were engineered by unidirectional cloning of PCR fragments from the AKR1C1 promoter between the NheI and XhoI sites of the reporter luciferase vector pGL3-basic (Promega). These PCR fragments were generated using a common reverse primer and three different forward primers. The forward primers were preceded by an arbitrary sequence (in lowercase, see below) including a NheI restriction site (underlined below) and the reverse primer followed a similar structure but contained a XhoI restriction site (underlined) in the arbitrary sequence.

Akr-pr241: 5'-tcaagtcaggctagcCTTCAGAGGAAATTAATGAGTG-3'
 AkR-pr84: 5'-tcaagtcaggctagcGTGTGCTCAGGGCGTTGCCAG-3'
 AkR-prDeletionSp1: 5'-tcaagtcaggctagcGCTCATTGCTCTTA-TAGCCTGTG-3'
 AkR-prRev: 5'-cagtgcctcagagGTCCTAGCCTGGCTGGCAAATG-3'

The PCR fragments generated were of 241 bp when using AkR-pr241, of 84 bp when AkR-pr84 was used and of 63 bp for the AkR-prDeletionSp1 primer. The 2 first constructs contained a putative Sp1 binding site while the third construct did not.

2.8. Transfections, co-transfections and luciferase assays

HT29 cells, either sensitive or MTX-resistant, were seeded into 6-well plates the day before transfection at a density of 2×10^5 cells/well in Ham's F12 medium containing 7% fetal bovine serum. Transfection was performed using FUGENE™ 6

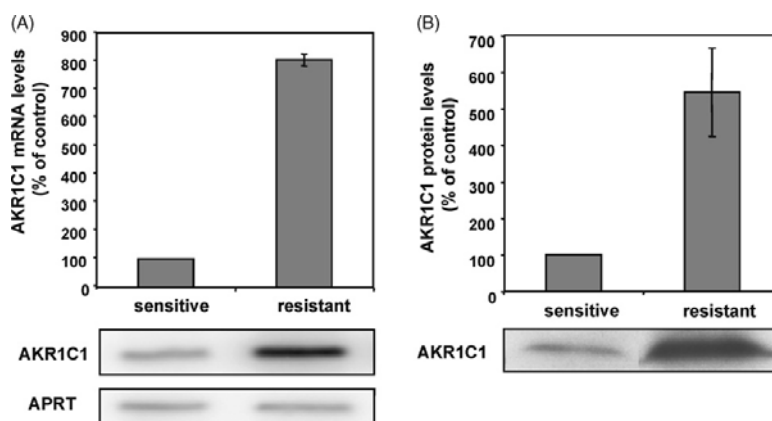


Fig. 1 – Validation of AKR1C1 upregulation. The overexpression of AKR1C1 was confirmed at the level of mRNA and protein in HT29 cells resistant to 10^{-5} M MTX. (A) AKR1C1 mRNA levels: 1 μ g of total RNA was used as starting material for the reverse transcriptase reaction. Quantitative RT-PCR was carried out as described in Section 2. Phosphorimaging analysis was used to quantify the intensity of the radioactive bands. Results are shown as mean \pm S.E.M. for triplicate samples. (B) AKR1C1 protein levels: Western blot assays of AKR1C1 were performed using 100 μ g of cytoplasmic extracts from either sensitive or MTX-resistant HT29 cells and AKR1C1 antibody (Santa Cruz). Results are shown as mean \pm S.E.M. for triplicate samples.

(Roche). For each well, 6 μ l of FUGENETM 6 in 100 μ l of serum-free medium was incubated at room temperature for 5 min. The mixture was added to increasing amounts of each promoter construct and incubated at room temperature for 20 min before addition to the cells. In co-transfections, 500 ng of each promoter construct was mixed together with 2 μ g of Sp1 or Sp3 before the addition of FUGENETM 6 in serum-free medium. Luciferase activity was assayed 30 h after transfection.

In all cases, cell extracts were prepared by lysing the cells with 200 μ l of freshly diluted 1x Reporter Lysis Buffer (Promega). The lysate was centrifugated at 13,000 \times g for 2 min to pellet the cell debris and the supernatants were transferred to a fresh tube. A 10- μ l aliquot of the extract was added to 25 μ l of the luciferase assay substrate (Promega) and the luminiscence of the samples was read immediately on a Gloomax 20/20 luminometer (Promega), in which the light production (relative light units, RLU) was measured for 10 s. Each transfection was performed in triplicate. Protein concentration was determined by the Bradford assay and used to normalize the results.

2.9. Gel-shift assays

Nuclear extracts were prepared from exponentially growing sensitive or resistant HT29 cells as described [31]. The probes were constructed by PCR amplification of different regions of AKR1C1 promoter sequence, bearing or not the putative Sp1 binding site (underlined), using different forward primers and a common reverse primer. A shorter ds probe of 22 bp was generated by annealing complementary single-stranded oligodeoxynucleotides corresponding to the putative Sp1 binding site present in the AKR1C1 promoter, using the AKR-pr84 and its complementary sequence.

AKR-pr84: 5'-GTGTGCTCAGGGGCGTTGCCAG-3'
 AKR-prDeletionSp1: 5'-GCTCATTGCTCTTATAGCCTGTG-3'
 AKR-prRev: 5'-GTCCTAGCCTGGCTGGCAAATG-3'

All the probes were gel-purified, end-labeled with T4 polynucleotide Kinase (New England Biolabs) and [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech), and used in the gel shift assays. DNA binding assays were performed as described [32] and were visualized using a phosphorimaging.

In the supershift experiments, 1 μ g of rabbit polyclonal antibody PEP-2 or 1 μ g of rabbit polyclonal antibody D-20 (against Sp1 and Sp3, respectively) (both from Santa Cruz) were added to the reaction mixture 15 min after the addition of the probe and incubated for an additional period of 15 min.

For phosphatase treatments, nuclear extracts were incubated with different amounts of Alkaline Phosphatase (0.2–1 U) (Sigma) for 30 min on ice. The reaction was stopped by the addition of 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate and 2 mM Na₃VO₄ before proceeding to the binding reaction thereby preventing the dephosphorylation of the probe. Control extracts were also incubated with the phosphatase inhibitors before proceeding to the gel retardation assays.

2.10. Functional validations

2.10.1. Transfection of siRNAs against AKR1C1

HT29 cells (30,000) were plated in 1 ml of -GHT medium. Transfection was performed 18 h later with a specific siRNA

designed against AKR1C1 RNA (siAKR). For each well, 4 μ l of Lipofectamine (Invitrogen) in 100 μ l of serum free -GHT medium were mixed in Eppendorf tubes with 100 nM siAKR in 100 μ l of serum free -GHT medium, and this mixture was incubated at room temperature for 20 min before addition to the cells. MTX (5×10^{-8} M) was added 48 h after siRNA treatment and cells were incubated for seven days before the MTT assays were performed [33]. When screening for AKR1C1 mRNA levels after siRNA treatment, 10,000 cells were incubated with increasing amounts of either siAKR (3–100 nM) or siAKR-4MIS (3–30 nM) maintaining a 3:1 (μ l of Lipofectamine: μ g siRNA) ratio and following the procedure previously described. Cells were collected 48 h after siRNA treatment for quantitative RT-PCR. The specificity of siAKR was tested at different levels: (i) computationally since BLAST analysis of this sequence reported AKR1C1 as the only mRNA hit; (ii) siAKR treatment did not cause significant effects on mRNA levels for other cellular genes such as Sp3, TBK1 (tank binding kinase) or cyclophilin (data not shown); and (iii) siAKR-4MIS bearing 4 mismatches with respect to siAKR (underlined) did not produce a decrease in AKR1C1 mRNA. The sequences for both siRNAs were:

siAKR: 5'-AUCACCAAGCAGGAGAGAU^TT-3'
 siAKR-4MIS: 5'-AUGUGGAAGCAGGAGAGAU^TT-3'

2.10.2. Transfection of an expression plasmid coding for AKR1C1

HT29 cells were seeded into 6-well plates at a density of 2×10^4 cells/well in 2 ml of HAM F12 selective medium. 18 h later, transfections with an expression plasmid for AKR1C1 (pCMV6-XL5-AKR1C1, kindly provided by Dr. Simpkins, Temple University, Philadelphia) in the presence or absence of MTX were performed. The overexpression of AKR1C1 was monitored by determining its mRNA levels after 24 and 48 h upon transfection of this plasmid. For each well, 3 μ l of FUGENETM 6 (Roche) in 100 μ l of serum free -GHT medium was incubated at room temperature for 5 min. Then, this mixture was added to 10 μ g of the DNA and, after 20 min at room temperature, added to the cells. When combining pCMV6-XL5-AKR1C1 transfection and MTX treatment, 3×10^{-8} M MTX was added 24 h after transfection. The effect of FUGENETM 6 in MTX effectiveness was assessed with the corresponding controls. Seven days later, the viability was measured by the MTT assay.

2.11. Cell cycle analysis

HT29 sensitive cells (10^5) were seeded into 6-well plates in 1 ml of -GHT selective medium. Eighteen hours later, transfections with 10 μ g of pCMV6-XL5-AKR1C1 were performed as previously described. MTX (3×10^{-8} M) was added 1 h after transfection. Forty-eight hours later, nuclei were stained with 50 μ g/ml propidium iodide (Sigma) and cell cycle distribution was monitored on a Beckman Coulter Epics XL flow cytometer.

2.12. Apoptosis

Seeding and treatment of HT29 sensitive cells with pCMV6-XL5-AKR1C1 was performed as in cell cycle assays. AKR1C1 plasmid was allowed to express for 24 h and MTX was added

during the last 6 h of treatment. Caspase 3/7 activation was assayed with Caspase-Glo 3/7 Assay Kit (Promega) in a Goomax 20/20 luminometer (Promega), expressed as percentage of relative light units (RLU) referred to the control and normalized by protein content determined by the Bradford assay.

3. Results

3.1. Members of an AKR subfamily are overexpressed in HT29 MTX-resistant cells

The expression profile of the 22,300 transcripts and variants included in the HG U133A 2.0 from Affymetrix was compared between sensitive HT29 cells and resistant to 10^{-5} M MTX. Among the differentially expressed genes that passed the filters described in Section 2 using the specific software GeneSpring GX v7.3.1, we directed special attention on some members of the AKR1 family among the list of genes overexpressed more than 5-fold (Table 1). We continued the studies with AKR1C1 and, as shown in Fig. 1, we validated its overexpression in MTX resistant cells at the mRNA and protein level by quantitative RT-PCR and Western Blot analysis, respectively.

3.2. AKR1C1 and DHFR copy-number in HT29 sensitive and MTX-resistant cells

To test whether AKR1C1 overexpression in HT29 MTX-resistant cells was due to gene amplification, we used quantitative PCR to determine the copy number for AKR1C1. No variation was observed in the genomic content for this gene between HT29 sensitive and resistant cells, as shown in Fig. 2A. DHFR copy number was assayed as a control of gene amplification in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System, and a 11-fold increase in DHFR copy number was observed in HT29 resistant cells (Fig. 2B). DHFR amplification we demonstrate is in accordance with bibliography describing this phenomenon as a mechanism for MTX-resistance [34–37].

3.3. Transcriptional regulation of AKR1C1 promoter

Since gene amplification was not the process responsible for AKR1C1 overexpression in the resistant cells, we proceeded to test whether this effect was due to gene promoter transcriptional regulation. We cloned different deletion constructs of the human AKR1C1 5'-flank into the pGL3 luciferase reporter, and these constructs were transiently

Table 1 – List of genes overexpressed more than 5-fold in HT29 cells resistant to 10^{-5} M MTX

Genbank	Symbol	Gene name	Ratio	Raw expression	p-Value	Gene function
NM_002414	CD99	CD99 antigen	37.3	26 to 1048	1.4E–04	Cell adhesion
M33376	AKR1C2	Aldo-keto reductase 1C2	21.4	154 to 3274	1.6E–04	Bile acid transporter
S68290	AKR1C1	Aldo-keto reductase 1C1	19.3	206 to 3972	2.4E–04	Xenobiotic metabolism
NM_000767	CYP2B6	Cytochrome P450, 2B6	16.8	21 to 359	3.4E–04	Monoxygenase
AL533838	MGC8685	Tubulin	14.6	17 to 261	1.1E–03	Structural molecule
NM_020299	AKR1B10	Aldo-keto reductase 1B 10	13.5	62 to 844	1.5E–04	Aldehyde reductase
AB028021	FOXA2	Forkhead box A2	11.2	27 to 322	1.2E–03	Transcription factor
M28882	MCAM	Melanoma cell adhesion	10.5	22 to 246	8.8E–05	Cell adhesion
NM_000791	DHFR	Dihydrofolate reductase	10.1	18 to 199	8.4E–04	Dihydrofolate reductase
NM_000029	AGT	Angiotensinogen 8	8.7	51 to 480	7.5E–04	Endopeptidase inhibitor
NM_012446	SSBP2	ssDNA binding protein 2	8.4	19 to 174	1.7E–03	ssDNA binding
NM_001216	CA9	Carbonic anhydrase IX	8.0	60 to 517	1.5E–04	Carbonate dehydratase
AF054841	TM4SF7	Transmembrane 4, 7	7.9	72 to 615	2.9E–03	–
BF726531	AQP5	Aquaporin 5	7.7	144 to 1166	2.9E–03	Transporter
M25915	CLU	Clusterin	7.5	76 to 619	2.2E–04	–
NM_000712	BLVRA	Biliverdin reductase A	7.4	37 to 297	4.5E–05	Biliverdin reductase
NM_001958	EEF1A2	e. elongation factor 1A2	6.5	281 to 1951	1.2E–03	Translation elongation
BC006471	AF1Q	ALL1-fused from chr1q	6.4	20 to 141	3.0E–04	–
NM_000047	ARSE	Arylsulfatase E	6.4	54 to 374	2.9E–03	Arylsulfatase
U73936	JAG1	Jagged 1	6.3	79 to 527	3.8E–03	–
A1471375	PRKCA	Protein kinase C, alpha	6.1	19 to 129	9.7E–04	Protein kinase C
AF018081	COL18A1	Collagen, type XVIII, A1	6.1	32 to 208	1.1E–03	Cell adhesion
AW192795	MUC5AC	Mucin 5, A and C	5.9	83 to 535	2.2E–03	–
NM_015974	CRYL1	Crystallin, lambda 1	5.6	48 to 292	5.1E–04	Oxidoreductase
NM_000610	CD44	CD44 antigen	5.6	124 to 758	3.2E–04	Hyaluronic acid binding
NM_001975	ENO2	Enolase 2 gamma	5.5	38 to 227	1.8E–03	PEP hydratase
BC005902	BLVRA	Biliverdin reductase A	5.3	53 to 307	3.7E–04	Biliverdin reductase
AB018580	AKR1C3	Aldo-keto reductase 1C3	5.2	411 to 2.150	1.5E–04	Prostaglandin metabolism
NM_005165	ALDOC	Aldolase C	5.0	73 to 396	3.9E–03	Fructose-P2 aldolase

It is shown the GenBank accession number of genes in the AKR superfamily that were overexpressed in HT29 cells resistant to 10^{-5} M MTX. The ratio column corresponds to the fold change in expression of each gene relative to the control. The change in the actual numerical values of the expression between sensitive (left) and resistant (right) cells is given in the row expression column. The last column indicates the functional categories to which the genes belong. Results are the mean of three independent experiments performed for each condition. t-test p-value was less than 0.001 for all the samples.

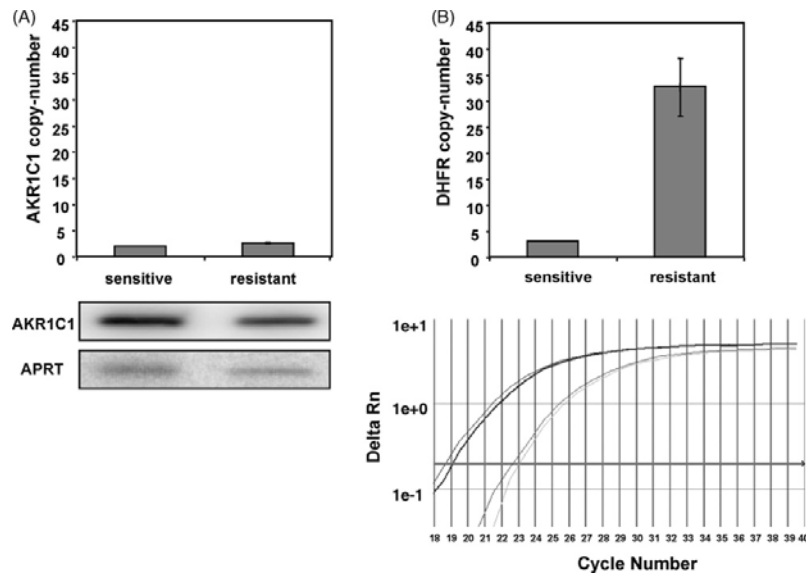


Fig. 2 – AKR1C1 and DHFR copy-number in HT29 cells. Genomic DNA prepared from HT29 cells, either from sensitive or MTX-resistant, was used to determine the AKR1C1 and DHFR copy number in both cell types. (A) AKR1C1 copy number was performed by quantitative PCR as described in Section 2. The intensity of the radioactive bands was quantified by using phosphorimaging and the APRT signal was used to normalize the results (mean \pm S.E.M. for triplicate samples). (B) DHFR copy number was determined by Real-time PCR using 100 ng of each DNA for the reaction, which was carried out as described in Section 2. Results are shown as mean \pm S.E.M. for triplicate samples. The two amplification curves to the left of the graph correspond to the resistant cells, and the two to the right correspond to sensitive cells.

transfected into HT29 cells, either sensitive or MTX-resistant. When a construct containing 241 bp of the AKR promoter was used (AKR-pr241), a 1400-fold increase with respect to the empty vector was observed in the resistant

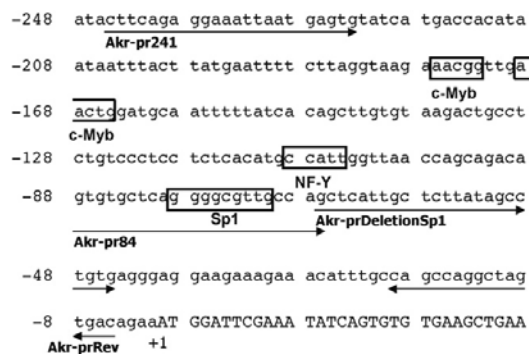


Fig. 3 – Human AKR1C1 promoter sequence. AKR1C1 5'-flank was obtained from Genbank (accession number AB032150). Putative transcription factors binding sites present in the AKR1C1 promoter were searched using the MatchTM software and the TRANSFAC 6.0 database. There is a putative Sp1 binding site at -74 from the translational start codon (ATG) (+1). Primers used for the generation of luciferase constructs and gel shift probes, including and excluding the GC-box, are designed as arrows.

cells (Fig. 4A). A 55-fold increase resulted from the transfection of a construct bearing only 84 bp of the promoter (AKR-pr84) in HT29 resistant cells (Fig. 4B). On the other hand, only a 5-fold increase was produced (Fig. 4C) when the transfected construct (AKR-prDeletionSp1) did not include a putative Sp1 binding site, which was present in the two previous constructs. However, when any of the 3-abovementioned constructs was transfected in HT29 sensitive cells, the promoter activity was not significantly different from the luciferase activity obtained when an empty vector was transfected (Fig. 4, A-C). Next, co-transfection studies of AKR-pr84 or AKR-prDeletionSp1 together with an expression vector for Sp1 were performed. As shown in Fig. 5A, co-transfection of AKR-pr84 with Sp1 in HT29 resistant cells led to an increase in promoter activity of 4-fold relative to the AKR-pr84 construct alone. However, co-transfection of AKR-prDeletionSp1 together with Sp1 showed no variation in promoter activity. If these co-transfection experiments were performed in HT29 sensitive cells, no significant increases were observed in any of the conditions. When the co-transfections were performed with an expression vector for Sp3, an increase in AKR1C1 transcription was observed although to about half of the activity detected upon co-transfection with Sp1 (Fig. 5B). These results demonstrated that AKR1C1 promoter was mainly regulated in the resistant cells by Sp1 binding to its GC-box located at -74 from the translational start codon (Fig. 3) and also by Sp3 but to a lesser extent.

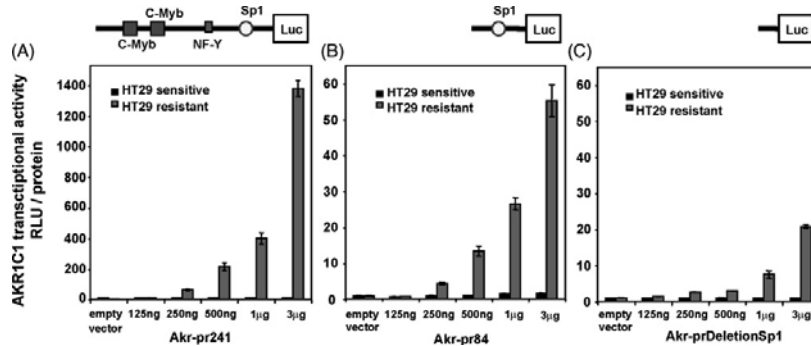


Fig. 4 – Transcriptional regulation of AKR1C1 promoter. (A, B and C) Transfections of deletion constructs of the AKR1C1 promoter into HT29 cells. Sensitive or resistant to MTX cells were transiently transfected using the amounts of plasmid DNA shown in the figure. Thirty hours after transfection, luciferase (Luc) activity was assayed. The protein content was used to normalize the luc activity (relative light units, RLU) for each sample and is expressed relative to that of pGL3 basic vector (mean \pm S.E.M. for triplicate wells). A schematic representation of each deletion construct used in the luciferase assays is shown on top of the figure.

3.4. Binding analysis of AKR1C1 promoter

By computational analysis, a putative Sp1 binding site was found in the AKR1C1 promoter sequence (Fig. 3). A probe of 84 bp (AKR-pr84) containing nucleotides –88 to –5 relative to ATG that included this GC box was used in gel shift assays to test for Sp1 binding. As shown in Fig. 6A, 2 bands were obtained by using nuclear extracts from either HT29 sensitive or resistant cells, and the binding of the upper band was almost four times stronger in resistant cells compared to sensitive HT29 cells. This binding was not obtained when using a probe that expanded from nucleotide –63 to –5 from the ATG, which excluded the putative Sp1 binding site (AKR-prDeletionSp1) (Fig. 6B). The binding pattern obtained in the gel-shift analysis was characterized by using antibodies against Sp1 (PEP-2) and Sp3 (D-20). When the probe AKR-

pr84 was used, the upper band was supershifted with the Sp1 antibody, thus corresponding to binding by Sp1 (Fig. 6C). The lower band corresponded to binding by Sp3, as it disappeared completely when the Sp3 antibody was used. A shorter probe of 24 bp containing the Sp1 binding site in the AKR1C1 promoter was also used. By using this probe, we confirmed the higher Sp1 and Sp3 binding with the resistant cells nuclear extract, as well as the characterization of the two obtained bands (Fig. 6D). The consensus sequence for Sp1 binding site was additionally used in the gel-shift analysis. By using this probe and nuclear extracts from HT29 resistant cells, three bands were observed. The upper band corresponded to binding by Sp1, as it was competed by Sp1 antibody, and the two lower bands corresponded to binding by Sp3, as they both disappeared when an Sp3 antibody was used (Fig. 6E).

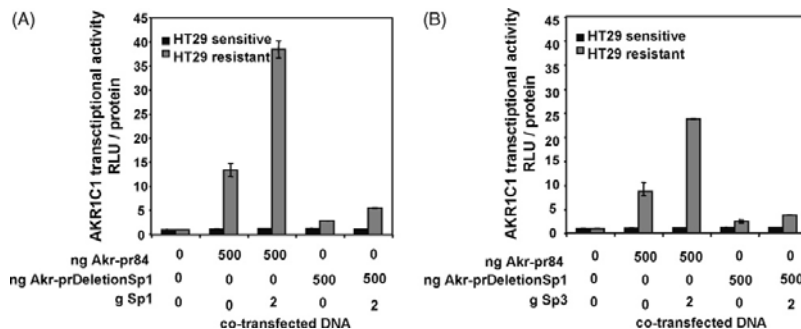


Fig. 5 – AKR1C1 transcriptional activity upon co-transfection with Sp1 or Sp3. (A) Co-transfections of Sp1 plus AkR-pr84 or AkR-prDeletionSp1 in the sensitive and resistant HT29 cells. Five hundred nanograms of each construct was transfected alone or in combination with an expression plasmid for Sp1. Luc activity was also assayed 30 h after transfection and the results were treated as in Fig. 4. (B) Co-transfections of Sp3 plus AkR-pr84 or AkR-prDeletionSp1 in the sensitive and resistant HT29 cells. Five hundred nanograms of each construct were transfected alone or in combination with an expression plasmid for Sp3. Luc activity was assayed 30 h after transfection and the results were treated as above.

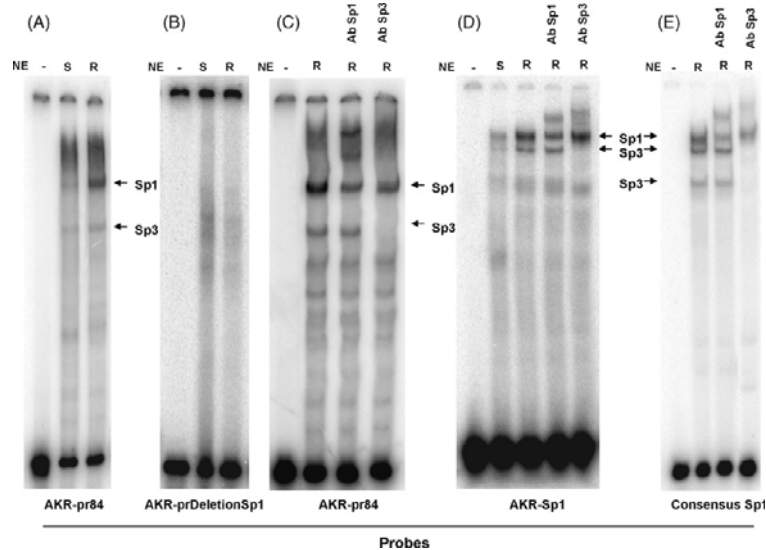


Fig. 6 - Characterization of Sp1 binding to AKR1C1 promoter. Binding reactions were performed with 20,000 cpm of each ds probe, 2 μ g nuclear extracts (NE) from exponentially growing HT29 sensitive (S) or MTX-resistant (R) cells and 1 μ g poly [d(I-C)] as the nonspecific competitor. Supershift mobility assays were performed in the presence of specific antibodies against either Sp1 or Sp3 (Ab Sp1 or Ab Sp3, respectively). Shifted and supershifted bands are indicated by arrows. The characteristics of each probe used are described in Section 2.

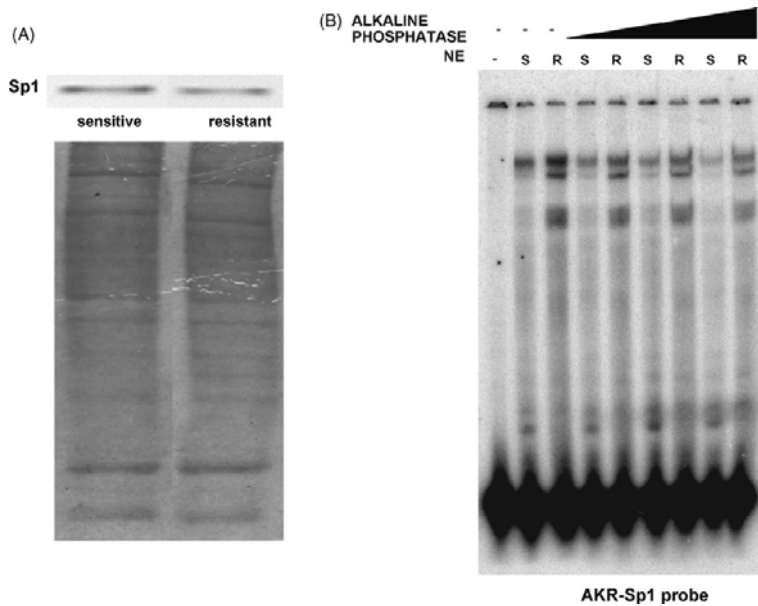


Fig. 7 - Sp1 protein levels and effect of phosphatase treatment. (A) Sp1 protein levels determined by Western analysis. Forty micrograms of total protein extracts from HT29 cells (either sensitive or resistant to MTX) were processed using the PEP2 Ab against Sp1. The stained gel after the transfer is shown as loading control. (B) Effect of phosphatase treatment on Sp1 binding to the AKR1C1 promoter. Two micrograms of nuclear extract (NE) from either sensitive (S) or MTX-resistant (R) HT29 cells were incubated with increasing amounts of alkaline phosphatase for 30 min on ice. The reaction was stopped by the addition of 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate and 2 mM Na_3VO_4 . Immediately afterwards, the binding reaction was carried out (lanes 4 to 9) using the AKR-Sp1 probe. Control extracts were also incubated with the phosphatase inhibitors before proceeding to the gel retardation assays (lanes 2 and 3).

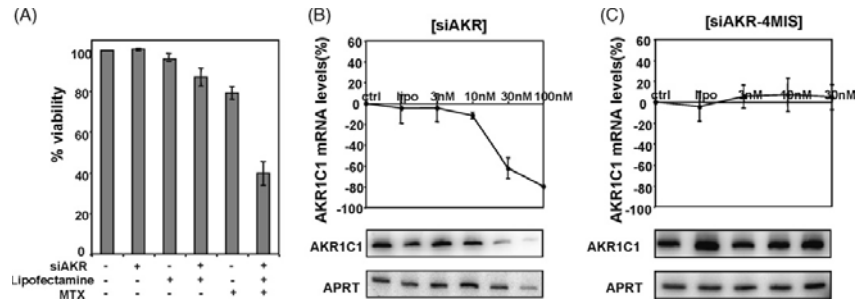


Fig. 8 – Effect of siRNA against AKR1C1 RNA on MTX sensitivity in HT29 cells. (A) Effect of siRNA against AKR1C1 (siAKR) on MTX sensitivity. Incubation with 100 nM siAKR was performed alone or in combination with 5×10^{-8} M MTX. The drug was added 48 h after siRNA treatment, and cell viability was determined 7 days after by the MTT assay. Results are expressed as percentage viability referred to the untreated cells. (B and C) Effects of siAKR or siAKR-4 MIS (a siRNA with 4 mismatches with respect to siAKR) on AKR1C1 mRNA. After 48 h of siRNA treatment, RNA levels were determined by quantitative RT-PCR. The intensity of the radioactive bands was quantified by phosphorimaging and the results (mean \pm S.E.M. for triplicate samples) were normalized using the signal corresponding to the APRT mRNA. The values are expressed as percentage of AKR1C1 mRNA levels referred to the control (untreated cells) (lipo is the abbreviation of Lipofectamine).

As the levels of Sp1 protein were unchanged between resistant and sensitive cells (Fig. 7A), we explored whether or not the higher Sp1 binding in HT29 MTX-resistant cells was due to enhanced Sp1 phosphorylation. Incubation of nuclear extracts with alkaline phosphatase was performed for 30 min and stopped before proceeding to the binding reaction to avoid dephosphorylation of the probe. As can be observed in Fig. 7B, dephosphorylation of the extracts led to a decrease in the binding of Sp1 and Sp3. Thus, the stronger binding present in the resistant cells might be due to an increase in the phosphorylation state of these transcription factors.

3.5. Effect of siRNAs against AKR1C1 on methotrexate sensitivity

Given that AKR1C1 was overexpressed in cells resistant to MTX, we investigated the role of decreasing its mRNA on the sensitivity to this chemotherapeutic agent. Treatment with 100 nM siAKR increased the sensitivity of HT29 cells towards MTX by about 50% (Fig. 8A). This treatment reduced 80% the levels of AKR1C1 RNA after 48 h in the resistant cells, containing increased levels of AKR1C1 mRNA, while a 4-mismatch siRNA against AKR1C1 did not produce any significant reduction in its mRNA levels (Fig. 8B and C, respectively).

3.6. Effect of overexpression of AKR1C1 on Methotrexate sensitivity

Transient transfection with an expression vector for AKR1C1 (pCMV5-XL6-AKR1C1) in sensitive HT29 cells was performed in the presence or in the absence of 3×10^{-8} M MTX. The transfection of the expression vector for AKR1C1 reverted by 50% the effect of methotrexate (Fig. 9), thus providing evidence that AKR1C1 can confer increased resistance of HT29 cells toward MTX.

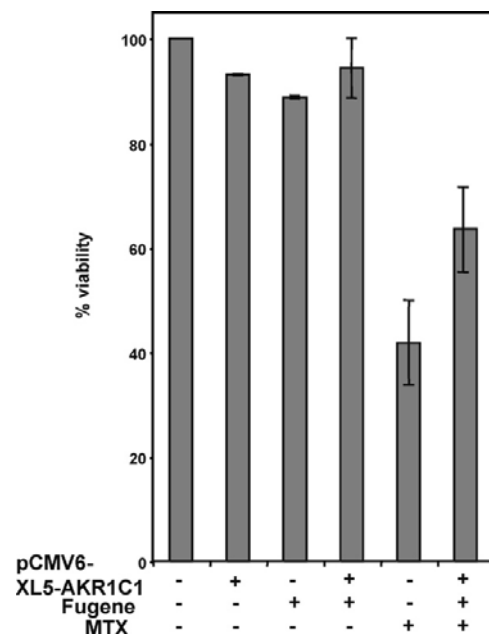


Fig. 9 – Effect of AKR1C1 overexpression on MTX sensitivity in HT29 cells. AKR1C1 was overexpressed by means of an expression plasmid (pCMV6-XL5-AKR1C1). Ten micrograms of this plasmid were transfected using FUGENE™ 6 into HT29 sensitive cells, either alone or in combination with 3×10^{-8} M MTX, added 24 h after plasmid treatment. MTT assay was performed after 7 days of AKR1C1 expression and percentage viability was referred to the untreated cells (mean \pm S.E.M. for triplicate samples).

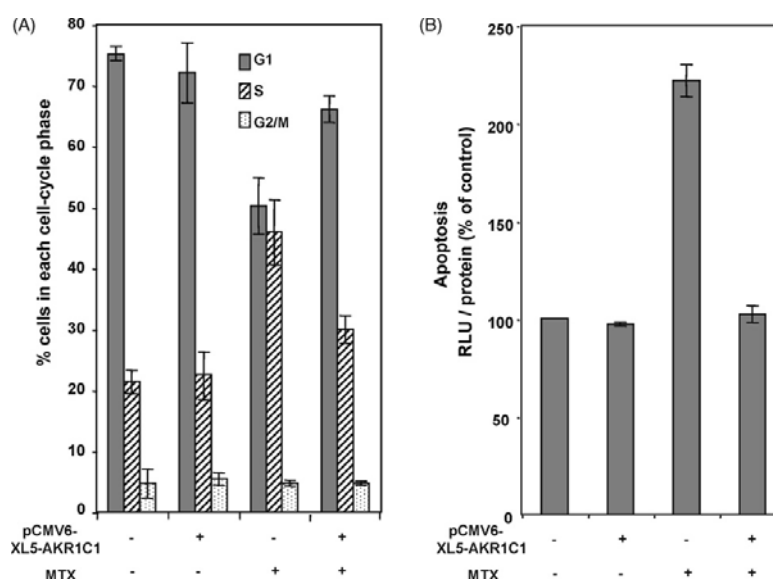


Fig. 10 – Changes in the cell cycle and in the apoptosis caused by overexpression of AKR1C1. (A) Changes in cell cycle distribution. Ten micrograms of pCMV6-XL5-AKR1C1 were transfected into HT29 sensitive cells. MTX (3×10^{-8} M) was added 1 h after plasmid treatment. After 48 h of drug incubation, cells were collected, stained with propidium iodide and analyzed for DNA content using flow cytometry. Results are shown as mean \pm S.E.M. from at least three independent experiments. (B) Changes in apoptosis. Overexpression of AKR1C1 was performed by transfecting 10 μ g of expression plasmid, either alone or in combination with 3×10^{-8} M MTX, for 24 h in HT29 sensitive cells. MTX was added during the last 6 h of treatment. Caspase 3/7 activation was finally measured and expressed as percentage of relative light units (RLU) referred to the control and normalized by protein content (mean \pm S.E.M. from at least three independent experiments).

3.7. AKR1C1 counteracts MTX-induced S-phase arrest and apoptosis

Cell cycle distribution after treatment with MTX and/or pCMV6-XL5-AKR1C1 was monitored after a 48-h treatment. Incubation with MTX alone induced the S-phase arrest, as previously described by others [38], while cells in G1 phase were significantly decreased. However, if AKR1C1 expression plasmid was transfected in combination with MTX, the percentage of cells in S-phase was significantly lower and those in G1 increased with respect to MTX alone (Fig. 10A). These results suggest that AKR1C1 may serve to facilitate the progression throughout the cell cycle and thus stimulate cell proliferation, counteracting the effects caused by MTX. This facilitation for cell progression was also explored by testing the percentage of apoptotic cells. In this way, MTX caused an increase in apoptosis, as measured by caspases 3/7 activation, while overexpression of AKR1C1 reversed the apoptosis caused by the chemotherapeutic agent (Fig. 10B).

4. Discussion

The aim of this work was to study the regulation of AKR overexpression that we found in HT29 cells resistant to methotrexate using functional genomics. We focused on the

analysis of AKR1C1 since it was one of the two most differentially expressed genes within the AKR family and had higher raw values of expression than AKR1C2. Moreover, the gene function attributed to AKR1C1 (xenobiotics metabolism) was more in accordance with the resistance process than the functional category in which AKR1C2 was included (bile acid transport). It is of note that the increase in RNA and AKR1C1 protein were at the same level, about 7-fold, which suggests that the overexpression is caused mainly by an increase in mRNA abundance rather than by a translational control. The increase in mRNA was not due to an amplification of the *akr1c1* locus. This is at variance with respect to the *dhfr* gene, which had undergone an amplification process of about 10-fold compared to the sensitive cells.

Given this result it became apparent that a transcriptional regulation has taken place. In this regard, from the luciferase experiments two facts can be concluded: (i) there is a vast increase in transcriptional activity originating from the AKR1C1 promoter in the resistant cells compared with sensitive cells; and (ii) AKR1C1 transcriptional activation in the resistant but not in the sensitive cells depends at least in part on Sp1 and also on Sp3. The gel-shift experiments also corroborate the role of Sp1 and Sp3 in regulating AKR1C1 in the resistant cells. As there was no difference in the levels of Sp1 protein between resistant and sensitive cells, we

explored the phosphorylation status of this transcription factor in the two types of cells, considering that it has been reported that phosphorylated Sp1 shows a higher binding than the non-phosphorylated form [32]. Indeed, the increase in Sp1 binding in the resistant condition could be due to a higher phosphorylation state of Sp1 as dephosphorylation of the extracts coarsed with a decrease in its binding. In this direction, we searched for the differential expression, in the microarray data, of those kinases and phosphatases known to control the phosphorylation state of Sp1 [39]. Within the kinases, PKC alpha was overexpressed. It is interesting to note that kinase has already been related to methotrexate resistance [40] through a mechanism involving transcription factor Sp1 [32].

Trying to mimic the overexpression of AKR1C1 present in the resistant cells, we transiently transfected an expression vector for this gene into sensitive cells, which resulted into a decrease in sensitivity toward methotrexate. This result supported the idea that the overexpression of AKR1C1 may contribute, at least partially, to the resistant phenotype. On the other hand, decreasing AKR1C1 mRNA levels by means of iRNA technology sensitizes the cells toward MTX.

Given that a relationship between AKR and proliferation had been reported [41,42], we studied and demonstrated that AKR1C1 transfection counteracts the cell cycle S-phase arrest caused by MTX, suggesting that AKR1C1 activity may be needed for the cells to progress throughout the cell cycle. This could be a strategy, concomitant with the amplification of the *dhfr* locus, for the resistant cells to bypass the metabolic pressure exerted by MTX on nucleotide synthesis. Since AKR1C1 is functionally involved in the metabolism of xenobiotics, its activity might be acting either on MTX directly or on one of its metabolites to decrease the concentration of DHFR inhibitor.

In addition, AKR activity correlates with apoptosis; Chow et al. [43] showed that inhibition of AKR1C1 expression by iRNA increased the apoptosis and drug (bleomycin)-sensitivity of A431 skin carcinoma cells, indicating an important role for AKR1C1 in tumor cells self-protective mechanisms and tumor progression. Our results are in keeping with this possibility since overexpression of AKR1C1 counteracts the apoptosis induced by MTX. In this respect, the expression levels for BID and BAX found in the microarrays for the resistant cells were decreased to ratios of 0.6 and 0.7, respectively, compared to the expression in the sensitive cells. Overexpression of AKR1C1 also confers resistance to cisplatin and adriamycin in NSCLC cells, probably through activation of protein kinase C and altered control of DNA repair and apoptosis [40]. Furthermore, a related aldo-keto reductase AKR7A5 from mouse protects V79 cells against apoptosis induced by 4-hydroxynonenal [44].

In summary, AKR1C1 upregulation may represent a mechanism, parallel to DHFR amplification, which can contribute to the establishment of MTX resistance. Its overexpression partially reverses both the MTX-induced S-phase arrest of the cell cycle and the apoptosis caused by this chemotherapeutic agent. The increase in AKR1C1 mRNA is transcriptionally regulated, at least in part by Sp1 transcription factor. Silencing of AKR1C1 by iRNA technology improves the sensitivity toward MTX.

Acknowledgements

This work was supported by grants SAF05-247 from “Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología” and ISCIII-RETIC RD06/0020. Our research group holds the “quality distinction” from the “Generalitat de Catalunya”. E.S. is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT).

REFERENCES

- [1] Wagner C. Symposium on the subcellular compartmentation of folate metabolism. *J Nutr* 1996;126(Suppl. 4):1228S–34S.
- [2] Huennekens FM. The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *Adv Enzyme Regul* 1994;34:397–419.
- [3] Goldman ID, Matherly LH. The cellular pharmacology of methotrexate. *Pharmacol Ther* 1985;28(1):77–102.
- [4] Neumann K, Al-Batayneh KM, Kuiper MJ, Parsons-Sheldrake J, Tyshenko MG, Flintoff WF, Cole SP, Walker VK. A single point mutation in *Drosophila* dihydrofolate reductase confers methotrexate resistance to a transgenic CHO cell line. *Genome* 2003;46(4):707–15.
- [5] Chu E, Grem JL, Johnston PG, Allegra CJ. New concepts for the development and use of antifolates. *Stem Cells* 1996;14(1):41–6.
- [6] Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 1983;309(18):1094–104.
- [7] de Nonancourt-Didion M, Gueant JL, Adjalla C, Chery C, Hatier R, Namour F. Overexpression of folate binding protein alpha is one of the mechanism explaining the adaptation of HT29 cells to high concentration of methotrexate. *Cancer Lett* 2001;171(2):139–45.
- [8] Lesuffleur T, Barbat A, Luccioni C, Beaumatin J, Clair M, Kornowski A, et al. Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells. *J Cell Biol* 1991;115(5):1409–18.
- [9] Zeindl-Eberhart E, Klugbauer S, Dimitrijevic N, Jungblut PR, Lamer S, Rabes HM. Proteome analysis of rat hepatomas: carcinogen-dependent tumor-associated protein variants. *Electrophoresis* 2001;22(14):3009–18.
- [10] Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* 1997;18(3):281–305.
- [11] Penning TM. AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res* 2005;11(5):1687–90.
- [12] Vergnes L, Phan J, Stolz A, Reue K. A cluster of eight hydroxysteroid dehydrogenase genes belonging to the aldo-keto reductase supergene family on mouse chromosome 13. *J Lipid Res* 2003;44(3):503–11.
- [13] Maser E. Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. The pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochem Pharmacol* 1995;49(4):421–40.
- [14] Burczynski ME, Lin HK, Penning TM. Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Res* 1999;59(3):607–14.
- [15] O'Connor T, Ireland LS, Harrison DJ, Hayes JD. Major differences exist in the function and tissue-specific

- expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem J* 1999;343(Pt 2):487-504.
- [16] Jez JM, Flynn TG, Penning TM. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* 1997;54(6):639-47.
- [17] Hsu NY, Ho HC, Chow KC, Lin TY, Shih CS, Wang LS, et al. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase as a prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001;61(6):2727-31.
- [18] Wang LS, Chow KC, Wu YC, Lin TY, Li WY. Inverse expression of dihydrodiol dehydrogenase and glutathione-S-transferase in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004;111(2):246-51.
- [19] Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ES. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2005;4(11):1686-96.
- [20] Nagaraj NS, Beckers S, Mensah JK, Waigel S, Vigneswaran N, Zacharias W. Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells. *Toxicol Lett* 2006;165(2):182-94.
- [21] Yu D, Berlin JA, Penning TM, Field J. Reactive oxygen species generated by PAH o-quinones cause change-in-function mutations in p53. *Chem Res Toxicol* 2002;15(6):832-42.
- [22] Ax W, Soldan M, Koch L, Maser E. Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochem Pharmacol* 2000;59(3):293-300.
- [23] Deng HB, Parekh HK, Chow KC, Simpkins H. Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277(17):15035-43.
- [24] Deng HB, Adikari M, Parekh HK, Simpkins H. Ubiquitous induction of resistance to platinum drugs in human ovarian, cervical, germ-cell and lung carcinoma tumor cells overexpressing isoforms 1 and 2 of dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54(4):301-7.
- [25] Chen YJ, Yuan CC, Chow KC, Wang PH, Lai CR, Yen MS, et al. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase is associated with cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2005;97(1):110-7.
- [26] Hung JJ, Chow KC, Wang HW, Wang LS. Expression of dihydrodiol dehydrogenase and resistance to chemotherapy and radiotherapy in adenocarcinoma cells of lung. *Anticancer Res* 2006;26(4B):2949-55.
- [27] Shen H, Kauvar L, Tew KD. Importance of glutathione and associated enzymes in drug response. *Oncol Res* 1997;9(6-7):295-302.
- [28] Ciaccio PJ, Stuart JE, Tew KD. Overproduction of a 37.5-kDa cytosolic protein structurally related to prostaglandin F synthase in ethacrynic acid-resistant human colon cells. *Mol Pharmacol* 1993;43(6):845-53.
- [29] Rocke DM, Durbin B. A model for measurement error for gene expression arrays. *J Comput Biol* 2001;8(6):557-69.
- [30] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [31] Ciudad CJ, Morris AE, Jeng C, Chasin LA. Point mutational analysis of the hamster dihydrofolate reductase minimum promoter. *J Biol Chem* 1992;267(6):3650-6.
- [32] Noe V, Alemany C, Nicolas M, Ciudad CJ. Sp1 involvement in the 4beta-phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-mediated increase in resistance to methotrexate in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 2001;268(11):3163-73.
- [33] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
- [34] Alt FW, Kellems RE, Bertino JR, Schimke RT. Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells, 1978. *Biotechnology* 1992;24:397-410.
- [35] Curt GA, Cowan KH, Chabner BA. Gene amplification in drug resistance: of mice and men. *J Clin Oncol* 1984;2(1):62-4.
- [36] Carman MD, Schornagel JH, Rivest RS, Srmatkandada S, Portlock CS, Duffy T, et al. Resistance to methotrexate due to gene amplification in a patient with acute leukemia. *J Clin Oncol* 1984;2(1):16-20.
- [37] Coderre JA, Beverley SM, Schimke RT, Santi DV. Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(8):2132-6.
- [38] Yamauchi A, Ichimiya T, Inoue K, Taguchi Y, Matsunaga N, Koyanagi S, et al. Cell-cycle-dependent pharmacology of methotrexate in HL-60. *J Pharmacol Sci* 2005;99(4):335-41.
- [39] Chu S, Ferro TJ. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* 2005;348:1-11.
- [40] Wang HW, Lin CP, Chiu JH, Chow KC, Kuo KT, Lin CS, et al. Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug-resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. *Int J Cancer* 2007;120(9):2019-27.
- [41] Desmond JC, Mountford JC, Drayson MT, Walker EA, Hewison M, Ride JP, et al. The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 2003;63(2):505-12.
- [42] Tanaka NM, Shiota K, Noda K, Kadosawa T, Mochizuki M, Nishimura R, et al. Effects of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and its inhibitors on canine osteosarcoma cell growth in vitro. *J Vet Med Sci* 1996;58(7):623-7.
- [43] Chow KC, Lu MP, Wu MT. Expression of dihydrodiol dehydrogenase plays important roles in apoptosis- and drug-resistance of A431 squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 2006;41(3):205-12.
- [44] Li D, Hinshelwood A, Gardner R, McGarvie G, Ellis EM. Mouse aldo-keto reductase AKR7A5 protects V79 cells against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis. *Toxicology* 2006;226(2-3):172-80.

4.1.1- ANNEX A L'ARTICLE I

Després de l'acceptació de l'Article I, es van realitzar una sèrie d'experiments per tal de completar el treball publicat.

Es van realitzar experiments de gen reporter per corroborar la regulació transcripcional del promotor de la AKR1C1, mitjançada per Sp1 i Sp3, descrita a l'Article I. En aquest treball s'havia comprovat la regulació transcripcional de la AKR1C1 a través d'Sp1 i Sp3 mitjançant la sobreexpressió d'aquests factors de transcripció amb plàsmids d'expressió. En els experiments complementaris que es presenten a continuació, vam voler estudiar l'efecte del tractament amb siRNAs dirigits contra Sp1 i Sp3 sobre la regulació del promotor de la AKR1C1.

Es va fixar el protocol més adequat a seguir:

Semrar 30.000 cèl·lules per pou, tractar amb els siRNAs l'endemà, esperar 24 hores per tractar amb les construccions del promotor i quantificar l'activitat luciferasa 30 hores més tard.

Per arribar a establir aquest protocol, primer es van comprovar els nivells d'mRNA d'Sp1 i Sp3 després del tractament de diferent número de cèl·lules HT29 resistents amb 100nM d'siRNA (Figura 1, A i B). Es va determinar que la reducció més eficient en els nivells d'mRNA d'ambdós gens resultava al sembrar 30.000 cèl·lules.

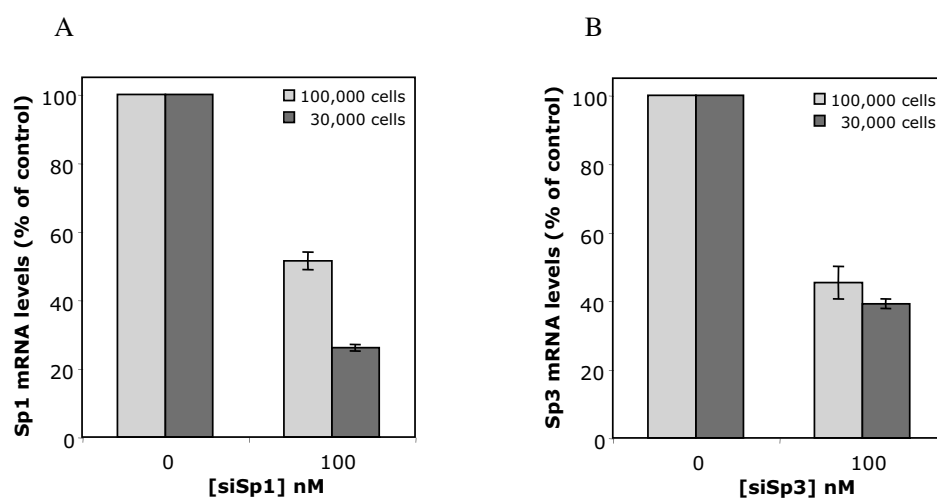


Figura 1. Estudi del número de cèl·lules òptim per la transfecció amb els siRNAs contra Sp1 o Sp3. Divuit hores després de sembrar-les, es van tractar les cèl·lules amb 100nM d'siRNA. Es van recollir a les 54 hores de la transfecció, i els nivells d'mRNA d'Sp1 o Sp3 es van quantificar per RT-Real-Time PCR utilitzant sondes TaqMan®. Els resultats es van expressar com a percentatge referit a les cèl·lules sense tractar. Els valors representen la mitjana de tres experiments \pm SE.

Resultats

Els assaigs de gen reporter van mostrar que tan el tractament amb l'siRNA d'Sp1 com amb l'siRNA d'Sp3 abolien en gran part l'activació del promotor de la AKR1C1 observada en cèl·lules HT29 resistents al MTX transfectades amb les construccions AKR-pr241 i AKR-pr84 (Figura 2B). Aquestes construccions contenen 241 i 84 nucleòtids del promotor proximal de la AKR1C1, respectivament, i ambdues inclouen una caixa GC que havíem demostrat prèviament que permetia la unió *in vitro* d'Sp1 i Sp3 (Figura 6, Article I). Els tractaments amb els siRNAs d'Sp1 o d'Sp3 no provocaven variacions en l'activació transcripcional de la construcció AKR-prDeletionSp1, portadora d'un fragment del promotor que no conté el lloc putatiu d'unió per proteïnes de la família Sp. La transfecció amb un siRNA no relacionat no va provocar variacions en la activació transcripcional de la construcció AKR-pr241.

Es va dur a terme la mateixa aproximació en cèl·lules HT29 sensibles, i no es van observar diferències en la activació basal observada en aquesta línia cel·lular (Figura 2A).

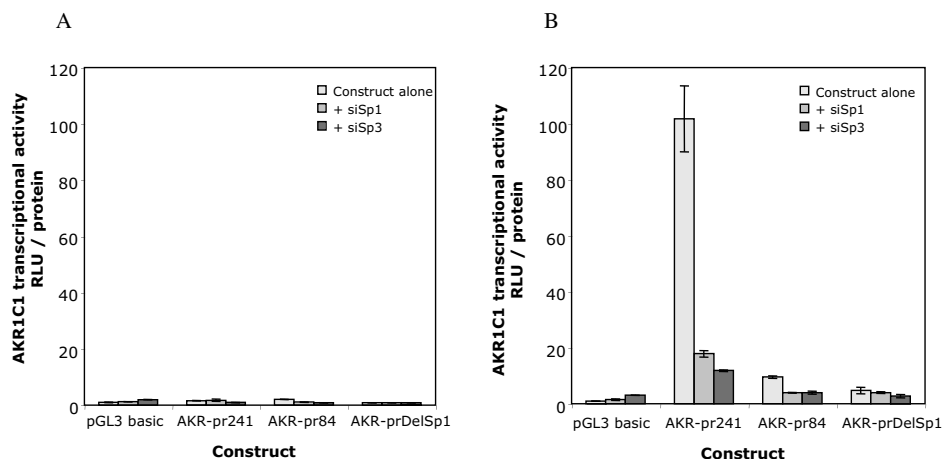


Figura 2. Activitat transcripcional de la AKR1C1 després del tractament amb els siRNAs contra Sp1 o Sp3. Les cèl·lules (sensibles, A; resistents, B) es van incubar amb siSp1 o siSp3 durant 24 hores; llavors es van transfectar amb les diferents construccions del promotor de la AKR1C1 i la activitat luciferasa es va assajar 30 hores més tard. La concentració de proteïna es va utilitzar per normalitzar la activitat luciferasa (relative light units, RLU) de cada mostra, referida a la activitat del vector pGL3 basic (mitjana \pm SE de triplicats).

Amb aquest estudi complementari es va poder corroborar la regulació per part d'Sp1 i Sp3 del promotor de la AKR1C1 a través de la caixa putativa d'unió per Sp situada a -74 de l'inici de traducció (ATG).

4.2- ARTICLE II:

Role of Caveolin 1, E-Cadherin, Enolase 2 and PKC alpha on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells .

Elisabet Selga, Cristina Morales, Véronique Noé, Miguel A. Peinado & Carlos J. Ciudad
BMC Medical Genomics 2008, 1:35

En aquest treball vam realitzar una anàlisi funcional de gens deregulats a les cèl·lules HT29 resistents al MTX, escollits segons la seva localització cromosòmica o per dades bibliogràfiques que els relacionessin tan amb resistència a quimioteràpics com amb càncer.

Es va determinar que tots els gens sobreexpressats més de 3 vegades localitzats al braç llarg del cromosoma 5, propers al gen *dhfr*, estaven amplificats a les cèl·lules resistents (Taula 1). Estudis funcionals tot utilitzant siRNAs dirigits contra cadascun d'aquests gens van demostrar que la reducció de la seva expressió contribuïa d'una manera molt lleugera a sensibilitzar les cèl·lules al MTX i que, per tant, aportaven poc al mecanisme resistència.

Vam estudiar tres altres gens sobreexpressats a les cèl·lules resistents localitzats en diferents cromosomes, la Caveolina1, la Enolasa2 i la PKC α . El tractament de cèl·lules HT29 amb els siRNAs dirigits contra cadascun d'aquests gens va reduir notablement la viabilitat cel·lular i va incrementar la sensibilitat al MTX (Figura 3). Els mateixos tractaments es van dur a terme en cèl·lules HT29 resistents, però en aquest cas la viabilitat cel·lular es va reduir lleugerament, i cap dels efectes observats va millorar amb l'addició del MTX. També es va assajar un siRNA dirigit contra la DHFR, que es va comportar d'igual manera que els altres tres siRNAs en ambdues línies cel·lulars.

Ja que havíem observat una quimiosensibilització vers el MTX a les cèl·lules sensibles utilitzant siRNAs individualment, vam realitzar tractaments que incloïen els siRNAs

Resultats

contra la CAV1, la ENO2 i la PKC α (combinació triple) o conjuntament amb siDHFR (combinació quàdruple) per comprovar si aquestes combinacions també incrementaven la sensibilitat vers el MTX. Efectivament, tan la triple com la quàdruple combinació van sensibilitzar les cèl·lules HT29 sensibles, però no les resistents (Figura 5).

També vam estudiar un gen que estava infraexpressat a les cèl·lules HT29 resistents i que vam comprovar que estava delecionat a nivell genòmic, l'E-cadherina. La transfecció transitòria d'un plàsmid d'expressió de l'E-cadherina va provocar un augment en la sensibilitat al MTX (Figura 6).

S'ha demostrat que l'E-cadherina és un element permissiu important que condiona les funcions de la CAV1. Així, vam realitzar experiments de co-transfecció per tal de reduir els nivells d'mRNA de la CAV1 i sobreexpressar l'E-cadherina simultàniament. Aquests experiments ens van permetre obtenir una gran sensibilització de les cèl·lules sensibles vers el MTX, així com una disminució dràstica en la viabilitat de les cèl·lules resistents (Figura 7).

En conclusió, aquest treball de genòmica funcional demostra un paper rellevant dels gens Caveolina1, E-cadherina, Enolasa2 i PKC α en la resistència al MTX, essent els dos primers dianes potencials per desenvolupar un protocol de teràpia coadjuvant.

Research article

Open Access

Role of Caveolin 1, E-Cadherin, Enolase 2 and PKC α on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells

Elisabet Selga¹, Cristina Morales^{2,4}, Véronique Noé¹, Miguel A Peinado^{2,3} and Carlos J Ciudad*¹

Address: ¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet, Barcelona, Spain, ³Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer (IMPPC), Badalona, Barcelona, Spain and ⁴Biotech Research and Innovation Centre (BRIC), University of Copenhagen, Ole Maaloes Vej 5, DK-2200 Copenhagen, Denmark

Email: Elisabet Selga - eliselga@ub.edu; Cristina Morales - cristina.morales@bric.dk; Véronique Noé - vnoe@ub.edu; Miguel A Peinado - map@imppc.org; Carlos J Ciudad* - cciudad@ub.edu

* Corresponding author

Published: 11 August 2008

Received: 15 May 2008

BMC Medical Genomics 2008, 1:35 doi:10.1186/1755-8794-1-35

Accepted: 11 August 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1755-8794/1/35>

© 2008 Selga et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Methotrexate is one of the earliest cytotoxic drugs used in cancer therapy, and despite the isolation of multiple other folate antagonists, methotrexate maintains its significant role as a treatment for different types of cancer and other disorders. The usefulness of treatment with methotrexate is limited by the development of drug resistance, which may be acquired through different ways. To get insights into the mechanisms associated with drug resistance and sensitization we performed a functional analysis of genes deregulated in methotrexate resistant cells, either due to its co-amplification with the *dhfr* gene or as a result of a transcriptome screening using microarrays.

Methods: Gene expression levels were compared between triplicate samples from either HT29 sensitive cells and resistant to 10⁻⁵ M MTX by hybridization to the GeneChip® HG U133 PLUS 2.0 from Affymetrix. After normalization, a list of 3-fold differentially expressed genes with a p-value < 0.05 including multiple testing correction (Benjamini and Hochberg false discovery rate) was generated. RT-Real-time PCR was used to validate the expression levels of selected genes and copy-number was determined by qPCR. Functional validations were performed either by siRNAs or by transfection of an expression plasmid.

Results: Genes adjacent to the *dhfr* locus and included in the 5q14 amplicon were overexpressed in HT29 MTX-resistant cells. Treatment with siRNAs against those genes caused a slight reduction in cell viability in both HT29 sensitive and resistant cells. On the other hand, microarray analysis of HT29 and HT29 MTX resistant cells unveiled overexpression of caveolin 1, enolase 2 and PKC α genes in resistant cells without concomitant copy number gain. siRNAs against these three genes effectively reduced cell viability and caused a decreased MTX resistance capacity. Moreover, overexpression of E-cadherin, which was found underexpressed in MTX-resistant cells, also sensitized the cells toward the chemotherapeutic agent. Combined treatments targeting siRNA inhibition of caveolin 1 and overexpression of E-cadherin markedly reduced cell viability in both sensitive and MTX-resistant HT29 cells.

Conclusion: We provide functional evidences indicating that caveolin 1 and E-cadherin, deregulated in MTX resistant cells, may play a critical role in cell survival and may constitute potential targets for adjuvant therapy.

Background

Colorectal cancer is the third most common form of cancer and the second leading cause of cancer-related death in the Western world. Colon cancer causes 655,000 deaths worldwide per year [1]. Therapy is usually through surgery, followed in many cases by chemotherapy, which is used to slow tumor growth, to shrink tumor size and to reduce the likelihood of metastasis development.

Chemotherapy effectiveness in cancer cells is compromised by the achievement of drug resistance. Therefore, gaining insight into the mechanisms underlying drug resistance is basic to develop more effective therapeutic approaches. Morales *et al.* [2] hypothesized that the genetic features related with the progression pathway in colorectal cancer may condition its chemoresistance capability. In fact, it has been described that the tumor's ability to survive, grow and metastasize is conditioned by its genetic and phenotypic heterogeneity [3].

Methotrexate (MTX) is an antimetabolite and antifolate drug used in treatment of cancer and autoimmune diseases. MTX competitively and reversibly inhibits dihydrofolate reductase (DHFR), an enzyme that participates in folate metabolism, and essential for DNA synthesis and cell growth [4]. MTX is used for the treatment of lymphoblastic leukemia, lymphoma, osteosarcoma, breast cancer, and head and neck cancer [5]. Treatments combining MTX and other drugs are used in colorectal cancer [6-8]. However, MTX resistance can be easily acquired through different ways, although amplification of the target gene (*dhfr*) has been shown to be the most important mechanism of resistance in cultured cells [9-11]. Indeed, amplification of 5q12-14 regions, where *dhfr* is located, has been described in MTX-resistant HT29 cells [2].

In the present study, we wanted to identify genes implicated in MTX resistance in HT29 colon cancer cells and to explore their relative contribution to this phenotype. We analyzed the differential gene expression between MTX-resistant and MTX-sensitive HT29 cells using oligonucleotide microarrays containing the full human genome. Changes in the DNA content between both cell lines were also determined. We showed a role for specific differentially expressed genes in MTX resistance. Using siRNAs against caveolin 1, enolase 2 and PKC α or plasmid over-expression for E-cadherin, a clear chemosensitization toward MTX was observed.

Methods

Cell Culture

Human colon adenocarcinoma cell line HT29 was routinely grown in Ham's F12 medium supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS, both from Gibco) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells resistant to 10⁻⁵

M MTX, which corresponds to a 1000-fold increase in resistance with respect to the sensitive cells, were previously obtained in the laboratory [12] upon incubation with stepwise concentrations of MTX (Lederle) and were routinely grown in selective DHFR medium (-GHT medium, GIBCO) lacking glycine, hypoxanthine and thymidine, the final products of DHFR activity. This medium was supplemented with 7% dialyzed fetal bovine serum (GIBCO).

Microarrays

Gene expression was analyzed by hybridization to the GeneChip® Human Genome U133 PLUS 2.0 from Affymetrix, containing over 47,000 transcripts and variants. Total RNA for oligo arrays was prepared from triplicate samples of both HT29 sensitive and resistant cells using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the recommendations of the manufacturer. Labeling, hybridization and detection were carried out following the manufacturer's specifications. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [13] and are accessible through GEO Series accession number GSE11440.

Microarray data analysis

Quantification was carried out with GeneSpring GX software v 7.3.1 (Silicon Genetics), which allows multi-filter comparisons using data from different experiments to perform the normalization, generation of restriction lists and functional classifications of the differentially expressed genes. Normalization was applied in two steps: i) "per Chip normalization" by which each measurement was divided by the 50th percentile of all measurements in its array; and ii) "per Gene normalization" by which all the samples were normalized against the median of the control samples (HT29 sensitive cells). The expression of each gene was reported as the ratio of the value obtained after each condition relative to the control condition after normalization of the data. Then, data were filtered using the control strength, a control value calculated using the Cross-Gene Error Model on replicates [14] and based on average base/proportional value. Measurements with higher control strength are relatively more precise than measurements with lower control strength. Genes that did not reach this value were discarded. Additional filtering was performed to determine differentially expressed genes. A restriction t-test p-value of less than 0.05 including multiple testing correction (Benjamini and Hochberg false discovery rate) was applied. The output of this analysis was then filtered by fold expression, to specifically select those genes that had a differential expression of at least 3-fold. The 375 transcripts included in this list can be viewed in Additional file 1.

RT-Real-Time PCR

mRNA levels of the different selected genes were determined by RT-Real-time PCR. Total RNA was extracted from cells (4×10^6) using Ultraspec™ RNA reagent (Bio-tecx) following the recommendations of the manufacturer. Complementary DNA was synthesized in a total volume of 20 μ l from RNA samples by mixing 500 ng of total RNA, 125 ng of random hexamers (Roche), in the presence of 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 20 units of RNasin (Promega), 0.5 mM dNTPs (AppliChem), 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3. The reaction mixture was incubated at 37°C for 60 min and the cDNA product was used for subsequent Real-time PCR amplification using SYBR Green. A standard 20 μ l reaction contained 25 ng of the cDNA mixture, 0.5 μ M of the forward and reverse primers and the SYBR Green Master Mix. Primers used are listed in the Additional file 2.

Determination of gene copy number

Genomic DNA from either HT29 sensitive or resistant cells was obtained with the Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. Five nanograms of DNA were used for Real-Time PCR amplification in a 20 μ l reaction containing 0.5 μ M of the forward and reverse primers and the SYBR Green Master Mix in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A list of the primers used is provided as Additional file 3.

Functional validations**A) transfection of siRNAs against selected genes**

HT29 cells (30,000) were plated in 1 ml of -GHT medium and transfection was performed eighteen hours later. For each well, 4 μ l of Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) in 100 μ l of serum free -GHT medium were mixed in Eppendorf tubes with 100 nM of siRNA in 100 μ l of serum free -GHT medium. The mixture was incubated at room temperature for 20 min before addition to the cells. MTX (5×10^{-8} M) was added 48 hours after siRNA treatment and MTT assays were performed [15] after 5 days from the beginning of the treatment. Treatment of HT29 resistant cells was performed following the same protocol using 2 μ l of Lipofectamine™ 2000 and 10^{-5} M MTX. When screening for mRNA levels of the different genes after siRNA treatment, 30,000 cells, either sensitive or resistant, were incubated with increasing amounts of siRNA (1–100 nM) maintaining a 3:1 ratio (μ l of Lipofectamine : μ g siRNA) and following the procedure previously described. Cells were harvested 48 hours after siRNA treatment for RNA extraction and RT-Real-time PCR. In the combination experiments with siRNAs, 100 nM of each siRNA were diluted in the same eppendorf containing 100 μ l of serum free -GHT medium and combined with Lipofectamine™ 2000 as described above. MTX was added as in the single

siRNA experiments, mRNA levels were determined and MTT was performed as previously described. In all cases, a non-related siRNA was used as negative control. The treatment was performed as described above and cell viability and mRNA levels for each gene were quantified in parallel. The siRNAs were designed using the software iRNAi. Then, BLAST resources in NCBI were used to assess the degree of specificity of the sequence recognition for these siRNAs. We only selected the siRNAs that reported the target gene as the only mRNA hit. The sequences for the sense strand of all siRNAs used are available in the supplementary material provided (see Additional file 4).

B) transfection of an expression plasmid encoding for E-cadherin

HT29 cells were seeded into 6-well plates at a density of 3×10^4 cells/well in 1 ml of HAM F12 selective medium. Eighteen hours later, transfections with the expression plasmid for E-cadherin (pBATEM2-CDH) were performed in the presence or in the absence of MTX. The overexpression of E-cadherin was monitored by determining its mRNA levels after 48 h upon transfection. For each well, Lipofectamine™ 2000 was diluted in 100 μ l of serum free -GHT medium and was combined with different amounts of the plasmid (500 ng–5 μ g) in 100 μ l of serum free -GHT medium, always maintaining a 2:1 ratio (μ l of Lipofectamine : μ g of plasmid). After 20 min at room temperature, the mixture was added to the cells. When combining pBATEM2-CDH transfection and MTX treatment, 5×10^{-8} M MTX was added 48 h after transfection. Cell viability was measured by the MTT assay after 5 days from the beginning of the treatment. Treatment of HT29 resistant cells was performed following the same steps but using 10^{-5} M MTX.

C) co-transfection of siCAV1 and pBATEM2-CDH

When transfection of siCAV1 and pBATEM2-CDH was performed simultaneously, 100 nM of siRNA and 1 μ g of plasmid were diluted together in Eppendorf tubes with 100 μ l of serum free -GHT medium and mixed with lipofectamine™ 2000 in 100 μ l of serum free -GHT medium (6 μ l for the sensitive cells and 3 μ l for the MTX-resistant cells). The mixture was incubated at room temperature for 20 min before addition to the cells (3×10^4 cells/well in 1 ml of HAM F12 selective medium, pre-seeded eighteen hours earlier). The mRNA levels after transfection were determined for both genes as previously described and MTT assay was used to determine cell viability.

Results**Identification of genes deregulated in association with MTX resistance**

The expression profile of the 47,000 transcripts and variants included in the HG U133 PLUS 2.0 microarray from Affymetrix was compared between HT29 sensitive cells and resistant to 10^{-5} M MTX. GeneSpring GX software

v7.3.1 was used to analyze the results. A list of 3-fold differentially expressed genes was generated as described in Methods (Additional file 1). The expression values for genes in this list can be viewed in their corresponding chromosomal position (Figure 1). This overlapping view evidenced a highly overexpressed region in chromosome 5 that covers *dhfr* and the surrounding *loci*. The set of upregulated genes in this location included *dhfr*, *zfyve16*, *msh3*, *rasgrf2*, *sbbp2*, *xrcc4*, *hapln1* and *edil3* (Figure 2), which were selected for further studies. Additional genes that were clearly overexpressed or underexpressed and located in other human chromosomes were also selected according to their function and after literature mining of genes related to drug resistance. The expression levels of most of the selected genes were validated by RT-Real-time PCR (Table 1). The correlation between microarray and qPCR was calculated using the log-transformed values of the fold change obtained for the selected genes, obtaining an *r*-value of 0.95. To test if changes in the DNA content were responsible for the expression levels of the selected genes in the resistant cells, we determined the copy number for all of them using Real-Time PCR. The results, presented in table 1, showed amplification of all the genes in chromosome 5 flanking *dhfr*, as well as of *mtus1*,

located in chromosome 8. *E-cadherin* was the only gene clearly lost among the selected genes.

Effect on MTX sensitivity of siRNAs against genes flanking *dhfr*

To investigate if the genes that were both overexpressed and co-amplified with *dhfr* contributed to MTX resistance, their mRNA levels were brought down by means of siRNAs. Effective reduction ($\approx 70\%$) of the respective mRNAs was obtained upon transfection of 100 nM of each single siRNA, both in sensitive and resistant cells. These treatments, though, caused a small reduction in the viability of both cell lines, and addition of MTX to the siRNAs did not sensitize the cells toward the chemotherapeutic agent (data not shown). On the contrary, a siRNA against *dhfr* mRNA (siDHFR) caused a reduction in cell viability of 30% in HT29 sensitive cells, which was increased up to 90% with the addition of MTX (Figure 3B). mRNA levels after siDHFR treatment were reduced by 70% in this cell line (Figure 3A).

Table 1: mRNA levels and copy number determination of differentially expressed genes in HT29 MTX-resistant cells.

GenBank	Gene Name	Chromosome	Copy Number (Q-PCR)	Expression		Gene Function
				Microarrays	Validation (RT-PCR)	
NM_002961	S100A4	1	0.85 ± 0.1	3.7 (p = 5.5e ⁻⁶)	5.68 ± 0.4	Angiogenesis
BU078629	ZFYVE16	5	16.81 ± 2.1	6.1 (p = 7.7e ⁻⁶)	6.7 ± 0.1	Zinc ion binding
AI144299	DHFR	5	16.09 ± 1.4	7.1 (p = 1.2e ⁻⁷)	11.05 ± 0.5	Nucleotide metabolism
NM_002439	MSH3	5	4.97 ± 0.5	3.9 (p = 5.5e ⁻⁶)	4.23 ± 0.4	Mismatch repair
AI912976	RASGRF2	5	17.76 ± 0.4	4.6 (p = 8.9e ⁻⁵)	6.10 ± 0.5	MAPK signaling
AF912976	SSBP2	5	10.27 ± 0.7	2.4 (p = 3.4e ⁻³)	2.96 ± 0.2	ss DNA binding
NM_022406	XRCC4	5	17.31 ± 1.1	7.1 (p = 4.7e ⁻⁶)	8.90 ± 2.3	ds break repair
U43328	HAPLN1	5	11.55 ± 0.1	147 (p = 2.9e ⁻¹⁰)	111.9 ± 80.7	Cell adhesion
AA053711	EDIL3	5	14.3 ± 0.7	157 (p = 9.1e ⁻⁸)	N/D	Cell adhesion
U17496	PSMB8	6	0.91 ± 0.1	0.1 (p = 0.01)	N/D	Proteasome subunit
NM_004666	VNN1	6	0.84 ± 0.1	0.04 (p = 0.01)	N/D	Nitrogen metabolism
AU147399	CAVI	7	1.14 ± 0.1	10.9 (p = 1.5e ⁻⁴)	15.00 ± 0.8	Integ. plasma membr.
BE552421	MTUS1	8	3.52 ± 0.1	3.4 (p = 1.8e ⁻⁶)	N/D	Mitoc. tumor suppressor
U05598	AKRIC1	10	0.94 ± 0.1	4.6 (p = 3.9e ⁻⁶)	6.72 ± 0.7	Xenobiotics metabolism
NM_001975	ENO2	12	0.92 ± 0.1	6.0 (p = 4.6e ⁻⁶)	3.90 ± 0.1	Glycolysis
AK000345	DHRS2	14	0.97 ± 0.1	0.12 (p = 0.01)	N/D	Oxidoreductase
L08599	CDH1	16	0.33 ± 0.1	0.19 (p = 0.01)	0.15 ± 0.1	Cell adhesion
AI471375	PRKCA	17	1.05 ± 0.1	4.2 (p = 1.7e ⁻⁵)	2.55 ± 0.2	Regulation cell cycle
BQ003811	SLC19A1	21	0.84 ± 0.1	0.1 (p = 0.01)	N/D	Cell adhesion
NM_001569	IRAK1	X	1.25 ± 0.1	0.26 (p = 7.3e ⁻³)	N/D	IL1 receptor Kinase
NM_004135	IDH3G	X	0.85 ± 0.1	0.28 (p = 7.3e ⁻⁸)	N/D	TCA cycle
NM_001183	ATP6AP1	X	0.68 ± 0.1	0.3 (p = 0.01)	N/D	ATP biosynthesis

Twenty-two genes belonging to the 3-fold differentially expressed list were selected according to their possible relation with drug resistance and/or chromosomal localization. It is shown the GenBank accession number of all genes next to their common name, and their chromosome number. Real-Time PCR was used to determine their copy number, and the expression levels for all them are presented both as the values found in the microarrays (in fold changes relative to the control; t-test p-values included) and as validated mRNA levels (using RT-Real-Time PCR). All experimental results are expressed as fold changes referred to the sensitive cells and values are the mean of triplicate experiments ± SE. The last column indicates the functional categories of the genes. N/D, nondetermined value.



Figure 1
Chromosomal view of the differentially expressed genes in HT29 MTX-resistant cells. The expression values of genes included in the 3-fold differentially expressed list were viewed in their respective chromosomal location. The names for all the genes studied are depicted on top of their chromosomal position. Red is used to color the overexpressed genes and blue is used to highlight the underexpressed genes.

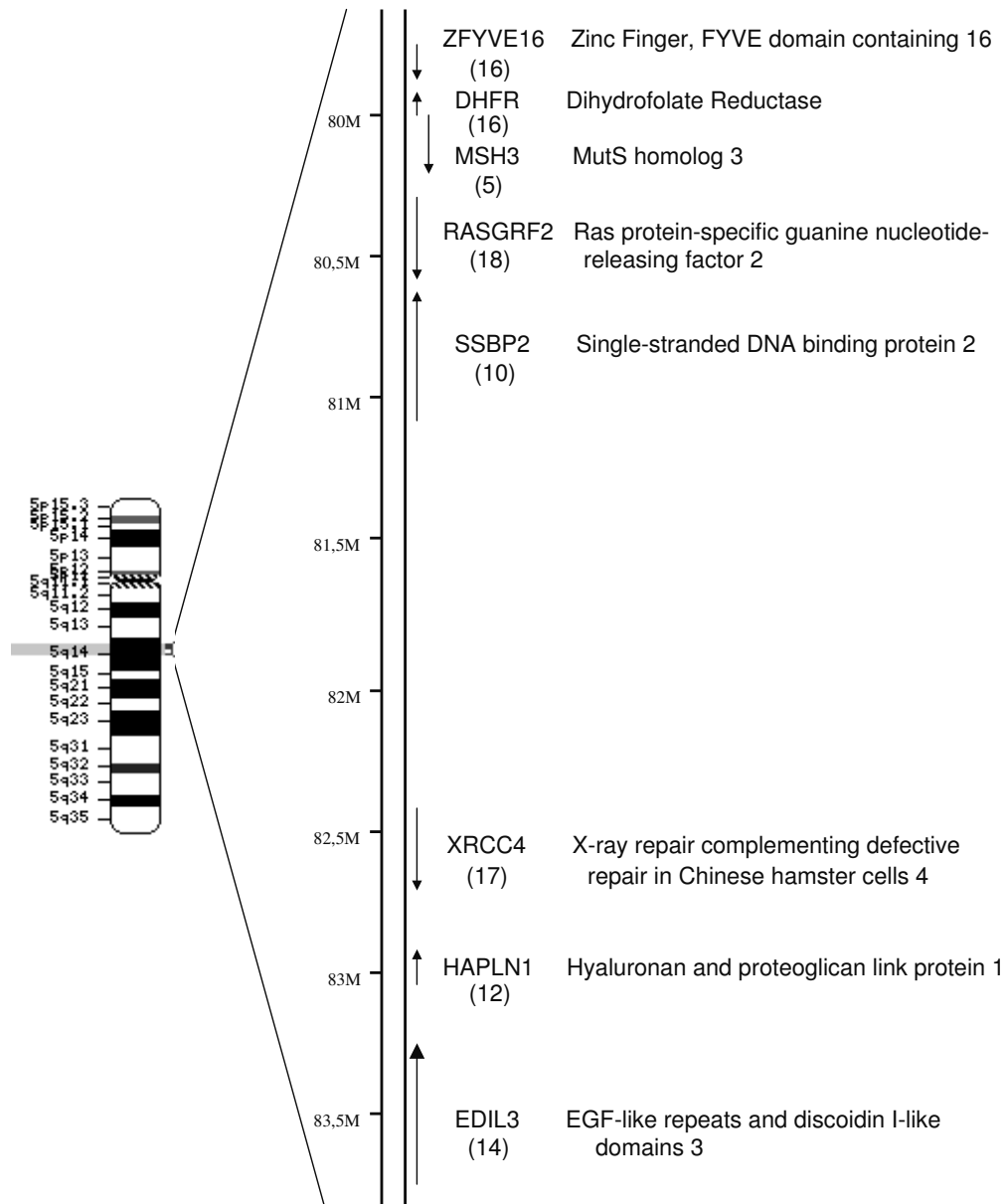


Figure 2
Localization of *dhfr* and other genes in chromosome 5 that are overexpressed in HT29 MTX-resistant cells. It is presented a magnification of the region in chromosome 5 where *dhfr* is located (5q14). The left part is an ideogram of chromosome 5; the right part shows the relative position of all genes studied that are located in this chromosome and that were amplified. The arrows indicate their transcription orientation and the values in parentheses under the names correspond to their respective copy-number validated by Real-time PCR.

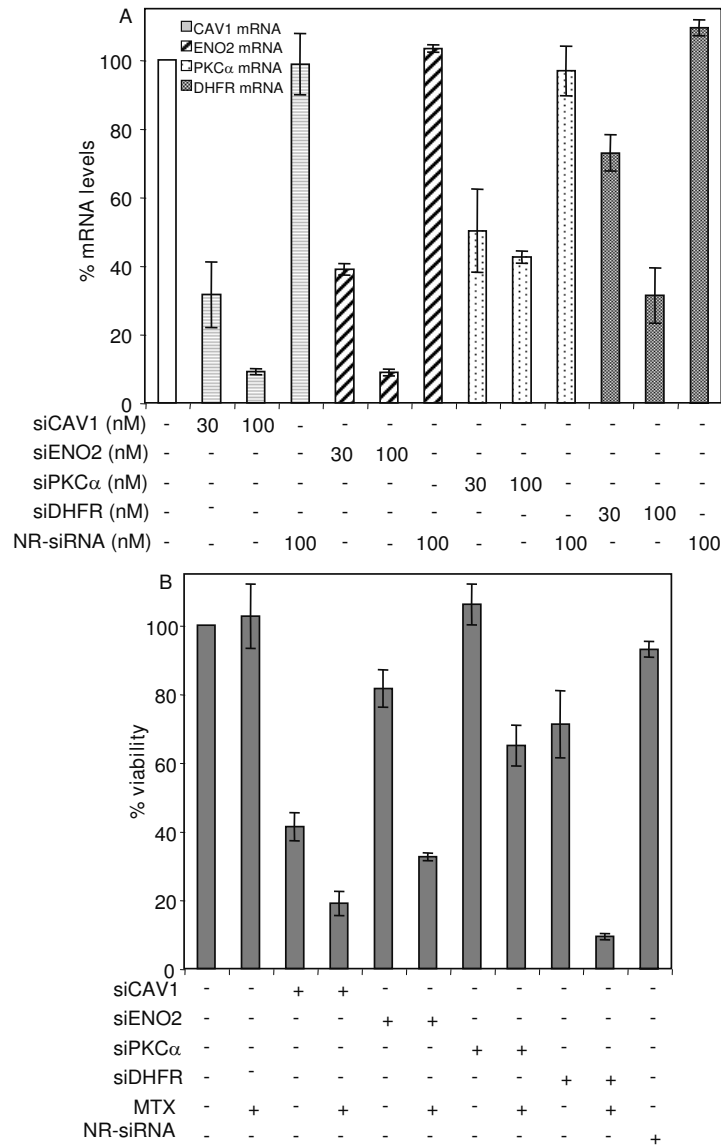


Figure 3
Determination of mRNA levels and cytotoxicity upon siRNA treatment of HT29 sensitive cells. (A) The mRNA levels of CAV1, ENO2, PKC α and DHFR were determined by RT-Real-time PCR 48 h after treatment of HT29 cells with the indicated concentrations of siCAV1, siENO2, siPKC α , siDHFR and a non-related siRNA. Symbols used for each mRNA are presented as an insert within the figure. (B) Cells were treated with 100 nM of each siRNA as previously described and 5×10^{-8} M MTX was added after 48 h. Cell viability was determined after 5 days from the beginning of the treatment. All results are expressed as percentages referred to untreated cells. Values are the mean of three independent experiments \pm SE. A non-related (NR) siRNA was used as negative control.

Effect on MTX sensitivity of siRNAs against CAV1, ENO2, PKC α and DHFR

As the knocking down of genes co-amplified with *dhfr* showed only a slight contribution to MTX sensitivity, we focused in three genes that were clearly overexpressed in the resistant cells and located in different chromosomes, namely caveolin 1 (CAV1), enolase 2 (ENO2) and PKC α . We quantified the mRNA levels of these three genes after treatment with different concentrations of the corresponding siRNA using RT-Real-time PCR. The three siRNAs were effective in reducing the mRNA levels of their targets, both in sensitive (Figure 3A) and in MTX-resistant (Figure 4) HT29 cells. One hundred nanomolar was the most effective concentration for all of them, and was used in subsequent experiments. The mRNA levels upon treatment with the siRNA against DHFR are also presented in these series (Figure 3A & 4). The mRNA levels of the four genes after treatment with their respective siRNAs in the resistant cells were reduced down almost to the expression levels found for these genes in HT29 sensitive cells (compare Y-axes between Figure 3A & 4). A non-related siRNA was used as negative control, and did not produce any significant reduction on the mRNA levels of any of the four genes, either in sensitive or in resistant HT29 cells.

Viability of HT29 sensitive cells (Figure 3B) was moderately reduced upon treatment with 100 nM siENO2 or siDHFR and treatment with siCAV1 caused a marked reduction of cell viability on its own. No effect on cell viability was observed upon treatment with siPKC α . In all cases, treatment with 100 nM of each single siRNA increased the sensitivity of HT29 cells toward MTX with respect to the control: 80% when using siCAV1; 70% with siENO2; 40% with siPKC α and 90% when siDHFR was used. However, when the same treatments were performed in MTX-resistant cells (data not shown), cell viability was reduced only by 15% when using either siCAV1, siENO2 or siPKC α , and by 25% when siDHFR was used. None of these effects were improved by the combination of siRNAs with MTX. Transfection with 100 nM of a non-related siRNA did not cause any significant reduction on cell viability, either in sensitive or in resistant HT29 cells.

Effect of the combination of siRNAs against CAV1, ENO2, PKC α and DHFR on MTX sensitivity

As we had observed a chemosensitization toward MTX in sensitive cells when using individual siRNAs, we performed experiments including the siRNAs against CAV1, ENO2 and PKC α (triple combination) or in combination with siDHFR (quadruple combination) to test if these combinations also increased the sensitivity toward MTX. Treatments combining the three siRNAs (siCAV1, siENO2 and siPKC α) at 100 nM each reduced cell viability by 30% and effectively increased MTX sensitivity by 60% with respect to the control in HT29 sensitive cells (Figure 5A).

Addition of 100 nM siDHFR to the previous combination caused a reduction on cell viability of the same degree as the triple combination but increased MTX sensitivity to about 75%. In the case of MTX-resistant HT29 cells, treatments were performed with the same combinations (Figure 5B). The triple combination reduced cell viability by 15% on its own. However, MTX sensitivity was not improved. The quadruple combination did not affect cell viability on its own but caused a reduction of 20% on cell viability when combined with MTX. It was confirmed that the mRNA levels of the four genes were decreased after the siRNA combination treatments in both cell lines (Table 2). Treatments with a non-related siRNA at 400 nM were performed in order to assess the cytotoxicity of triple and quadruple combinations and to verify the mRNA levels of all four genes. No effect was observed in any case in either sensitive or resistant cells.

Effect of overexpressing E-cadherin on its mRNA levels, cell viability and MTX sensitivity

Since E-cadherin was lost and underexpressed in the resistant cells, it was transiently expressed in HT29 sensitive and resistant cells by means of an expression vector (pBATEM2-CDH). Cells were harvested after 48 hours of treatment. RT-Real-Time PCR was used to quantify E-cadherin mRNA levels in both cell lines (Figure 6A & 6B). Transfection of more than 1 μ g of the expression vector caused a marked reduction on cell viability in both cell lines. Therefore, 1 μ g of plasmid was used in all subsequent experiments. Overexpression of E-cadherin was performed in HT29 sensitive cells in the absence or in the presence of 5×10^{-8} M MTX. This treatment increased by 50% the effect of methotrexate (Figure 6C), thus providing evidence that loss of E-cadherin can confer increased resistance of HT29 cells toward MTX. The same approach was used with HT29 resistant cells, in combination or not with 10^{-5} M MTX. Overexpression of E-cadherin reduced by 10% cell viability of the resistant cells and only a small improvement was observed when combining E-cadherin overexpression with MTX treatment (Figure 6D).

Effect of co-transfection of siCAV1 and pBATEM2-CDH on MTX sensitivity

E-cadherin has been shown to be an important permissive element in defining the functions of CAV1 [16]. Thus, we performed co-transfection experiments to reduce the mRNA levels of CAV1 and to overexpress E-cadherin simultaneously. mRNA levels after co-transfection were determined in both cell lines (Table 3). As observed in figure 7A, altering the mRNA levels for the two genes reduced the viability of HT29 sensitive cells by almost 40%. Moreover, addition of MTX to the previous combination further reduced cell viability by 90%. Importantly, when performing these co-transfection experiments in HT29 resistant cells, cell viability was reduced by 80%,

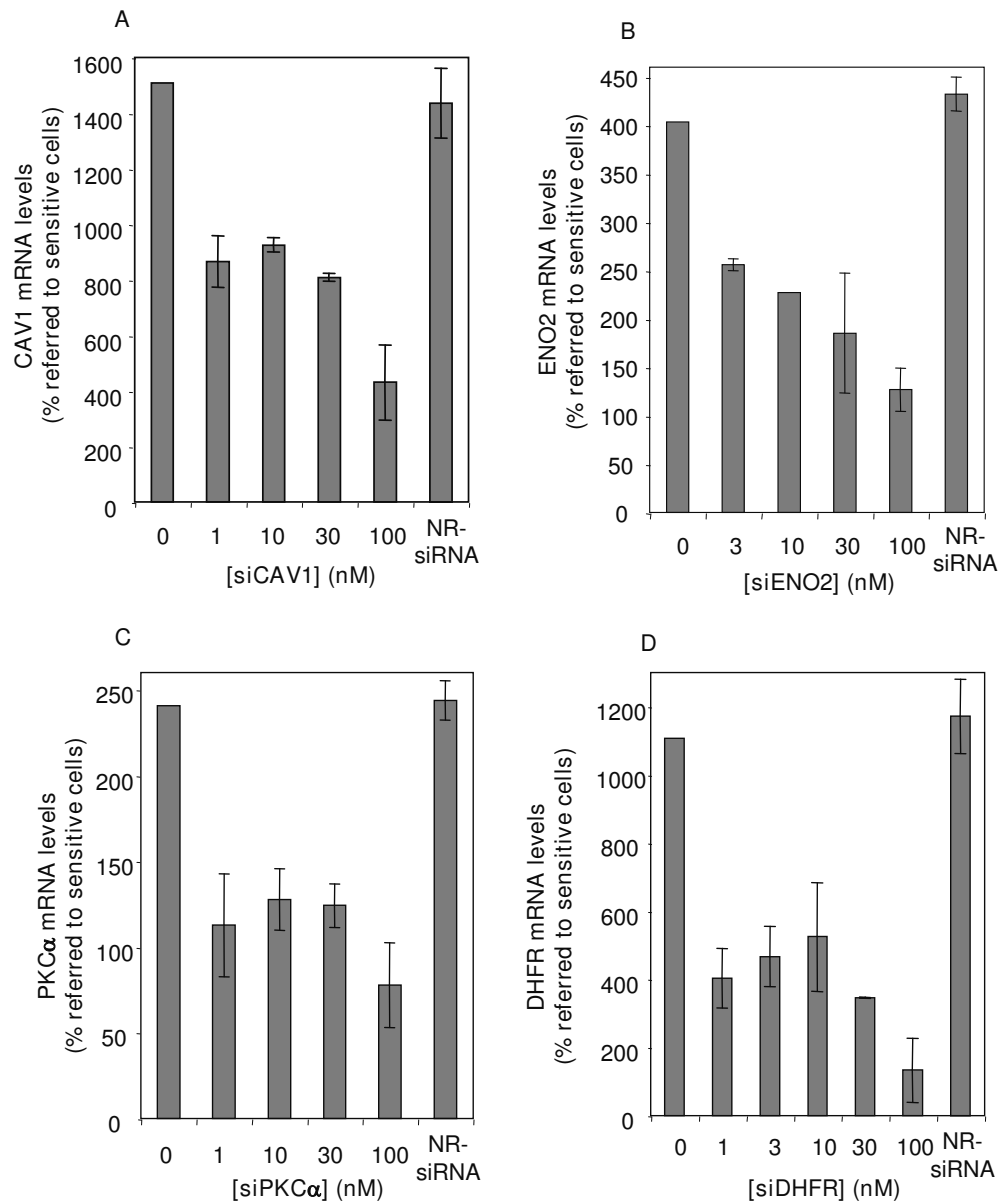


Figure 4
mRNA levels of CAV1, ENO2, PKC α and DHFR upon siRNA treatment of MTX-resistant cells. Treatments with increasing amounts of each siRNA were performed in MTX-resistant HT29 cells. Forty-eight hours later, mRNA levels for each gene were determined and expressed as percentages of the untreated control (A, CAV1; B, ENO2; C, PKC α and D, DHFR). A non-related (NR) siRNA was used as negative control. Results are depicted taking into account the relative gene expression in the resistant cells (% of the sensitive cells). Values are the mean of three independent experiments \pm SE.

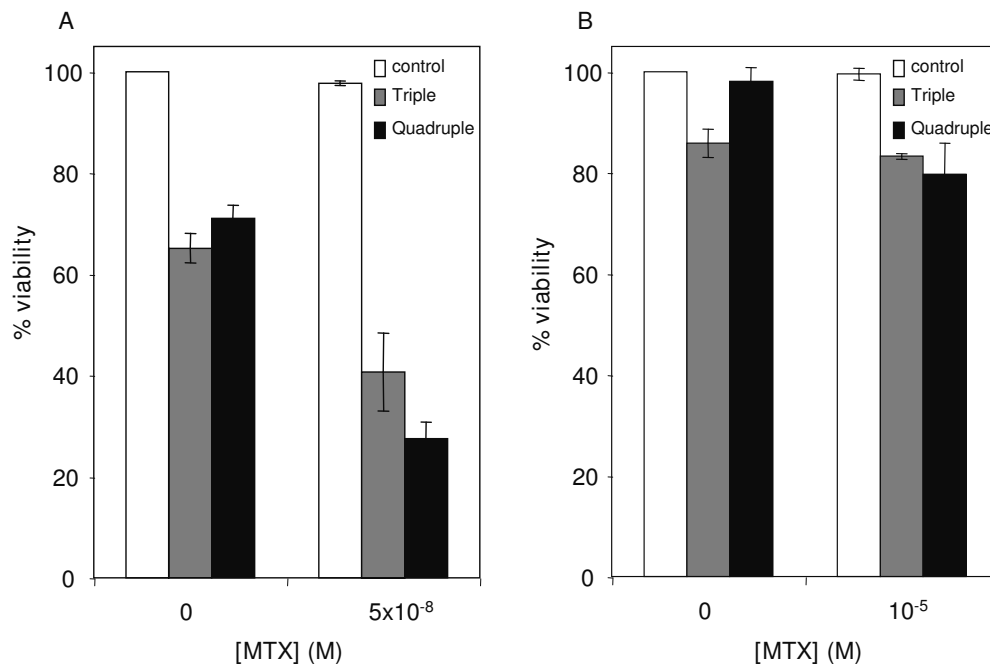


Figure 5
Effects of combining siRNAs against CAV1, ENO2, PKC α and DHFR on MTX sensitivity. Treatments with combinations of siRNAs at 100 nM each were performed both in sensitive (A) and in resistant cells (B). MTX was added after 48 h and cell viability was determined by the MTT assay after 5 days from the beginning of the treatment. The triple combination includes the siRNAs against CAV1, ENO2 and PKC α ; the quadruple combination includes the three previous siRNAs plus siD-HFR. Results are presented as percentages referred to the untreated cells. Values are the mean of three independent experiments \pm SE.

although in this instance MTX did not improve the effect (Figure 7B).

Discussion

In the present study, genes differentially expressed in HT29 colon cancer cells resistant to MTX were identified and their relative contribution to this phenotype evaluated. We observed a cluster of genes flanking the *dhfr* locus in chromosome 5 that were overexpressed in MTX-resistant HT29 cells. Two of the genes included in this cluster, MSH3 and XRCC4, are known to be involved in DNA repair [17-19]; other two, RASGRF2 and SSBP2, have been related to signaling pathways [20-22]; and EDIL3 has been suggested to prevent apoptosis and to promote cell proliferation [23,24]. Despite the confirmation of the co-amplification of all these genes with *dhfr* in the resistant cells, we did not observe a clear sensitization toward MTX when reducing their respective mRNA levels by means of

siRNA technology. Our observations indicate that the increase in copy-number and the resulting upregulation of the studied genes in 5q14 may be a consequence of *dhfr* amplification more than an adaptation of the cells to MTX resistance. Indeed, many mammalian species (mouse, rat, bull, cock, dog and chimpanzee) show this set of genes in the same order around *dhfr* as in human chromosome 5 (using the MapViewer at NCBI), indicating a conserved pattern of gene organization. In keeping with this, its overexpression in the resistant cells could have been useful to improve some cellular processes that might facilitate survival. However, as shown in this work, the increase in copy number of this set of genes does not favor MTX resistance. Thus, we decided to search for other differentially expressed genes (CAV1, E-cadherin, ENO2 and PKC α) that had been previously related with resistance or with colon cancer and to evaluate their relative contribution in our cell system.

Table 2: mRNA levels upon treatment with combination of siRNAs against CAV1, ENO2, PKC α and DHFR.

A				
Treatment	CAV1	ENO2	PKC α	DHFR
siCAV1 + siENO2 + siPKC α	50.1 \pm 4.3	50.5 \pm 4.4	66.2 \pm 2.6	82.9 \pm 2.3
siCAV1 + siENO2 + siPKC α + siDHFR	37.7 \pm 3.7	59.1 \pm 0.8	47.6 \pm 4.7	47.3 \pm 1.2
400 nM NR-siRNA	96.8 \pm 10.4	98.4 \pm 0.5	96.3 \pm 0.3	100.6 \pm 13.4
B				
Treatment	CAV1	ENO2	PKC α	DHFR
siCAV1 + siENO2 + siPKC α	62.7 \pm 0.2	44.20 \pm 0.9	73.2 \pm 4.9	97.7 \pm 8.8
siCAV1 + siENO2 + siPKC α + siDHFR	45.4 \pm 0.8	36.34 \pm 4.2	40.6 \pm 2.5	33.4 \pm 3.8
400 nM NR-siRNA	99.1 \pm 9.2	100.57 \pm 15.9	103.2 \pm 1.1	95.5 \pm 10.2

Treatments combining the siRNAs against CAV1, ENO2 and PKC α at 100 nM each were performed both in sensitive (A) and in resistant (B) HT29 cells. The mRNA levels for all three genes were determined at 48 hours of treatment. DHFR mRNA levels were also determined. Treatments combining 100 nM of the previous three siRNAs plus a siRNA against DHFR were also performed in both cell lines and mRNA levels for the four genes quantified by RT-Real-Time PCR. A non-related (NR) siRNA was used as negative control. Results are expressed as percentages of mRNA referred to untreated cells (mean \pm SE) of triplicate experiments.

Enolase 2 (ENO2) is induced by hypoxia, an intrinsic condition of tumors. Moreover, ENO2 is a glycolysis-related gene that has been described to play an important role in tumorigenesis of colorectal cancers [25]. Indeed, ENO2 is upregulated in a variety of cancers [26-28] and alpha-enolase is significantly upregulated in a metastatic colon cancer cell line, suggesting a possible association with the metastatic process *in vitro* and *in vivo* [29]. Indeed, we observed a notable contribution of ENO2 to MTX resistance when treating the sensitive cells with siENO2.

Both the α -isozyme of PKC and caveolin 1 has been described to be associated with multidrug resistance [30,31], and thus represent good targets to be analyzed. PKC α phosphorylates different proteins, which triggers a wide variety of cellular responses including proliferation, differentiation, membrane transport, gene expression and tumor promotion [32,33]. Chemical inhibitors of PKC activity have been proposed as resistance modulators in MTX chemotherapy [34]. Furthermore, decreasing PKC α mRNA levels attenuates the MDR phenotype in tumor cells [35] and increases the sensitivity to anticancer drugs, both *in vitro* [36-38] and *in vivo* [39]. These observations are in accordance with our result showing that the decrease of PKC α mRNA levels by means of iRNA technology causes a sensitization of the cells toward MTX. Caveolin 1 (CAV1), the principal component of caveolae, has been associated with progression of colon and breast carcinomas [40,41] and with enhanced invasiveness in lung adenocarcinoma cells [42]. Although suggested as tumor suppressor gene, and downregulated in some oncogene-transformed and tumor-derived cells [31], overexpression of CAV1 has been found in prostate and esophageal cancer [43-45]. Moreover, re-expression of CAV1 at latter

stages of tumor development has been described in human and mouse prostate adenocarcinomas [41], a scenario that could resemble chemotherapy resistance. Indeed, Bender *et al.* [46] found significantly higher levels of CAV1 in MTX resistant HT29 clones. We have confirmed the implication of CAV1 in MTX resistance in our HT29 cell line.

Nevertheless, as Benimetskaya and collaborators observed with PKC α [47], downregulation of a gene alone may be insufficient to completely chemosensitize the cells. Therefore, we considered a combination therapy in order to improve MTX sensitivity. As shown in figure 5, the combination of siRNAs against CAV1, ENO2 and PKC α sensitizes the cells toward MTX, and the effect is improved by the additional downregulation of DHFR. The effects of the triple or the quadruple combinations, however, are not the sum of the effects caused by each single siRNA. This probably reflects the difficulty of transfecting more than one siRNA at 100 nM each. Indeed, the mRNA levels for the four genes after the combination treatment were not as reduced as with the single treatments. In the case of all treatments performed in the resistant cells, probably the overexpression by amplification of the *dhfr* locus was powerful enough to mask the effects of the siRNAs used.

Not only the overexpression of some genes may cause the resistance phenotype. One of the most underexpressed genes that we confirmed to be clearly lost in our HT29 MTX-resistant cells is *E-cadherin*. In fact, loss of *E-cadherin*, frequently observed in epithelial tumors, has been associated with tumor progression [48,49] and is considered a crucial event that favors metastasis and invasiveness [50,51]. In addition, the mRNA levels of E-cadherin in

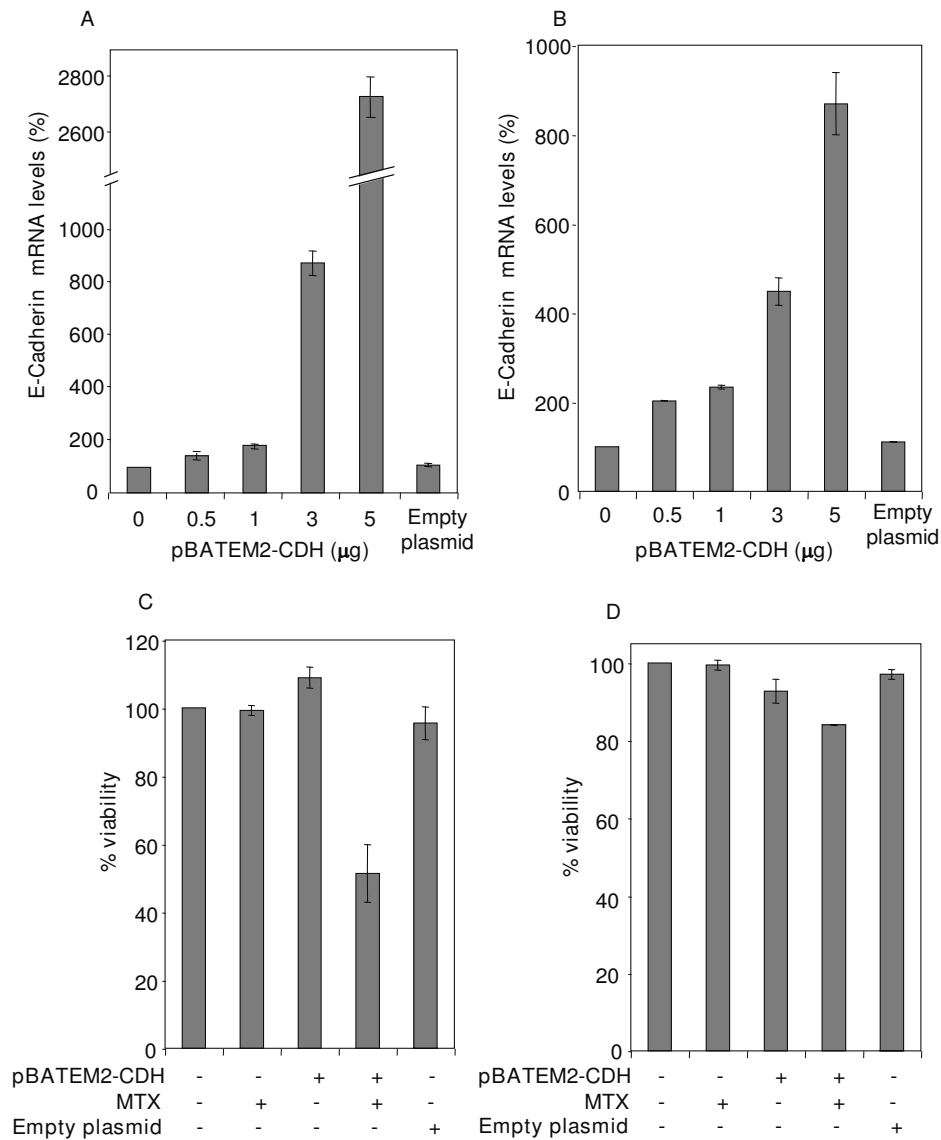


Figure 6
Determination of mRNA levels and cytotoxicity upon overexpression of E-cadherin. Cells were treated with increasing amounts of an expression plasmid encoding for E-cadherin (pBATEM2-CDH). Forty-eight hours after the treatment, mRNA levels were determined in HT29 sensitive (A) and MTX-resistant cells (B). Three independent experiments were performed and results are expressed as percentages referred to untreated cells. Values are the mean \pm SE. Simultaneous experiments of cells transfected with pBATEM2-CDH were treated with MTX 48 h after transfection, and viability of both sensitive (C) and MTX-resistant cells (D) was assessed after 5 days from the beginning of the treatment by the MTT assay. The mean value \pm SE of three independent experiments is depicted. An empty plasmid was used as negative control both for mRNA levels and cytotoxicity determination.

Table 3: mRNA levels upon treatment with siCAV1 and pBATEM2-CDH.

Treatment	Cell line	CAV1	E-cadherin
siCAV1 + pBATEM2-CDH	HT29 sensitive	21.8 ± 1.9	252.3 ± 3.5
siCAV1 + pBATEM2-CDH	HT29 resistant	25.6 ± 0.2	199.7 ± 16.9

Transfection experiments combining the siRNA against caveolin 1 (siCAV1) and the expression plasmid for E-cadherin (pBATEM2-CDH) were performed both in HT29 sensitive and MTX-resistant cells. Forty-eight hours later, mRNA levels for the two genes were determined in both cell lines by RT-Real-Time RCR. Results are expressed as percentages of mRNA referred to untreated cells (mean ± SE) of at least 3 independent experiments.

adenocarcinoma are 2-fold lower than in normal colon cells [52]. Thus, there is a functional correlation between E-cadherin levels and malignancy. It has been described an event of loss of heterozygosity at the 16.1q chromosome band in most human prostate cancers, where *E-cadherin* is located [53], which is associated with tumor grade, advanced clinical stage and poor survival [54]. Our experiments show a decrease of 3-fold in E-cadherin levels in resistant cells and also that a mild overexpression of E-cadherin causes a higher sensitivity toward MTX. One has to be cautious, however, about the expression levels of E-cadherin since an increase of more than 3-fold in any of both cell lines caused a reduction in cell viability. This is in accordance with the experiments of Derksen *et al.* [55] that suggested that loss of *E-cadherin* could play a causal role in the acquisition of anoikis resistance, as parental mammary cells lacking E-cadherin survived while re-expression of the gene caused apoptosis [55]. Previous works show that loss of *E-cadherin* in either skin or mammary epithelium does not induce tumor formation [55]. Thus, an overall view of the events occurring in our HT29 cells resistant to methotrexate is needed.

It has been shown that activated PKC α translocates from the nucleus to the membrane [56], where it associates with caveolae [57,58], and regulates the function and formation of such biological structures. PKC α has been described to directly interact with CAV1. The union is performed between the caveolin 1 scaffolding domain peptide and PKC α caveolin 1 binding motif [59]. Further, activation of PKC α by phorbol esters dislocates the enzyme from caveolae. All these observations indicate that PKC α interacts functionally with this membrane structures. Moreover, PKC α has been proposed to be involved in the rearrangement of the cytoskeleton. Masur *et al.* showed that a high level of PKC α expression plus a low E-cadherin level predicts an elevated migratory activity of colon carcinoma cells, which could be derived more easily to metastasis [56]. Lahn *et al.* speculate that PKC α overexpression may represent an important cellular event leading to enhanced tumor progression, as they concluded that MCF-7 breast cancer cells transfected with PKC α had reduced expression of E-cadherin and β -catenin, resulting in a loss of cell-cell adhesion and thus in a more aggressive tumor phenotype [38].

Specific protein-protein interactions between CAV1 and other proteins have been proposed to regulate cell signaling [57,60]. Indeed, CAV1 is known to control cell proliferation and viability by inhibiting expression of survivin, a member of the IAP (inhibitor of apoptosis) family via a transcriptional mechanism involving the β -catenin-Tcf/Lef-1 pathway [16]. One of the possible locations of β -catenin is within a complex with E-cadherin in the adherence junctions, specialized cell-cell adhesion sites that link the cadherin molecules to the actin microfilaments [61]. E-cadherin promotes co-localization and co-immunoprecipitation of CAV1 with β -catenin, as well as inhibition of β -catenin-Tcf/Lef-1 dependent transcription of a wide variety of genes regulated by this pathway, among which survivin is found. However, the ability of CAV1 to regulate survivin expression and cell proliferation is severely impaired in metastatic cancer cells lacking E-cadherin [16]. If *E-cadherin* is lost, β -catenin is not retained in the plasma membrane and can be then translocated into the nucleus [62], thus activating Tcf/Lef-1 transcription factors-mediated expression of genes implicated in cell proliferation and tumor progression [50]. E-cadherin has been shown to be an important permissive element in defining the functions of CAV1, since several characteristics potentially relevant to CAV1 function as a tumor suppressor are compromised in E-cadherin-deficient HT29 cells [16]. A diagram showing all these relations is presented in Figure 8.

Our results show that HT29 cells can be well sensitized toward MTX by simultaneous treatment with siCAV1 and pBATEM2-CDH. Importantly, we can revert the resistant scenario by reducing the levels of caveolin 1 and by overexpressing E-cadherin simultaneously in the resistant cells, demonstrating the roles that play both genes in MTX resistance.

Conclusion

We demonstrate that, aside from *dhfr*, the contribution of the 5q14 co-amplified genes to MTX resistance is small in HT29 colon cancer cells. On the other hand, we have identified genes deregulated in MTX resistant cells and have demonstrated a role for caveolin 1, E-cadherin, eno-1 and PKC α in MTX resistance. Very importantly, the concomitant knocking down of CAV1 with overexpres-

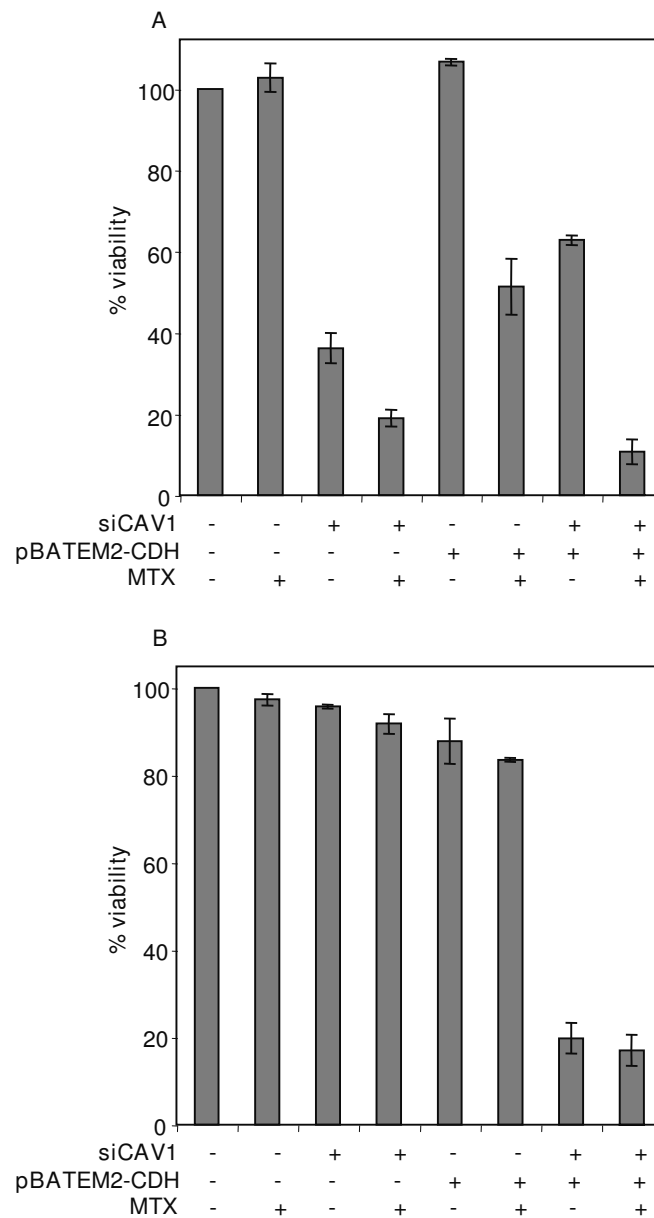
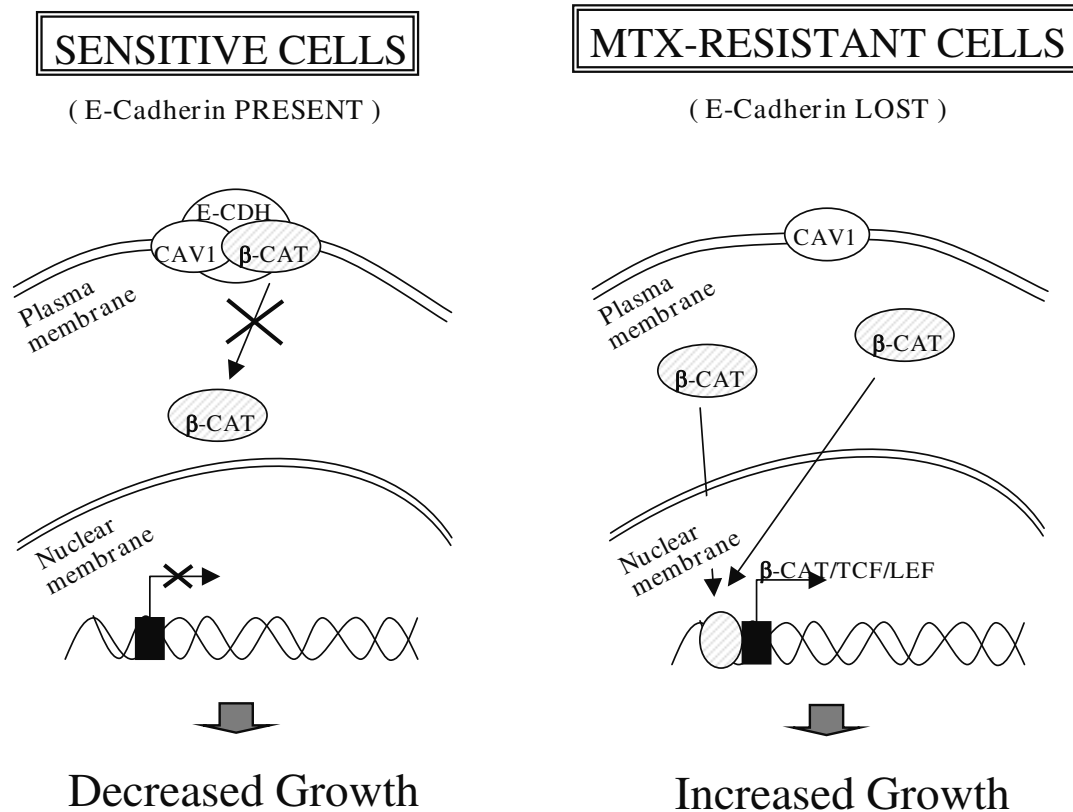


Figure 7
Effect of combining the siRNA against CAV1 and the expression plasmid for E-cadherin. One hundred nanomolar siRNA against CAV1 and 1 µg of the expression plasmid for E-cadherin were transfected in both sensitive (A) and resistant (B) HT29 cells. MTX was added 48 hours after transfection and the MTT assay was used to determine cell viability. Results are expressed as percentages referred to untreated cells. Values are the mean of three independent experiments ± SE.

**Figure 8**

Scheme for HT29 sensitive and MTX-resistant cells. A diagram is presented showing the compartment localization of CAVI, E-cadherin (E-CDH) and β -catenin (β -CAT) in HT29 sensitive cells (with E-cadherin) and MTX-resistant cells (without E-cadherin, gene loss) and the effects caused by this differential situation. In the sensitive cells, β -catenin is located in the adherence junctions within a complex with E-cadherin. CAVI co-localizes with β -catenin in these complexes, interfering in β -CAT signaling. If *E-cadherin* is lost, as in the resistant cells, β -catenin is not retained in the plasma membrane and then can be translocated into the nucleus, thus activating Tcf/Lef-1 transcription factors-mediated expression of genes implicated in cell proliferation and tumor progression.

sion of E-cadherin in HT29 resistant cells markedly reduced cell viability.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ES carried out the siRNA and plasmid transfections, the determination of mRNA levels and associated cytotoxicity after these treatments, and drafted the manuscript. CM carried out the mRNA levels validations, the copy number

determinations and helped to draft the manuscript. VN helped with data interpretation and to draft the manuscript, critically revising it. MAP participated in the design of the study and in its coordination, and helped to revise the manuscript. CJC conceived the study, participated in microarray data analyses and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Table of genes differentially expressed by 3 fold. Excel file containing the list of 3-fold differentially expressed genes generated using GeneSpring software v 7.3.1. It includes the GenBank numbers of all genes, their respective common names and the associated description. The chromosomal localization of the 375 entries and the fold change values relative to the control are provided. A final column informing about one of the Gene Ontology categories to which the genes belong according to GeneSpring is included. The differentially expressed transcripts corresponding to open reading frames, transcribed sequences, cDNA clones or hypothetical genes were deleted.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1755-8794-1-35-S1.xls>]

Additional file 2

Primers used to validate mRNA levels of selected genes. PDF file with sequences for the primers used to quantify the mRNA levels of genes studied, next to their common name and the number of the chromosome where they are located.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1755-8794-1-35-S2.pdf>]

Additional file 3

Primers used to determine the copy-number of selected genes. PDF file with common names, chromosome number and the sequences of primers used to amplify their respective DNAs for all selected genes.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1755-8794-1-35-S3.pdf>]

Additional file 4

Sequences for the sense strand of all siRNAs used. PDF file where the sequences for the sense strand of all the siRNAs used are provided next to the names used to designate all them and the genes they are directed against.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1755-8794-1-35-S4.pdf>]

Acknowledgements

This work was supported by grants SAF05-247 and SAF08-00043 to CJC and SAF06-351 to MAP, all from "Plan Nacional de I+D+I", and ISCIII-RETIC RD06/0020. Our research group holds the "quality distinction" from the "Generalitat de Catalunya" SGR05-0883. E.S. is a recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT).

pBATEM2-CDH was kindly provided by Dr. Duñach, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

References

- World Health Organization [<http://www.who.int>]
- Morales C, Ribas M, Aiza G, Peinado MA: **Genetic determinants of methotrexate responsiveness and resistance in colon cancer cells.** *Oncogene* 2005, **24**:6842-7.
- Heppner GH, Miller FR: **The cellular basis of tumor progression.** *Int Rev Cytol* 1998, **177**:1-56.
- Chen MJ, Shimada T, Moulton AD, Cline A, Humphries RK, Maizel J, Nienhuis AW: **The functional human dihydrofolate reductase gene.** *J Biol Chem* 1984, **259**:3933-43.
- Chu E, Grem JL, Johnston PG, Allegra CJ: **New concepts for the development and use of antifolates.** *Stem Cells* 1996, **14**:41-6.
- Guglielmi A, Barni S, Zaniboni A, Pella N, Belvedere O, Beretta GD, Grossi F, Frontini L, Puglisi F, Labianca R, Sobrero A: **Phase II study of a triplet regimen in advanced colorectal cancer using methotrexate, oxaliplatin and 5-fluorouracil.** *Br J Cancer* 2004, **91**:1428-33.
- Sobrero A, Frassinetti G, Falcone A, Dogliotti L, Rosso R, Di Costanzo F, Bruzzi P: **Adjuvant sequential methotrexate --> 5-fluorouracil vs 5-fluorouracil plus leucovorin in radically resected stage III and high-risk stage II colon cancer.** *Br J Cancer* 2005, **92**:24-9.
- Zampino MG, Lorizzo K, Rocca A, Locatelli M, Zorzino L, Manzoni S, Mazzetta C, Fazio N, Biffi R, De Braud F: **Oxaliplatin combined with 5-fluorouracil and methotrexate in advanced colorectal cancer.** *Anticancer Res* 2006, **26**:2425-8.
- Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW: **Chromosome aberrations in solid tumors.** *Nat Genet* 2003, **34**:369-76.
- Singer MJ, Mesner LD, Friedman CL, Trask BJ, Hamlin JL: **Amplification of the human dihydrofolate reductase gene via double minutes is initiated by chromosome breaks.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:7921-6.
- Rots MG, Pieters R, Kaspers GJ, Veerman AJ, Peters GJ, Jansen G: **Classification of ex vivo methotrexate resistance in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia.** *Br J Haematol* 2000, **110**:791-800.
- Selga E, Noe V, Ciudad CJ: **Transcriptional regulation of aldo-keto reductase I C1 in HT29 human colon cancer cells resistant to methotrexate: role in the cell cycle and apoptosis.** *Biochem Pharmacol* 2008, **75**:414-26.
- Gene Expression Omnibus [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>]
- Rocke DM, Durbin B: **A model for measurement error for gene expression arrays.** *J Comput Biol* 2001, **8**:557-69.
- Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods* 1983, **65**:55-63.
- Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, Lladser A, Arredondo C, Leyton L, Quest AF: **E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:7703-17.
- Drummond JT, Genschel J, Wolf E, Modrich P: **DHFR/MSH3 amplification in methotrexate-resistant cells alters the hMutSalpha/hMutSbeta ratio and reduces the efficiency of base-base mismatch repair.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:10144-9.
- Pandit B, Roy M, Dutta J, Padhi BK, Bhoumik G, Bhattacharyya NP: **Co-amplification of dhfr and a homologue of hmsh3 in a Chinese hamster methotrexate-resistant cell line correlates with resistance to a range of chemotherapeutic drugs.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2001, **48**:312-8.
- Jones KR, Gewirtz DA, Yannone SM, Zhou S, Schatz DG, Valerie K, Povirk LF: **Radiosensitization of MDA-MB-231 breast tumor cells by adenovirus-mediated overexpression of a fragment of the XRCC4 protein.** *Mol Cancer Ther* 2005, **4**:1541-7.
- Arozarena I, Matallanas D, Berciano MT, Sanz-Moreno V, Calvo F, Munoz MT, Egea G, Lafarga M, Crespo P: **Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:1516-30.
- Malumbres M, Pellicer A: **RAS pathways to cell cycle control and cell transformation.** *Front Biosci* 1998, **3**:d887-912.
- Liang H, Samanta S, Nagarajan L: **SSBP2, a candidate tumor suppressor gene, induces growth arrest and differentiation of myeloid leukemia cells.** *Oncogene* 2005, **24**:2625-34.
- Rezaee M, Penta K, Quertermous T: **Dell1 mediates VSMC adhesion, migration, and proliferation through interaction with integrin alpha(v)beta(3).** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, **282**:H1924-32.
- Petitclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Cheresh DA, Brooks PC: **Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival.** *Cancer Res* 1999, **59**:2724-30.
- Yeh CS, Wang JY, Chung FY, Lee SC, Huang MY, Kuo CW, Yang MJ, Lin SR: **Significance of the glycolytic pathway and glycolysis**

- related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncol Rep* 2008, **19**:81-91.
26. Karnak D, Beder S, Kayacan O, Ibis E, Oflaz G: **Neuron-specific enolase and lung cancer.** *Am J Clin Oncol* 2005, **28**:586-90.
 27. Fujiwara H, Arima N, Ohtsubo H, Matsumoto T, Kukita T, Kawada H, Imaizumi R, Ozaki A, Matsushita K, Tei C: **Clinical significance of serum neuron-specific enolase in patients with adult T-cell leukemia.** *Am J Hematol* 2002, **71**:80-4.
 28. Kitakata H, Yasumoto K, Sudo Y, Minato H, Takahashi Y: **A case of primary small cell carcinoma of the breast.** *Breast Cancer* 2007, **14**:414-9.
 29. Katayama M, Nakano H, Ishiuchi A, Wu W, Oshima R, Sakurai J, Nishikawa H, Yamaguchi S, Otsubo T: **Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Surg Today* 2006, **36**:1085-93.
 30. Yu G, Ahmad S, Aquino A, Fairchild CR, Trepel JB, Ohno S, Suzuki K, Tsuruo T, Cowan KH, Glazer RI: **Transfection with protein kinase C alpha confers increased multidrug resistance to MCF-7 cells expressing P-glycoprotein.** *Cancer Commun* 1991, **3**:181-9.
 31. Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M: **Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**:32380-3.
 32. Martelli AM, Sang N, Borgatti P, Capitani S, Neri LM: **Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C.** *J Cell Biochem* 1999, **74**:499-521.
 33. Wang XY, Repasky E, Liu HT: **Antisense inhibition of protein kinase C alpha reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells.** *Exp Cell Res* 1999, **250**:253-63.
 34. Noe V, Ciudad CJ: **Protein kinase C inhibitors reduce phorbol ester-induced resistance to methotrexate in Chinese hamster ovary cells.** *Biochem Pharmacol* 1995, **50**:337-46.
 35. Ahmad S, Glazer RI: **Expression of the antisense cDNA for protein kinase C alpha attenuates resistance in doxorubicin-resistant MCF-7 breast carcinoma cells.** *Mol Pharmacol* 1993, **43**:858-62.
 36. Wang XY, Liu HT: **Antisense expression of protein kinase C alpha improved sensitivity to anticancer drugs in human lung cancer LTPa-2 cells.** *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1998, **19**:265-8.
 37. Isonishi S, Ohkawa K, Tanaka T, Howell SB: **Depletion of protein kinase C (PKC) by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) enhances platinum drug sensitivity in human ovarian carcinoma cells.** *Br J Cancer* 2000, **82**:34-8.
 38. Lahn M, Kohler G, Sundell K, Su C, Li S, Paterson BM, Bumol TF: **Protein kinase C alpha expression in breast and ovarian cancer.** *Oncology* 2004, **67**:1-10.
 39. Geiger T, Muller M, Dean NM, Fabbro D: **Antitumor activity of a PKC-alpha antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted into nude mice.** *Anticancer Drug Des* 1998, **13**:35-45.
 40. Thompson TC: **Metastasis-related genes in prostate cancer: the role of caveolin-1.** *Cancer Metastasis Rev* 1998, **17**:439-42.
 41. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC: **Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer.** *Clin Cancer Res* 1998, **4**:1873-80.
 42. Ho CC, Huang PH, Huang HY, Chen YH, Yang PC, Hsu SM: **Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation.** *Am J Pathol* 2002, **161**:1647-56.
 43. Li L, Yang G, Ebara S, Satoh T, Nasu Y, Timme TL, Ren C, Wang J, Tahir SA, Thompson TC: **Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**:4386-92.
 44. Kato K, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H: **Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage.** *Cancer* 2002, **94**:929-33.
 45. Mouraviev V, Li L, Tahir SA, Yang G, Timme TM, Goltsov A, Ren C, Satoh T, Wheeler TM, Ittmann MM, Miles BJ, Amato RJ, Kadmon D, Thompson TC: **The role of caveolin-1 in androgen insensitive prostate cancer.** *J Urol* 2002, **168**:1589-96.
 46. Bender FC, Reymond MA, Bron C, Quest AF: **Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity.** *Cancer Res* 2000, **60**:5870-8.
 47. Benimetskaya L, Miller P, Benimetsky S, Maciaszek A, Guga P, Beaucage SL, Wilk A, Grajkowski A, Halperin AL, Stein CA: **Inhibition of potentially anti-apoptotic proteins by antisense protein kinase C-alpha (Isis 3521) and antisense bcl-2 (G3139) phosphorothioate oligodeoxynucleotides: relationship to the decreased viability of T24 bladder and PC3 prostate cancer cells.** *Mol Pharmacol* 2001, **60**:1296-307.
 48. Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W: **Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion.** *J Cell Biol* 1989, **108**:2435-47.
 49. Perl AK, Wlilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: **A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.** *Nature* 1998, **392**:190-3.
 50. Cavallaro U, Christofori G: **Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:118-32.
 51. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W: **E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.** *J Cell Biol* 1991, **113**:173-85.
 52. Munro SB, Turner IM, Farookhi R, Blaschuk OW, Jothy S: **E-cadherin and OB-cadherin mRNA levels in normal human colon and colon carcinoma.** *Exp Mol Pathol* 1995, **62**:118-22.
 53. Suzuki H, Komiya A, Emi M, Kuramochi H, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J: **Three distinct commonly deleted regions of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancers.** *Genes Chromosomes Cancer* 1996, **17**:225-33.
 54. Cheng L, Nagabhushan M, Pretlow TP, Amini SB, Pretlow TG: **Expression of E-cadherin in primary and metastatic prostate cancer.** *Am J Pathol* 1996, **148**:1375-80.
 55. Derksen PW, Liu X, Saridin F, Gulden H van der, Zevenhoven J, Evers B, van Beijnum JR, Griffioen AW, Vink J, Krimpenfort P, Peterse JL, Cardiff RD, Berns A, Jonkers J: **Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis.** *Cancer Cell* 2006, **10**:437-49.
 56. Masur K, Lang K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F: **High PKC alpha and low E-cadherin expression contribute to high migratory activity of colon carcinoma cells.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:1973-82.
 57. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M: **Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease.** *J Cell Biol* 1994, **126**:111-26.
 58. Liu P, Rudick M, Anderson RG: **Multiple functions of caveolin-1.** *J Biol Chem* 2002, **277**:41295-8.
 59. Oka N, Yamamoto M, Schwencke C, Kawabe J, Ebina T, Ohno S, Couet J, Lisanti MP, Ishikawa Y: **Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide.** *J Biol Chem* 1997, **272**:33416-21.
 60. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP: **Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.** *J Biol Chem* 1998, **273**:5419-22.
 61. Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh JT: **The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy.** *Acta Biochim Pol* 2004, **51**:445-57.
 62. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T: **Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:10356-61.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1755-8794/1/35/prepub>

4.3- ARTICLE III:

Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate

Elisabet Selga, Carlota Oleaga, Cristina de Almagro, Véronique Noé & Carlos J. Ciudad

Manuscrit en revisió.

Paral·lelament als estudis d'expressió gènica diferencial realitzats a les cèl·lules HT29 resistents al MTX, ens vam proposar realitzar el mateix tipus d'aproximació en altres línies cel·lulars tumorals humanes. Es van escollir: una segona línia cel·lular de càncer de colon (Caco-2), dues línies de càncer de mama (MCF-7 i MDA-MB-468), una línia de càncer de pàncrees (MIA PaCa-2), una línia de leucèmia mieloide crònica (K562) i una línia d'osteosarcoma (Saos-2).

Un cop generades les corresponents línies resistents al MTX a partir de les respectives cèl·lules parentals, i realitzat el procés d'hibridació als microarrays d'Affymetrix que comprenen el genoma humà complet, es va procedir a l'anàlisi dels resultats amb el programa informàtic GeneSpring GX v 7.3.1.

Es va realitzar una anàlisi d'agrupament jeràrquic (*hierarchical clustering*) amb totes les mostres de cadascuna de les línies cel·lulars, tan sensibles com resistents. La representació derivada d'aquest tipus d'anàlisi (Figura 1) ens va permetre comprovar que les línies representatives d'un mateix tipus cel·lular (càncer de colon i càncer de mama) mostraven uns patrons d'expressió més semblants entre elles que amb les línies d'altres orígens cel·lulars. Així mateix, també vam poder observar que era més semblant l'expressió gènica entre les cèl·lules sensibles i resistents d'una mateixa línia cel·lular que entre línies diferents.

L'únic gen diferencialment expressat comú a totes les línies cel·lulars estudiades va resultar ser la diana d'acció del MTX, la DHFR. Per tant, es va realitzar en primer lloc

Resultats

un estudi de l'estat d'aquest gen a les cèl·lules resistents, tan a nivell d'mRNA, de proteïna, com de número de còpies de DNA genòmic. Es va confirmar la sobreexpressió de la DHFR a les cèl·lules resistents i es va determinar que aquest gen estava amplificat només a les dues línies cel·lulars de càncer de colon així com en la línia de mama MCF-7 i en la línia de pàncrees MIA PaCa-2.

El fet que les línies cel·lulars d'igual origen tissular compartissin patrons d'expressió semblants, ens va motivar a buscar els gens comuns diferencialment expressats en línies de càncer de colon, línies de càncer de mama i a les altres tres línies cel·lulars estudiades. Les llistes de gens comuns obtingudes (Taula 1) es van utilitzar per generar xarxes d'associació biològica (*biological association networks*, BANs; Figura 2). Aquests BANs van evidenciar gens que representaven els nodes de resposta de l'expressió gènica associada a la resistència al MTX. Concretament, es va observar el gen DKK1 com a node en línies de colon, les UGT1A en línies de mama i l'EEF1A1 com a gen comú entre les altres tres línies cel·lulars d'estudi. Es va generar un BAN que incloïa tots els gens presents en qualsevol de les llistes de gens diferencialment expressats (Figura 3). Els tres gens prèviament observats van resultar també nodes d'aquest nou BAN, pel que es van seleccionar per a la seva validació funcional.

La transfecció d'siRNAs dirigits contra cadascuna de les dianes escollides conjuntament amb MTX va causar una sensibilització de les cèl·lules vers el MTX (Figura 4), fent palesa la contribució del DKK1, de les UGT1A i del EEF1A1 en la resistència al MTX.

En resum, en aquest treball vam demostrar la utilitat dels mètodes d'integració de resultats, com les anàlisis d'agrupament jeràrquic i sobretot la construcció de xarxes d'associació biològica, per a la identificació de dianes potencials per al tractament quimioterapèutic.

Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate

Elisabet Selga, Carlota Oleaga, Cristina de Almagro, Véronique Noé & Carlos J. Ciudad[§]

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

[§]Corresponding author

Email addresses:

ES: eliselga@ub.edu

CO: coleaga@ub.edu

CA: cdealmagro@ub.edu

VN: vnoe@ub.edu

CJC: cciudad@ub.edu

Abstract

Background

The need for an integrated view of all data obtained from high-throughput technologies gave rise to network analyses. These are especially useful to rationalize phenomena in terms of how external perturbations propagate through the expression of genes. To address this issue in the case of drug resistance, we constructed Biological Association Networks of genes differentially expressed in cell lines resistant to methotrexate (MTX).

Results

Seven cell lines representative of colon cancer, breast cancer, pancreatic cancer, leukemia and osteosarcoma were used. The differential expression pattern between sensitive and MTX-resistant cells was determined by microarrays covering the whole human genome and analyzed with the GeneSpring GX v7.3.1. Genes commonly deregulated in colon cancer were subject of Biological Association Networks construction. Dickkopf homolog-1 (DKK1) was a clear node of this network, and functional validations of this target using a siRNA showed a chemosensitization toward methotrexate. Members of the UDP-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A) family formed a network of differentially expressed genes in both breast cancer cell lines studied. siRNA treatment against UGT1A showed also an increase in methotrexate sensitivity. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1) was a gene commonly overexpressed in pancreatic cancer, leukemia and osteosarcoma cell lines, and siRNA treatment against EEF1A1 produced a chemosensitization toward methotrexate.

Conclusions

Biological Association Networks identified DKK1, UGT1As and EEF1A1 as important gene nodes in MTX-resistance. Treatments using iRNA technology against these three genes show chemosensitization toward methotrexate.

Background

The high amount of information obtained with high-throughput technologies like expression microarrays needs to be processed in order to be comprehensible for molecular biologists. In this regard, many computational methods have been developed to facilitate expression data analysis. Gene clustering, gene ontology analysis and pathway analysis are commonly used [1, 2]. Pathways are diagrams manually generated representing the knowledge on molecular interactions and reactions [3] and can be used to visualize the involvement of the differentially expressed genes in specific molecular, cellular or biological processes. However, the complexity of higher organisms cannot be explained solely by a separate number of parts [4]; in the organisms, pathways never exist in isolation, they are part of larger networks, which are more informative and real [5]. Gene networks are capable of describing a large number of interactions in a concise way, and provide a view of the physiological state of an organism at the mRNA level. Biochemical networks can be constructed at several levels and can represent different types of interactions.

Literature mining allows the extraction of meaningful biological information from publications to generate networks [6]. Taking into account the progress in gene expression profiling, elucidating gene networks is an appropriate and timely step on the way to uncovering the complete biochemical network of a cell line.

In this work, we used Biological Association Networks as a tool to define possible targets for gene therapy in combination with methotrexate. A role in MTX resistance has been established for the three node-genes selected, namely DKK1, UGT1As and EEF1A1.

Results

Genes deregulated in Methotrexate resistant cancer cell lines.

In a previous report, we analyzed the differential gene expression between sensitive and MTX-resistant cells from the human colon cancer cell line HT29 [7]. In the present work we extended the study of the gene expression profiles associated to MTX resistance by including 6 more MTX-resistant cell lines. These represented, in addition to colon cancer (CaCo2), breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-468), pancreatic cancer (MIA PaCa-2), erythroblastic leukemia (K562) and osteosarcoma (SaOs-2). Total RNA was extracted for the seven pairs of sensitive and MTX-resistant cell lines, and the expression profile of the 47,000 transcripts and variants included in the HG U133 PLUS 2.0 microarray from Affymetrix was compared between each pair by using GeneSpring GX software v7.3.1. Upon normalization and statistical filtering, lists of 2 fold differentially expressed genes were built as described in M&M. These lists are presented as additional files 1-7. The data discussed in this report have been deposited in GEO.

Hierarchical clustering of genes and cell lines.

We compared the gene expression patterns of all the studied cell lines at a time. Lists of genes bearing a p-value of 0.05 including Benjamini and Hochberg false discovery rate were generated for each cell line, and hierarchical clustering in GeneSpring GX was used to construct both a gene tree and a sample tree (Figure 1), as described in Methods. Two facts can be extracted from this representation: I) there is a high correlation between cell lines sharing the same tissue origin. The two colon cancer cell lines studied (HT29 and Caco-2) are more highly correlated in gene expression with each other than with the other cell lines. The breast cancer cell lines studied

(MCF-7 and MDA-MB-468) behave similarly, although the degree of correlation is slightly lower than with colon cancer cell lines. The other three cell lines studied (MIA PaCa-2, K562 and Saos-2) behave differently from the colon or the breast cancer cell lines, and thus cluster apart from them; and II) the sensitive and resistant cells of each cell line are more correlated in gene expression with each other than with any other sample or cell line.

DHFR status in all cell lines studied.

As DHFR is the target for MTX action, and as it was upregulated in MTX-resistant cells, we validated its overexpression in all cell lines studied. RT- Real-Time PCR was used to quantify its mRNA levels, and DHFR protein levels were determined by Western Blot in both sensitive and MTX-resistant cell lines (Table 2). Copy number determination revealed *dhfr* amplification only in HT29, Caco-2, MCF-7 and MIA PACA-2 resistant cells (Table 2).

Identification of genes in common between cell lines of the same tissue origin.

Venn diagrams were used to compare the lists of 2 fold differentially expressed genes. Lists of overexpressed and underexpressed genes were compared separately in order to find the same expression patterns between the cell lines compared (e.g. genes overexpressed in both cell lines). Comparisons were performed to find common genes between both colon cancer cell lines, and between both breast cancer cell lines studied (Table 1, A & B, respectively). Extra comparisons were made in order to find common genes among MIA PaCa-2, K562 and Saos-2 (Table 1, C).

Detection of nodes upon BANs generation.

Biological Association Networks (BANs) were generated as described in Methods with the lists of differentially expressed genes in common between both colon cancer cell lines, both breast cancer cell lines and among the pancreas cancer, leukemia and

osteosarcoma cell lines (Figure 2, A, B & C, respectively). BAN generation with differentially expressed genes in colon cancer evidenced DKK1 as a clear node of this network, UGT1A family members formed a network of differentially expressed genes in breast cancer, and EEF1A1 was commonly overexpressed in pancreatic cancer, leukemia and osteosarcoma. A BAN was constructed including all the genes of the three lists of differentially expressed genes (Figure 3). DKK1, UGT1A and EEF1A1 seemed to be important nodes of this newly constructed network, and thus were selected for further studies.

Effect on methotrexate sensitivity of siRNAs designed against node genes.

Given that DKK1, UGT1As and EEF1A1 were overexpressed in cells resistant to MTX, we investigated the role of decreasing its mRNA on the sensitivity to this chemotherapeutic agent. HT29 and MDA-MB-468 cell lines were used as model of colon and breast cancer, respectively. MIA PaCa-2 cells were selected among the other three cell lines as model to test for the siRNA effects. Treatment with 100 nM siDKK1 (the siRNA against DKK1 mRNA) increased the sensitivity of HT29 cells towards MTX by about 35% (Figure 4A). Treatment with 100nM siUGT1A (the siRNA against UGT1As) produced an increase in MDA-MB-468 cells sensitivity toward MTX of about 25% (Figure 4B). siEEF1A1 was also effective; treatment with 30nM of this siRNA against EEF1A1 increased the sensitivity of MIA PaCa-2 cells toward MTX by about 30% (Figure 4C).

A non-related siRNA was used as negative control in all the experiments.

Transfection of this siRNA was performed in parallel with the other siRNAs, and was used to normalize the results.

Discussion

In this study, we determined the patterns of differential gene expression associated to methotrexate resistance in seven human cancer cell lines, representative of five tissue origins. Hierarchical clustering of all samples evidenced that cell lines representative of the same tissue type displayed more similar patterns of gene expression between them than with those of the other cell lines. Additionally, we could also observe that the sensitive and MTX resistant partners of each cell line were more highly correlated in gene expression with each other than with any other sample or cell line. This latter behaviour is in accordance with other reports showing that two breast tumour samples of the same patient before and after treatment with doxorubicin pair together in a hierarchical clustering [8]. Moreover, the same authors showed that a metastasis and a primary tumour were as similar in their overall pattern of gene expression as were repeated samplings of the same primary tumour, and thus proposed that the molecular program of a primary tumour may generally be retained in its metastases. Similar results were obtained with leukaemic cells from patients [9].

Overall, the only differentially expressed gene in common among the cell lines studied was DHFR. Its overexpression, both at the mRNA and at the protein level, was confirmed in the MTX-resistant cells studied. The mRNA upregulation can be explained either by gene amplification of the *dhfr* locus, a well recognized mechanism for MTX resistance [10-12] or by an increase of the *dhfr* transcription rate. In accordance with this, HT29, CaCo-2, MCF-7 and MIA PACA-2 resistant cells display an increased *dhfr* copy-number. Indeed, amplification of the 5q14 locus, including *dhfr* and flanking genes, has been described in HT29 MTX-resistant cells [7]. On the other hand, the other cell lines studied bear no changes in DHFR copy-number. Thus, drug resistance in MDA-MB-468, K562 and Saos-2 cells may obey to any of the other

known mechanisms for MTX resistance [13-17]. Additionally, one has to take into account that MTX causes the differential expression of many genes that may be direct or indirect regulators of cell proliferation, survival or apoptosis, and that this expression pattern can contribute to modulate the resistance phenotype. As described in this work, the overexpression of DKK1, UGT1As or EEF1A1 could represent a mechanism, parallel to DHFR overexpression, that plays a role in MTX resistance, and the possible contribution of the overexpression of each one of those genes is addressed below.

Interestingly, the gene expression pattern for both colon cancer cell lines was very similar, fact that was also applicable to the expression patterns found in the breast cancer cell lines studied. Sets of coordinately expressed genes are gene expression signatures where to find targets suitable for gene therapy. Thus, we searched for genes sharing the same expression patterns in the two colon cancer cell lines. Thirty-two genes were commonly overexpressed and twenty-six genes were underexpressed in both cell lines. The list of overexpressed genes included, among others, DHFR, the target for MTX action, two members of the AKR family, that we had previously studied as modulators of MTX resistance [18] and DKK1. BAN construction using genes differentially expressed in colon cancer, both over and underexpressed, identified DKK1 as a clear node of the network, and thus could be a druggable gene. DKK1 (Dkkopf homolog 1) is a secreted protein that is involved in embryonic development [19] and is classically considered to function as an inhibitor of the canonical Wnt signaling pathway [20] (see [21] for a review). However, DKK1 does not take an active part in Wnt / β -catenin pathway in colon cancer cells as mutation of APC (adenomatous polyposis coli, one of the components of Wnt pathway) occurs in most human colon cancers [22, 23], thus disconnecting the effector part of the

signaling cascade from the Wnt receptors, where DKK1 plays its inhibitory effect [24, 25]. This situation led us to the idea that DKK1 could have other cellular functions aside from its role in Wnt pathway. Indeed, a role for DKK1 overexpression in cancer [19], including hepatoblastomas [26] and breast cancer bone metastasis [27], aggressive tumors, epithelial-mesenchymal transition [28] and proliferation [29] has been previously stated, although its precise mechanism of action has not been elucidated yet. In the case of HT29 MTX-resistant cells, the role of DKK1 is not clear either, although it seems to be related to the resistant phenotype, since treatment with the siRNA against DKK1 mRNA showed a chemosensitization toward MTX. In keeping with this, Katula and collaborators showed that folate deficiency led to the downregulation of DKK1, and that MTX inhibited DKK1 transcription [30]. Thus, DKK1 overexpression in HT29 MTX-resistant cells could constitute a mechanism to overcome the transcriptional repression exerted by MTX. It is worth noting that we had previously proposed the activation of Wnt / β -catenin pathway to be an important step in MTX resistance in HT29 colon cancer cells [7], where E-Cadherin is lost and underexpressed, thus allowing β -catenin to play its function in gene transcription. Interestingly, DKK1 is transcriptionally regulated by Wnt / β -catenin signaling. Thus, constitutive activation of this signaling pathway through β -catenin, downstream of APC, could represent a mechanism for DKK1 overexpression in HT29 MTX-resistant cells.

UGT1As were the only common genes differentially expressed in both breast cancer cell lines. UDP-glucuronosyltransferases are a family of membrane glycoproteins that come from one single gene located on chromosome 2q37, rendering nine functional UGT1A proteins by alternative splicing of 13 different first exons with the common exons 2–5 [31]. UGTs are involved in phase II metabolism of a wide range of

metabolites, both endogenous and exogenous [32]. Glucuronidation is an important metabolic process, as it carries out the biotransformation of lipophilic substrates into hydrophilic glucuronides, which can be more easily removed from the body. Among the different products that can undergo glucuronidation we can find analgesics, sex hormones, flavonoids, rifampicin, bilirubin and tobacco-specific carcinogens [33, 34]. Some anticancer drugs, such as topotecan, irinotecan, SN-38 (the active metabolite of irinotecan), doxorubicin and 4-hydroxytamoxifen, have also been described to be substrates of UGT1A activity [35-40]. Metabolism by UGT1A members has been described to induce resistance toward daunorubicin (both in cell lines and in rat hyperplastic liver nodules) [41, 42], mycophenolic acid [43, 44], mitoxantrone [45], SN-38 [46, 47], camptothecin [48] and toward other drugs [49, 50]. Indeed, drug inactivation by metabolism within tumour cells is recognized as an important mechanism of drug resistance, and specifically, glucuronidation by UGT enzymes has been proposed to contribute to multidrug resistance of several chemotherapeutic drugs [49]. It is tempting to hypothesize that MDA-MB-468 MTX-resistant cells could use MTX as substrate, but from our results we can only point out a role for UGT1As in MTX resistance in this breast cancer cell line.

EEF1A1 was a gene overexpressed in common among MIA PaCa-2, K562 and Saos-2 resistant cell lines. EEF1A1 is a ubiquitously expressed protein elongation factor that recruits amino-acetylated tRNAs to the A site of the ribosome (see [51] for a review). Although it has traditionally been described as cellular housekeeper enzyme, overexpression of EEF1A1 is found in melanomas and tumours of the pancreas, breast, lung, prostate and colon [51, 52]. It has been demonstrated that EEF1A expression is related to increased cell proliferation [53, 54], oncogenic transformation [55], delayed cell senescence [56] and metastasis [57]. Moreover, increased EEF1A1

expression has been related to cisplatin [58], doxorubicin [59] or MTX resistance [60], maybe as a cause of its ability to inhibit apoptosis [61]. It has been proposed that EEF1A overexpression promotes cell growth and replication by contributing to an overall increase in protein translation. Antisense-mediated abrogation of EEF1A1 expression inhibits tumorigenesis and anchorage-independent cell replication in prostate tumour cells [62]. Our functional analyses using siRNA technology against EEF1A1 are in keeping with the latter results, and show a chemosensitization of MIA PaCa-2 cells, thus stating a role for EEF1A1 in MTX resistance in this cell line.

In summary, our results show that node-genes can be identified by constructing BANs with lists of genes differentially expressed in common between cell lines resistant to MTX. RNAi technology allowed us to demonstrate a role for DKK1, UGT1As and EEF1A1 in MTX resistance.

Conclusions

Different biological association networks (BANs) have been constructed using genes in common between differentially expressed RNAs identified in cells resistant to MTX from seven human cancer cell lines from five tissue origins. We have been able to detect important nodes in the BANs, namely DKK1 in colon cancer cells, UGT1As in breast cancer cells and EEF1A1 in pancreatic cancer, leukemia and osteosarcoma. Functional validations of these genes by using siRNAs against their respective mRNAs showed an increased sensitivity toward MTX.

Methods

Cell Lines

Cell lines representative of 5 types of human cancer were used: HT29 and Caco-2 of colon cancer, MCF-7 and MDA-MB-468 of breast cancer, MIA PaCa-2 of pancreatic cancer, K562 of chronic myelocytic leukemia, and Saos-2 of osteosarcoma. Resistant cells were obtained in the laboratory upon incubation with stepwise concentrations of MTX (Lederle) as previously described [18]. HT29, Caco-2 and K562 resistant cells were able to grow in 10^{-5} M MTX; MIA PaCa-2, Saos-2, MCF-7 and MDA-MB-246 were resistant to 10^{-6} M MTX.

Cell Culture

Human cell lines were routinely grown in Ham's F12 medium supplemented with 7% foetal bovine serum (FBS, both from Gibco) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Resistant cells were routinely grown in selective DHFR medium (-GHT medium, GIBCO) lacking glycine, hypoxanthine and thymidine, the final products of DHFR activity. This medium was supplemented with 7% dialyzed foetal bovine serum (GIBCO).

Microarrays

Gene expression was analyzed by hybridization to the GeneChip® Human Genome U133 PLUS 2.0 from Affymetrix, containing over 47,000 transcripts and variants. Total RNA for oligo arrays was prepared from triplicate samples of every sensitive and resistant cell line using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the recommendations of the manufacturer. Labeling, hybridization and detection were carried out following the manufacturer's specifications.

Microarray data analyses

Independent analyses were performed for each pair of sensitive and resistant cells.

Quantification was carried out with GeneSpring GX software v 7.3.1 (Agilent Technologies), which allows multi-filter comparisons using data from different experiments to perform the normalization, generation of restriction lists and functional classifications of the differentially expressed genes. Normalization was applied in two steps: i) “per Chip normalization” by which each measurement was divided by the 50th percentile of all measurements in its array; and ii) “per Gene normalization” by which all the samples were normalized against the median of the control samples (sensitive cells). The expression of each gene was reported as the ratio of the value obtained for each condition relative to the control condition after normalization of the data. Then, data were filtered using the control strength, a control value calculated using the Cross-Gene Error Model on replicates [63] and based on average base / proportional value. Measurements with higher control strength are relatively more precise than measurements with lower control strength. Genes that did not reach this value were discarded. Additional filtering was performed to determine differentially expressed genes. A restriction t-test p-value of less than 0.05 including multiple testing correction (Benjamini and Hochberg false discovery rate) was applied. The output of this analysis was then filtered by fold expression, to specifically select those genes that had a differential expression of at least 2-fold. The same protocol was followed for data analyses of each pair of sensitive and resistant cell lines, and a list of 2-fold differentially expressed genes was generated for each of the comparisons.

Common genes between cell lines

The lists of genes differentially expressed by 2-fold with a p-value < 0.05 including multiple testing correction for each cell line were split in overexpressed and underexpressed genes. Comparisons of lists of overexpressed genes were performed among them by using Venn Diagrams in GeneSpring. Lists of underexpressed genes were also compared among them using the same approach. All lists were compared in pairs and lists of genes in common between each pair were generated. This procedure allowed us to find differentially expressed genes that followed the same pattern (e.g. overexpressed in the cell lines compared) in colon cancer, in breast cancer or in the other three cell lines studied (pancreas cancer, leukemia and osteosarcoma).

BANs generation

The lists of common genes between both colon cancer cell lines, between both breast cancer cell lines, and among the other three cell lines studied were used to construct Biological Association Networks (BANs) with the aid of Pathway Architect software (Stratagene-Agilent). This software package uses a natural processing algorithm to extract knowledge from known molecular interactions. Expanded networks were constructed for each list by setting an advanced filter that included the categories of binding, expression, metabolism, promoter binding, protein modification and regulation. Only proteins were represented. Overlapping of the expression levels was also performed. An additional BAN was constructed with all genes of the three lists of common genes, by setting the same parameters as listed above.

Transfection of siRNAs against selected genes.

HT29 cells (30,000) were plated in 1ml of -GHT medium and transfection was performed eighteen hours later. For each well, Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) in 100 µl of serum free -GHT medium was mixed in Eppendorf tubes with 100nM of siRNA in 100 µl of serum free -GHT medium. The mixture was incubated at room

temperature for 20 min before addition to the cells. MTX (2×10^{-8} M) was added 48 hours after siRNA treatment and MTT assays [64] were performed after 3 days from MTX addition. Treatment of MDA-MB-468 and MIA PaCa-2 cells was performed following the same protocol but using Metafectene™ (Biontex). A non-related siRNA was used as negative control. It was transfected in parallel with the other siRNAs, and used to normalize the results.

The siRNAs were designed using the software iRNAi. Among the possible alternatives, sequences rich in A/T on the 3' of the target were chosen. Then, BLAST resources in NCBI were used to assess the degree of specificity of the sequence recognition for these siRNAs. We only selected the siRNAs that reported the target gene as the only mRNA hit, or some family members, in the case of siUGT1A. The sequences for the sense strand of all siRNAs used are available in Table 3.

Heat map generation

A global comparison of all cell lines was also performed using GeneSpring GX v 7.3.1. The triplicate samples for each condition in each of the seven cell lines were imported into one single experiment. Normalization was performed in two steps: “per Chip normalization” (as described above) and “per Gene normalization” by which the samples were normalized against the median of all samples. A list was generated including those genes with a t-test p-value of less than 0.05 including multiple testing correction (Benjamini and Hochberg false discovery rate). These values must appear in at least 2 out of the 7 cell lines. A hierarchical clustering method in GeneSpring was used to group genes on the basis of similarity in the pattern with which their expression varied over all samples. The distance matrix used was Pearson correlation, and average linkage was used as clustering algorithm. The same clustering method

was used to group the cell lines on the basis of similarity in their patterns of gene expression.

RT-Real-Time PCR

Gene mRNA levels were determined by RT-Real-time PCR. Total RNA was extracted from cells using Ultraspec™ RNA reagent (Biotecx) following the recommendations of the manufacturer. Complementary DNA was synthesized in a total volume of 20 µl from RNA samples by mixing 500ng of total RNA, 125 ng of random hexamers (Roche), in the presence of 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 20 units of RNasin (Promega), 0.5 mM dNTPs (AppliChem), 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.3. The reaction mixture was incubated at 37°C for 60 min and the cDNA product was used for subsequent Real-time PCR amplification using an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with 25ng of the cDNA mixture and the assays-on-demand from Applied Biosystems: Hs00758822-s1 for DHFR and Hs00356991-m1 for APRT.

Gene copy number determination

Genomic DNA from either sensitive or resistant cells was obtained with the Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. One hundred nanograms of DNA and the assays-on-demand Hs00758822-s1 for DHFR and Hs99999901-s1 for 18S were used for Real-Time PCR amplification.

Preparation of total extracts for Western-blotting

Total extracts from cells, either sensitive or MTX-resistant, were used to assay DHFR protein levels. Cells were washed twice with ice-cold PBS and scrapped in 200ml lysis buffer (50mM Hepes, 500mM NaCl, 1.5M MgCl₂, 1mM EGTA, 10% Glycerol

(v/v), 1% Triton X-100 and Protease inhibitor cocktail). Cells were incubated in ice for 1 hour with intermittent vortexing and then, centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 10 min. Five µl of the extract were used to determine protein concentration by the Bradford assay (Bio-Rad). The extracts were frozen in liquid N₂ and stored at -80°C. Fifty micrograms of both sensitive and resistant cells total extracts were resolved on SDS 15%-polyacrilamide gels. Transference to PVDF membranes (Immobilon P, Millipore) using a semidry electroblotter was followed with incubation with an antibody against DHFR, and detection was accomplished by secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody and enhanced chemiluminescence, as recommended by the manufacturer (Amersham). To normalize the results, blots were reprobated with an antibody against Actin (Sigma).

Authors' contributions

ES participated in microarray data analyses, in BANs generation, in the siRNA treatments and drafted the manuscript. CO carried out the determination of DHFR mRNA levels, copy number and protein levels. CA helped with siRNA treatments and drafted the manuscript. VN helped with data interpretation and to draft the manuscript, critically revising it. CJC conceived the study, participated in microarray data analyses and in BANs generation, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants SAF05-247 and SAF08-00043 from “Plan Nacional de I+D+I”, and ISCIII-RETIC RD06/0020. Our research group holds the “quality distinction” from the “Generalitat de Catalunya” SGR05-0883. E.S. was a recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT), C.A. is a recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya, and C.O. is a recipient of a fellowship from Federación Española del café.

References

1. C Huttenhower, AI Flamholz, JN Landis, S Sahi, CL Myers, KL Olszewski, MA Hibbs, NO Siemers, OG Troyanskaya, HA Collier: **Nearest Neighbor Networks: clustering expression data based on gene neighborhoods**. *BMC Bioinformatics* 2007, **8**:250.
2. JX Yu, AM Sieuwerts, Y Zhang, JW Martens, M Smid, JG Klijn, Y Wang, JA Foekens: **Pathway analysis of gene signatures predicting metastasis of node-negative primary breast cancer**. *BMC Cancer* 2007, **7**:182.
3. **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**. www.genome.jp/kegg/.
4. S Dohr, A Klingenhoff, H Maier, M Hrabe de Angelis, T Werner, R Schneider: **Linking disease-associated genes to regulatory networks via promoter organization**. *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:864-72.
5. P Brazhnik, A de la Fuente, P Mendes: **Gene networks: how to put the function in genomics**. *Trends Biotechnol* 2002, **20**:467-72.
6. J Natarajan, D Berrar, W Dubitzky, C Hack, Y Zhang, C DeSesa, JR Van Brocklyn, EG Bremer: **Text mining of full-text journal articles combined with gene expression analysis reveals a relationship between sphingosine-1-phosphate and invasiveness of a glioblastoma cell line**. *BMC Bioinformatics* 2006, **7**:373.
7. E Selga, C Morales, V Noe, MA Peinado, CJ Ciudad: **Role of Caveolin 1, E-Cadherin, Enolase 2 and PKCalpha on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells**. *BMC Med Genomics* 2008, **1**:35.
8. CM Perou, T Sorlie, MB Eisen, M van de Rijn, SS Jeffrey, CA Rees, JR Pollack, DT Ross, H Johnsen, LA Akslen, et al: **Molecular portraits of human breast tumours**. *Nature* 2000, **406**:747-52.
9. AA Alizadeh, MB Eisen, RE Davis, C Ma, IS Lossos, A Rosenwald, JC Boldrick, H Sabet, T Tran, X Yu, et al: **Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling**. *Nature* 2000, **403**:503-11.
10. MD Carman, JH Schornagel, RS Rivest, S Srimatkandada, CS Portlock, T Duffy, JR Bertino: **Resistance to methotrexate due to gene amplification in a patient with acute leukemia**. *J Clin Oncol* 1984, **2**:16-20.
11. GA Curt, KH Cowan, BA Chabner: **Gene amplification in drug resistance: of mice and men**. *J Clin Oncol* 1984, **2**:62-4.
12. FW Alt, RE Kellems, RT Schimke: **Synthesis and degradation of folate reductase in sensitive and methotrexate-resistant lines of S-180 cells**. *J Biol Chem* 1976, **251**:3063-74.
13. M Yu, PW Melera: **Allelic variation in the dihydrofolate reductase gene at amino acid position 95 contributes to antifolate resistance in Chinese hamster cells**. *Cancer Res* 1993, **53**:6031-5.
14. S Srimatkandada, BI Schweitzer, BA Moroson, S Dube, JR Bertino: **Amplification of a polymorphic dihydrofolate reductase gene expressing an enzyme with decreased binding to methotrexate in a human colon carcinoma cell line, HCT-8R4, resistant to this drug**. *J Biol Chem* 1989, **264**:3524-8.
15. G Jansen, R Mauritz, S Drori, H Sprecher, I Kathmann, M Bunni, DG Priest, P Noordhuis, JH Schornagel, HM Pinedo, et al: **A structurally altered human reduced folate carrier with increased folic acid transport mediates a novel mechanism of antifolate resistance**. *J Biol Chem* 1998, **273**:30189-98.

16. K Roy, B Tolner, JH Chiao, FM Sirotnak: **A single amino acid difference within the folate transporter encoded by the murine RFC-1 gene selectively alters its interaction with folate analogues. Implications for intrinsic antifolate resistance and directional orientation of the transporter within the plasma membrane of tumor cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**:2526-31.
17. R Zhao, IG Sharina, ID Goldman: **Pattern of mutations that results in loss of reduced folate carrier function under antifolate selective pressure augmented by chemical mutagenesis.** *Mol Pharmacol* 1999, **56**:68-76.
18. E Selga, V Noe, CJ Ciudad: **Transcriptional regulation of aldo-keto reductase 1C1 in HT29 human colon cancer cells resistant to methotrexate: role in the cell cycle and apoptosis.** *Biochem Pharmacol* 2008, **75**:414-26.
19. MA Forget, S Turcotte, D Beauseigle, J Godin-Ethier, S Pelletier, J Martin, S Tanguay, R Lapointe: **The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types.** *Br J Cancer* 2007, **96**:646-53.
20. U Rothbacher, P Lemaire: **Creme de la Kremen of Wnt signalling inhibition.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:E172-3.
21. WJ Nelson, R Nusse: **Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways.** *Science* 2004, **303**:1483-7.
22. P Polakis: **Wnt signaling and cancer.** *Genes Dev* 2000, **14**:1837-51.
23. JM Gonzalez-Sancho, O Aguilera, JM Garcia, N Pendas-Franco, C Pena, S Cal, A Garcia de Herreros, F Bonilla, A Munoz: **The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer.** *Oncogene* 2005, **24**:1098-103.
24. MV Semenov, K Tamai, BK Brodt, M Kuhl, S Sokol, X He: **Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6.** *Curr Biol* 2001, **11**:951-61.
25. B Mao, W Wu, G Davidson, J Marhold, M Li, BM Mechler, H Delius, D Hoppe, P Stannek, C Walter, et al: **Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling.** *Nature* 2002, **417**:664-7.
26. A Koch, A Waha, W Hartmann, A Hrychyk, U Schuller, KA Wharton, Jr., SY Fuchs, D von Schweinitz, T Pietsch: **Elevated expression of Wnt antagonists is a common event in hepatoblastomas.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:4295-304.
27. N Voorzanger-Rousselot, D Goehrig, F Journe, V Doriath, JJ Body, P Clezardin, P Garnero: **Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases.** *Br J Cancer* 2007, **97**:964-70.
28. AP Monaghan, P Kioschis, W Wu, A Zuniga, D Bock, A Poustka, H Delius, C Niehrs: **Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages.** *Mech Dev* 1999, **87**:45-56.
29. CA Gregory, H Singh, AS Perry, DJ Prockop: **The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow.** *J Biol Chem* 2003, **278**:28067-78.
30. KS Katula, AN Heinloth, RS Paules: **Folate deficiency in normal human fibroblasts leads to altered expression of genes primarily linked to cell signaling, the cytoskeleton and extracellular matrix.** *J Nutr Biochem* 2007, **18**:541-52.

31. PI Mackenzie, IS Owens, B Burchell, KW Bock, A Bairoch, A Belanger, S Fournel-Gigleux, M Green, DW Hum, T Iyanagi, et al: **The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence.** *Pharmacogenetics* 1997, **7**:255-69.
32. C Guillemette: **Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes.** *Pharmacogenomics J* 2003, **3**:136-58.
33. CP Strassburg, MP Manns, RH Tukey: **Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8.** *J Biol Chem* 1998, **273**:8719-26.
34. TK Kiang, MH Ensom, TK Chang: **UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions.** *Pharmacol Ther* 2005, **106**:97-132.
35. S Nagar, RP Remmel: **Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer.** *Oncogene* 2006, **25**:1659-72.
36. R McCague, IB Parr, G Leclercq, OT Leung, M Jarman: **Metabolism of tamoxifen by isolated rat hepatocytes. Identification of the glucuronide of 4-hydroxytamoxifen.** *Biochem Pharmacol* 1990, **39**:1459-65.
37. P Platzer, S Schaden, T Thalhammer, G Hamilton, B Rosenberg, I Silgoner, W Jager: **Biotransformation of topotecan in the isolated perfused rat liver: identification of three novel metabolites.** *Anticancer Res* 1998, **18**:2695-700.
38. H Rosing, DM van Zomeren, E Doyle, A Bult, JH Beijnen: **O-glucuronidation, a newly identified metabolic pathway for topotecan and N-desmethyl topotecan.** *Anticancer Drugs* 1998, **9**:587-92.
39. A Andersen, H Holte, L Slordal: **Pharmacokinetics and metabolism of doxorubicin after short-term infusions in lymphoma patients.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1999, **44**:422-6.
40. L Iyer, CD King, PF Whittington, MD Green, SK Roy, TR Tephly, BL Coffman, MJ Ratain: **Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes.** *J Clin Invest* 1998, **101**:847-54.
41. KH Cowan, G Batist, A Tulpule, BK Sinha, CE Myers: **Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**:9328-32.
42. T Gessner, LA Vaughan, BC Beehler, CJ Bartels, RM Baker: **Elevated pentose cycle and glucuronyltransferase in daunorubicin-resistant P388 cells.** *Cancer Res* 1990, **50**:3921-7.
43. TJ Franklin, V Jacobs, G Jones, P Ple, P Bruneau: **Glucuronidation associated with intrinsic resistance to mycophenolic acid in human colorectal carcinoma cells.** *Cancer Res* 1996, **56**:984-7.
44. TJ Franklin, VN Jacobs, G Jones, P Ple: **Human colorectal carcinoma cells in vitro as a means to assess the metabolism of analogs of mycophenolic acid.** *Drug Metab Dispos* 1997, **25**:367-70.
45. GK Rekha, NE Sladek: **Multienzyme-mediated stable and transient multidrug resistance and collateral sensitivity induced by xenobiotics.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1997, **40**:215-24.

46. T Takahashi, Y Fujiwara, M Yamakido, O Katoh, H Watanabe, PI Mackenzie: **The role of glucuronidation in 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin resistance in vitro.** *Jpn J Cancer Res* 1997, **88**:1211-7.
47. J Cummings, BT Ethell, L Jardine, G Boyd, JS Macpherson, B Burchell, JF Smyth, DI Jodrell: **Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer: reversal of resistance by food additives.** *Cancer Res* 2003, **63**:8443-50.
48. M Brangi, T Litman, M Ciotti, K Nishiyama, G Kohlhagen, C Takimoto, R Robey, Y Pommier, T Fojo, SE Bates: **Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells.** *Cancer Res* 1999, **59**:5938-46.
49. I Meijerman, JH Beijnen, JH Schellens: **Combined action and regulation of phase II enzymes and multidrug resistance proteins in multidrug resistance in cancer.** *Cancer Treat Rev* 2008, **34**:505-20.
50. H Zembutsu, Y Ohnishi, T Tsunoda, Y Furukawa, T Katagiri, Y Ueyama, N Tamaoki, T Nomura, O Kitahara, R Yanagawa, et al: **Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs.** *Cancer Res* 2002, **62**:518-27.
51. S Thornton, N Anand, D Purcell, J Lee: **Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis.** *J Mol Med* 2003, **81**:536-48.
52. U Alon, N Barkai, DA Notterman, K Gish, S Ybarra, D Mack, AJ Levine: **Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:6745-50.
53. JA Hassell, DL Engelhardt: **The regulation of protein synthesis in animal cells by serum factors.** *Biochemistry* 1976, **15**:1375-81.
54. G Grassi, B Scaggiante, R Farra, B Dapas, F Agostini, D Baiz, N Rosso, C Tiribelli: **The expression levels of the translational factors eEF1A 1/2 correlate with cell growth but not apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines with different differentiation grade.** *Biochimie* 2007, **89**:1544-52.
55. M Tatsuka, H Mitsui, M Wada, A Nagata, H Nojima, H Okayama: **Elongation factor-1 alpha gene determines susceptibility to transformation.** *Nature* 1992, **359**:333-6.
56. JC Shepherd, U Walldorf, P Hug, WJ Gehring: **Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 alpha live longer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:7520-1.
57. BT Edmonds, J Wyckoff, YG Yeung, Y Wang, ER Stanley, J Jones, J Segall, J Condeelis: **Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma.** *J Cell Sci* 1996, **109** (Pt 11):2705-14.
58. A Johnsson, I Zeelenberg, Y Min, J Hilinski, C Berry, SB Howell, G Los: **Identification of genes differentially expressed in association with acquired cisplatin resistance.** *Br J Cancer* 2000, **83**:1047-54.
59. J Bertram, K Palfner, W Hiddemann, M Kneba: **Overexpression of ribosomal proteins L4 and L5 and the putative alternative elongation factor PTI-1 in the doxorubicin resistant human colon cancer cell line LoVoDxR.** *Eur J Cancer* 1998, **34**:731-6.

60. G Beyer-Sehlmeyer, W Hiddemann, B Wormann, J Bertram: **Suppressive subtractive hybridisation reveals differential expression of serglycin, sorcin, bone marrow proteoglycan and prostate-tumour-inducing gene I (PTI-1) in drug-resistant and sensitive tumour cell lines of haematopoietic origin.** *Eur J Cancer* 1999, **35**:1735-42.
61. S Talapatra, JD Wagner, CB Thompson: **Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis.** *Cell Death Differ* 2002, **9**:856-61.
62. Z Su, NI Goldstein, PB Fisher: **Antisense inhibition of the PTI-1 oncogene reverses cancer phenotypes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:1764-9.
63. DM Rocke, B Durbin: **A model for measurement error for gene expression arrays.** *J Comput Biol* 2001, **8**:557-69.
64. T Mosmann: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods* 1983, **65**:55-63.

Figures

Figure 1 - Heat Map of differentially expressed genes.

Hierarchical clustering algorithm organizes the experimental samples only on the basis of overall similarity in their gene expression patterns. To build the heat maps, lists of differentially expressed genes with a t-test p-value of less than 0.05 including multiple testing correction were generated for each cell line. A hierarchical clustering method in GeneSpring GX v 7.3.1 was used to construct both the gene tree and the sample tree, as described in methods. Data is shown in a matrix format: each row represents a single gene, and each column represents a cell line. Red is used to colour the overexpressed genes (expression levels over the median) and green is used to highlight the underexpressed genes (expression levels under the median; see legend). The pattern and length of the branches in the dendrograms reflect the relatedness of the samples or the genes.

Figure 2 - BANs of differentially expressed genes in common between cell lines.

The lists of common genes between both colon cancer cell lines, between both breast cancer cell lines, and among the other three cell lines studied (representative of pancreatic cancer, leukemia and osteosarcoma) were used to construct BANs with the Pathway Architect software. Expanded networks were constructed for each list (A, colon cancer; B, breast cancer; and C, other three cell lines) by setting an advanced filter that included the categories of binding, expression, metabolism, promoter binding, protein modification and regulation (see legend). Only proteins were represented. Overlapping of the expression levels was also performed (red for overexpressed genes and green for underexpressed genes; translucent genes were not in the list and were added by the program from the interactions database). The BANs

presented show some node genes that were object of further studies (pointed with arrows). DHFR is encircled in blue and surrounded with yellow dots.

Figure 3 - BAN of all common genes.

A BAN was constructed as previously described with all the genes included in any of the three lists of common genes (encircled in blue). Genes added by the program from the interaction database are not encircled. Node genes are pointed with arrows.

Figure 4 - Effects of treatments with siRNAs against DKK1, UGT1As or EEF1A1 on MTX sensitivity.

Treatment with siDKK1 was performed in HT29 cells (Figure 4A), siUGT1A was transfected in MDA-MB-468 cells (Figure 4B) and the effects of siEEF1A1 were screened in MIA PaCa-2 cells (Figure 4C). Treatments were performed as described in Methods, and MTX was added after 48 h. Cell viability was determined after 3 days from MTX treatment. All results are expressed as percentages referred to the negative control siRNA. Values are the mean of three independent experiments \pm SE.

Tables

Table 1 - Common genes between cell lines.

A

GenBank	Gene Name	Description	Ratio HT29	Ratio Caco-2
AI144299	DHFR	Dihydrofolate reductase	7.253	46.35
BC005238	FXYD3	FXYD domain containing ion transport regulator 3	7.238	2.2
BC003584	DHFR	Dihydrofolate reductase	6.957	50.23
BC000192	DHFR	Dihydrofolate reductase	6.886	38.31
NM_002380	MATN2	Matrilin 2	6.618	4.704
BU078629	ZFYVE16	Zinc finger, FYVE domain containing 16	6.064	22.73
NM_001975	ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)	5.979	2.039
NM_017954	CADPS2	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion 2	5.601	2.271
AI991103	AXIIR	Similar to annexin II receptor	5.145	2.03
NM_000791	DHFR	Dihydrofolate reductase	4.71	21.17
U05598	AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1, member C2	4.627	10.15
M33376	AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1, member C2	4.412	8.889
NM_012242	DKK1	Dickkopf homolog 1	4.252	2.561
NM_014867	KBTBD11	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	4.217	2.14
AB037848	KIAA1427	Synaptotagmin XIII	4.126	9.561
NM_014733	ZFYVE16	Zinc finger, FYVE domain containing 16	4.107	15.6
NM_001353	AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1, member C1	3.937	8.867
NM_002439	MSH3	MutS homolog 3	3.868	4.004
S68290	AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1, member C1	3.656	9.448
J04810	MSH3	MutS homolog 3	3.267	8.233
NM_000691	ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	2.865	3.81
AI718385	SLC26A2	Solute carrier family 26 member 2	2.758	2.017
NM_003069	SMARCA1	SWI/SNF related, regulator of chromatin a1	2.598	2.494
AB029026	TACC1	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	2.346	3.898
NM_006283	TACC1	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	2.307	3.256
AF188298	DAB2	Disabled homolog 2	2.292	2.111
NM_020299	AKR1B10	Aldo-keto reductase family 1, member B10	2.261	22.95
BC006471	MLLT11	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	2.176	2.604
W93554	SH3PXD2A	SH3 and PX domains 2A	2.144	3.451
NM_014778	NUPL1	Nucleoporin like 1	0.462	0.433
NM_006033	LIPG	Lipase, endothelial	0.402	0.415
NM_012338	TM4SF12	Transmembrane 4 superfamily member 12	0.39	0.383
NM_007150	ZNF185	Zinc finger protein 185 (LIM domain)	0.379	0.422
AB014605	MAGI2	Membrane associated guanylate kinase	0.377	0.304
AB033831	SCDGF	Platelet derived growth factor C	0.35	0.347
NM_021021	SNTB1	Syntrophin, beta 1	0.347	0.233
NM_021822	APOBEC3G	Apolipoprotein B, catalytic polypeptide-like 3G	0.303	0.0845
AB039791	ARP11	Actin-related protein Arp11	0.297	0.458

NM_013352	SART2	Squamous cell carcinoma antigen	0.217	0.312
NM_004362	CLGN	Calmegin	0.214	0.197
AI912583	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	0.213	0.452
Z19574	KRT17	Keratin 17	0.19	0.46
NM_003186	TAGLN1	Transgelin	0.19	0.142
NM_014059	RGC32	Response gene to complement 32	0.167	0.441
BE872674	CLEC3A	C-type lectin domain family 3, member A	0.153	0.238
NM_003212	TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1	0.134	0.466
BC000069	RARRES2	Retinoic acid receptor responder 2	0.0704	0.331
AF110400	FGF19	Fibroblast growth factor 19	0.0661	0.263
NM_006851	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1	0.0511	0.284
NM_006169	NNMT	Nicotinamide N-methyltransferase	0.0382	0.239
AF208043	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16	0.0286	0.384
BG256677	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16	0.0238	0.403
NM_006169	NNMT	Nicotinamide N-methyltransferase	0.0237	0.239

B

GenBank	Gene Name	Description	Ratio MCF7	Ratio MDA-MB-468
NM_019093	UGT1A3	UDP glucuronosyltransferase 1, polypeptide A3	24.36	27.93
NM_000463	UGT1A1	UDP glucuronosyltransferase 1, polypeptide A1	15.31	17.66
NM_021027	UGT1A9	UDP glucuronosyltransferase 1, polypeptide A9	13.55	17.05
NM_001072	UGT1A6	UDP glucuronosyltransferase 1, polypeptide A6	13.21	16.88
AV691323	UGT1A1	UDP glucuronosyltransferase 1, polypeptide A1	13.05	16.82

C

GenBank	Gene Name	Description	Ratio MIA PaCa-2	Ratio K562	Ratio Saos-2
BC003584	DHFR	Dihydrofolate reductase	16.97	17.78	4.063
BC000192	DHFR	Dihydrofolate reductase	12.56	13.57	5.281
AI144299	DHFR	Dihydrofolate reductase	12.1	9.452	8.943
NM_000791	DHFR	Dihydrofolate reductase	9.661	6.761	5.565
BE622627	PIK3R3	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3	5.227	2.087	4.435
AW469790	EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	2.294	2.754	2.045
NM_012446	SSBP2	Single-stranded DNA binding protein 2	2.2	5.035	2.029
AF318326	APG10L	ATG10 autophagy related 10 homolog	2.084	7.392	2.191

The lists of genes differentially expressed by 2-fold with a p-value < 0.05 including multiple testing correction were compared using Venn Diagrams in GeneSpring GX software v 7.3.1. The lists of differentially expressed genes were compared between

HT29 and Caco-2 cells (A), between MCF-7 and MDA-MB-468 cells (B) and among MIA PaCa-2, K562 and Saos-2 cells (C). The tables include the GenBank numbers for all genes, their respective common names and the associated description. The ratio column corresponds to the fold change in expression of each gene relative to the control.

Table 2 - Validation of DHFR overexpression and copy number in the different cell lines.

Cell Line	Expression		Copy-number	Protein
	Microarray	Validation		
HT29	7.1	10.8 ± 0.7	16.1 ± 1.4	++
Caco-2	46.7	49.7 ± 1.1	83.4 ± 8.1	N/D
MCF-7	31.1	33.2 ± 0.7	58.1 ± 0.8	+++++
MDA-MB-468	1.8	3.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1	N/D
MIA PaCa-2	9.5	8.2 ± 1.1	32.2 ± 2.2	+++
K562	9.4	9.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1	++++
Saos-2	4.1	4.1 ± 1.1	0.6 ± 0.1	+

The overexpression of DHFR was confirmed at the levels of mRNA and protein by RT-Real-Time PCR and western blot using specific antibodies, respectively. DHFR expression levels are presented both as the values found in the microarrays and as validated mRNA levels. DHFR copy-number was determined by Real-Time PCR. Values are the mean (in fold change relative to the sensitive cells) of three independent experiments ± SE. N/D non-determined.

Table 3 - Sequences for the sense strand of all siRNAs used.

Gene	siRNA name	siRNA Sequence
DKK1	siDKK1	AGGTGCTGCACTGCCTATT
EEF1A1	siEEF1A1	CGGTCTCAGAACTGTTTGT
UGT1A family	siUGT1A	GTGCTGGGCAAGTTTACTT
-	NR-siRNA	TAAGGCTATGAAGAGATAC

The sequences for the sense strand of all the siRNAs used are provided next to the names used to designate all them and the genes they are directed against.

Additional files

Additional file 1 – Table of genes differentially expressed by 2 fold in HT29 cells.

Excel file containing the list of 2-fold differentially expressed genes in HT29 MTX-resistant cells generated using GeneSpring software v 7.3.1. It includes the GenBank numbers of all genes, their respective common names and the associated description. The fold change values relative to the control (sensitive cells) are provided. The differentially expressed transcripts corresponding to open reading frames, transcribed sequences, cDNA clones or hypothetical genes were deleted.

Additional file 2 – Table of genes differentially expressed by 2 fold in Caco-2 cells.

Excel file containing the list of 2-fold differentially expressed genes in Caco-2 MTX-resistant cells generated as described in Additional file 1.

Additional file 3 – Table of genes differentially expressed by 2 fold in MCF-7 cells.

Excel file containing the list of 2-fold differentially expressed genes in MCF-7 MTX-resistant cells generated as described in Additional file 1.

Additional file 4 – Table of genes differentially expressed by 2 fold in MDA-MB-468 cells.

Excel file containing the list of 2-fold differentially expressed genes in MDA-MB-468 MTX-resistant cells generated as described in Additional file 1.

Additional file 5 – Table of genes differentially expressed by 2 fold in MIA PaCa-2 cells.

Excel file containing the list of 2-fold differentially expressed genes in MIA PaCa-2 MTX-resistant cells generated as described in Additional file 1.

Additional file 6 – Table of genes differentially expressed by 2 fold in K562 cells.

Excel file containing the list of 2-fold differentially expressed genes in K562 MTX-

resistant cells generated as described in Additional file 1.

Additional file 7 – Table of genes differentially expressed by 2 fold in Saos-2 cells.

Excel file containing the list of 2-fold differentially expressed genes in Saos-2 MTX-

resistant cells generated as described in Additional file 1.

Figure 1.

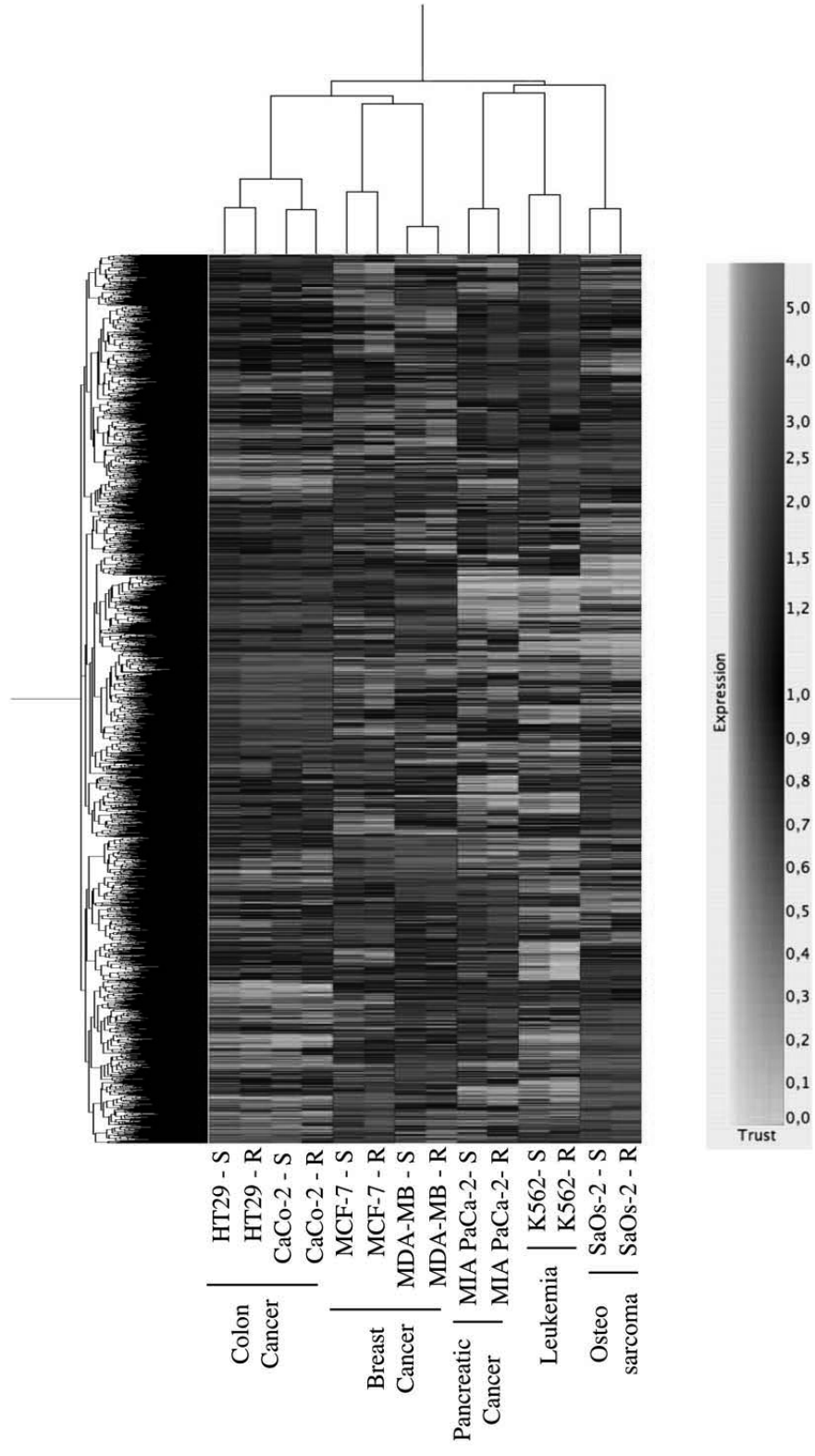


Figure 2.

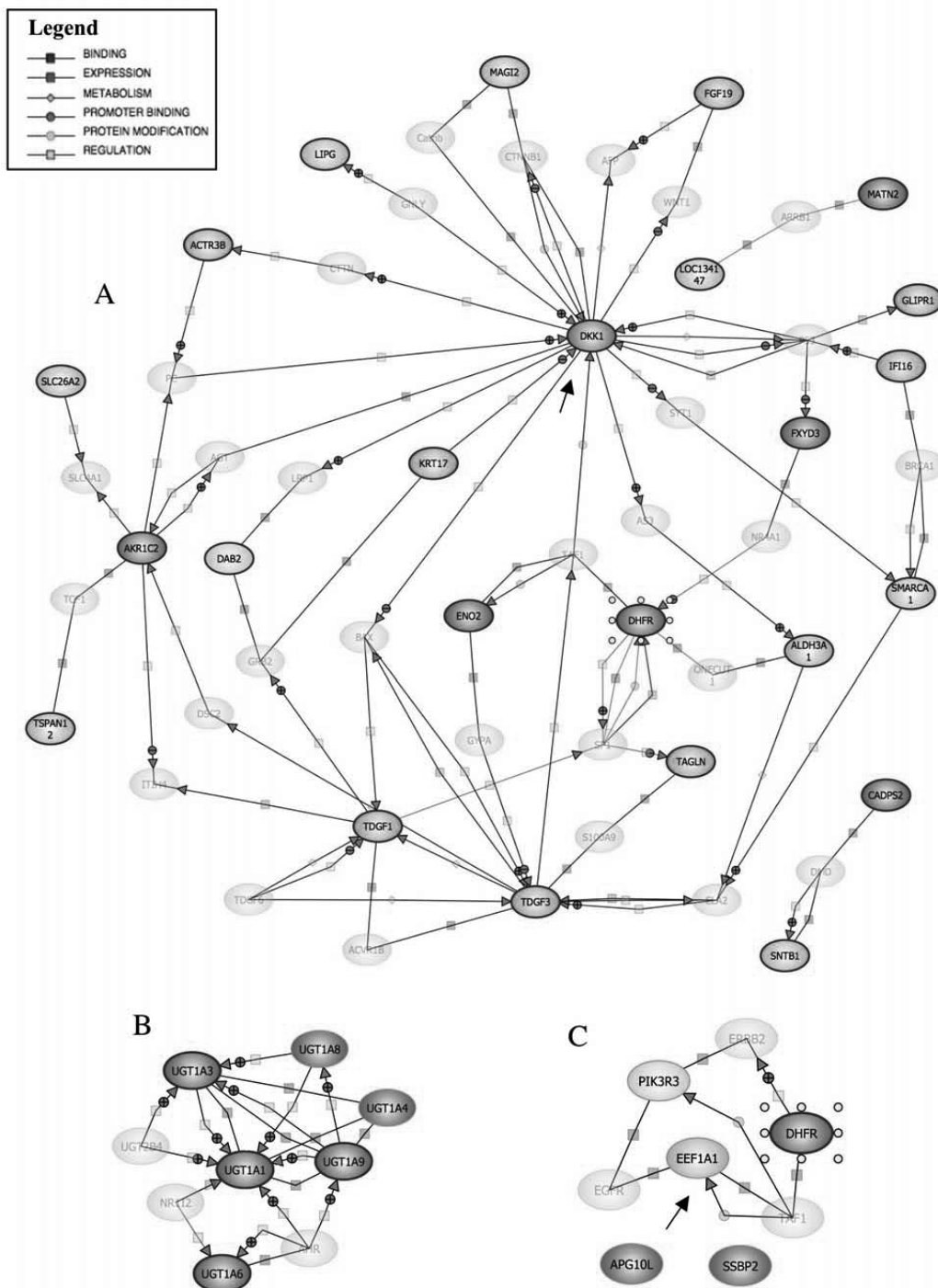


Figure 3.

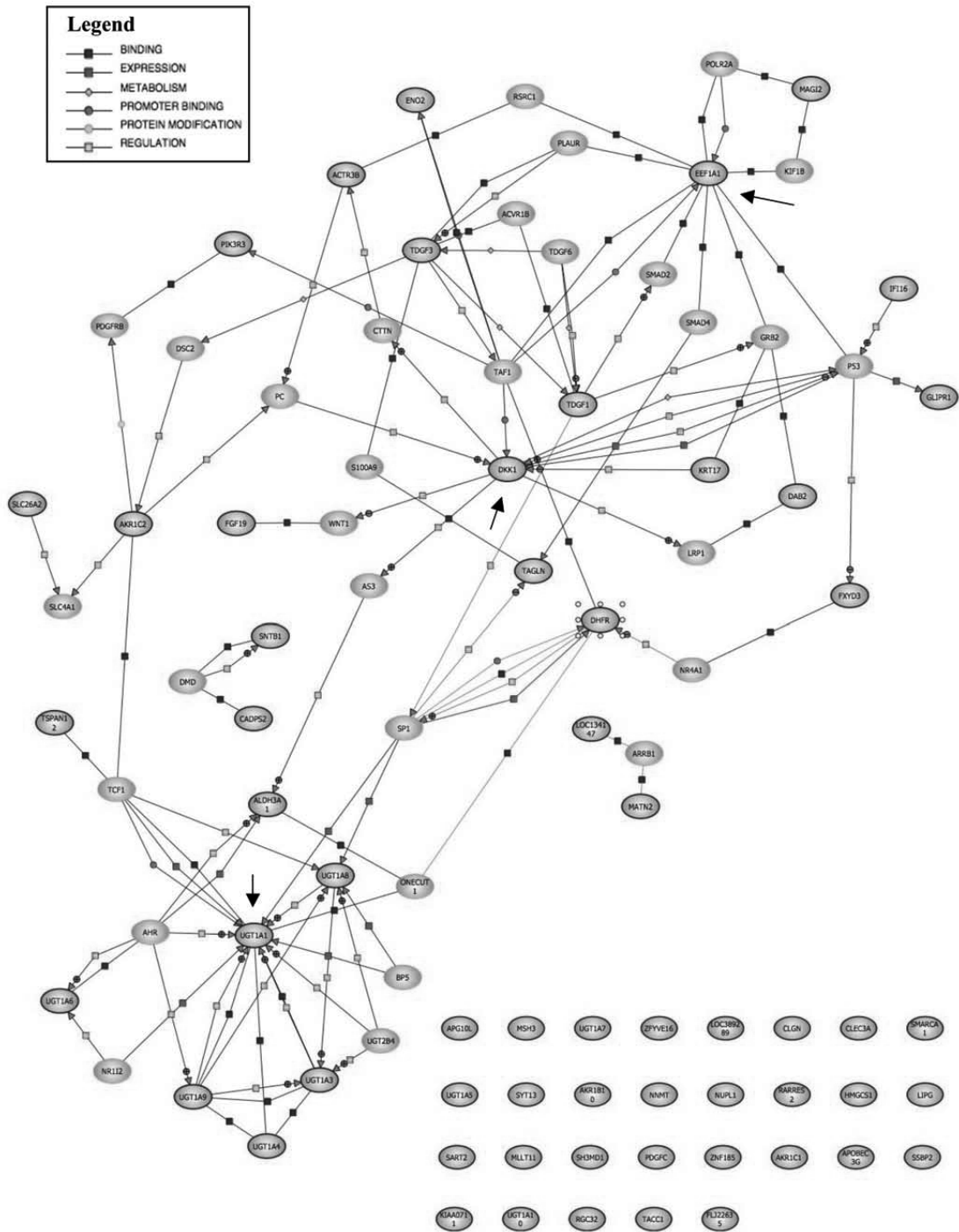
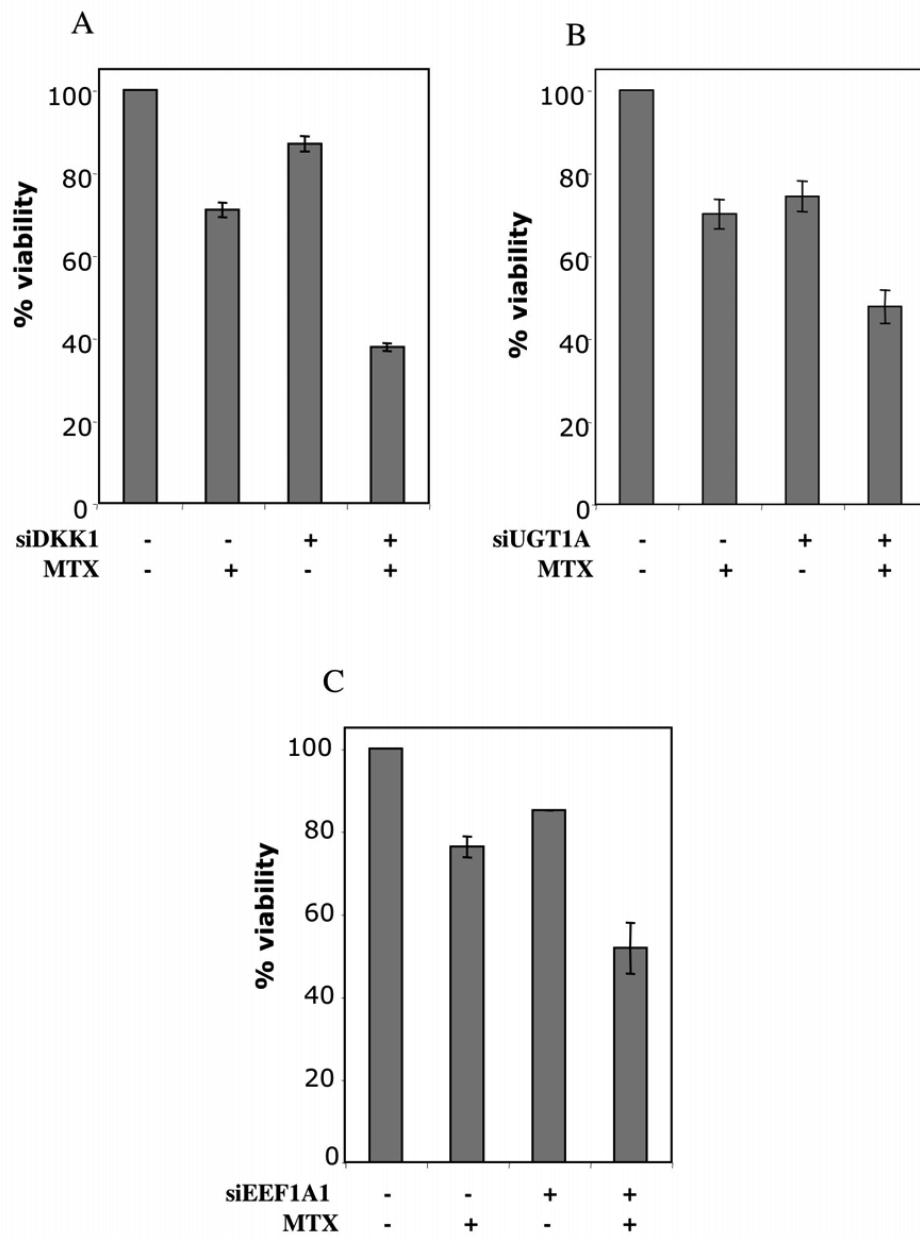


Figure 4.



Discussió

En aquesta memòria es presenta l'estudi farmacogenòmic de la resistència al MTX, dut a terme mitjançant microarrays d'oligonucleòtids que ens han permès la comparació dels nivells d'expressió gènica de cèl·lules sensibles i resistents al MTX.

El primer estudi, tot utilitzant la línia de càncer de colon HT29 com a model, va evidenciar la sobreexpressió d'algunes aldo-ceto reductases (AKRs). Vam estudiar en detall l'AKR1C1, ja que corresponia a un dels gens que presentava uns valors d'expressió diferencial més elevats de la família, i uns valors d'expressió no normalitzats més elevats que l'AKR1C2. A més, la funció atribuïda a l'AKR1C1, metabolisme de xenobiòtics, està més relacionada amb el procés de resistència que no pas la categoria funcional de transport d'àcids biliars en la qual s'inclou l'AKR1C2.

L'increment en els nivells d'mRNA i de proteïna AKR1C1 a les cèl·lules resistents van resultar del mateix nivell, al voltant de set vegades respecte a les cèl·lules sensibles, fet que suggereix que la sobreexpressió del gen es dona com a conseqüència d'un increment a nivell d'mRNA més que no pas per control traduccional. En aquest sentit, s'ha descrit que les modificacions post-transcripcionals de l'AKR1C1 no afecten gaire la seva activitat enzimàtica (Mao, 1997). De totes aquestes observacions es pot concloure que l'activitat de l'AKR1C1 en humans, tal com passa en rata (Zhong, 1998), està principalment lligada als nivells d'expressió del gen (Nakajima, 2003). L'increment en l'mRNA de l'AKR1C1 a les cèl·lules resistents no és degut a un fenomen d'amplificació gènica, a diferència del que té lloc amb el gen *dhfr*. Així, l'augment en el número de còpies del gen *dhfr* (al voltant de 10 vegades més que en les cèl·lules sensibles) explica la sobreexpressió de la DHFR a les cèl·lules resistents.

La manca de canvis a nivell de DNA per l'AKR1C1 podia suggerir una regulació transcripcional. Experiments de gen reporter van evidenciar que existia una major regulació del promotor de l'AKR1C1 a les cèl·lules resistents que a les sensibles al MTX. La taxa de transcripció d'un gen ve determinada per la interacció de diverses proteïnes reguladores (activadors i repressors transcripcionals) en seqüències específiques de DNA compreses al promotor del gen (Wyrick, 2002). Per tal de comprendre com aquestes proteïnes reguladores controlen la transcripció gènica, és necessari identificar els llocs putatius d'unió per aquests factors de transcripció. Així, vam identificar una caixa GC al promotor proximal de l'AKR1C1 que representava un lloc potencial de regulació transcripcional. La transfecció transitòria de construccions del promotor que inclouen o no aquesta caixa ens va permetre comprovar que l'activació transcripcional de l'AKR1C1 en les cèl·lules resistents era dependent, almenys en part,

Discussió

dels factors de transcripció Sp1 i Sp3. Està descrit que Sp1 i Sp3 presenten a la seva estructura regions de dits de zinc semblants, que els permeten la unió al mateix tipus de caixes GT i GC amb la mateixa afinitat (Hagen i suske, 1992). A més, el control mitjançat per múltiples factors de transcripció és una de les característiques importants de la regulació de la transcripció en sistemes eucariotes (Chen, 2004). També vam corroborar el paper d'Sp1 i Sp3 en la regulació transcripcional de l'AKR1C1 a les cèl·lules resistents mitjançant experiments de retardació de la mobilitat electroforètica.

Ja que no existien diferències de nivell de proteïna Sp1 entre les cèl·lules sensibles i les resistents, i considerant que s'ha descrit que la forma fosforilada d'Sp1 mostra una major unió al DNA que la forma no fosforilada (Noé, 2001), vam explorar l'estat de fosforilació d'aquest factor de transcripció en els dos tipus cel·lulars. Efectivament, la major unió d'Sp1 a les cèl·lules resistents podia ser deguda a un increment en l'estat de fosforilació del factor de transcripció, ja que la defosforilació d'extractes nuclears cursava amb un decrement de la seva unió. En aquesta direcció, vam comprovar si a les dades del microarray constava expressió diferencial d'alguna de les quinases o de les fosfatases conegudes que controlen l'estat de fosforilació d'Sp1 (Chu, 2005). Entre les quinases, la PKC α estava sobreexpressada. És interessant fer notar que aquesta quinasa ja havia estat relacionada amb la resistència al MTX (Wang, 2007) a través d'un mecanisme que involucra Sp1 (Noé, 2001).

Les nostres observacions estan d'acord amb estudis del promotor de l'AKR1C1 en altres organismes. Hirabayashi i col·laboradors van demostrar que el promotor de l'AKR1C1 de ratolí està principalment regulat per Sp1 i Sp3 a través d'una caixa GC situada a -75 respecte l'inici de traducció (Hirabayashi, 2004), que seria homòloga a la caixa GC analitzada en el promotor del gen humà. Aquests autors proposen la regulació dependent de les modificacions post-traduccional conegudes que poden afectar aquests dos factors de transcripció, i conclouen que Sp3 és activador del promotor de l'AKR1C1 de ratolí, conclusió que també es deriva del nostre treball. Per altra banda, el promotor de l'AKR1C1 de rata no presenta la seqüència d'unió per Sp, pel que la regulació és mitjançada per altres factors de transcripció (Zhong, 1998).

Amb la finalitat de simular la sobreexpressió de l'AKR1C1 a les cèl·lules resistents, vam transfectar transitòriament un vector d'expressió per a aquest gen a les cèl·lules sensibles, fet que va resultar en un decrement en la sensibilitat vers el MTX. Aquest resultat donava suport a la idea que l'AKR1C1 podria contribuir, almenys en part, al fenotip resistent. De fet, s'ha descrit que la transfecció d'un vector d'expressió per

l'AKR1C1 en cèl·lules de càncer d'ovari dona lloc a resistència a drogues derivades de platí (Deng, 2004).

Per l'altra banda, també vam voler estudiar els efectes de la disminució de l'AKR1C1 sobre la sensibilitat al MTX. Tot i que s'han dissenyat i assajat un gran nombre d'inhibidors químics de les AKRs (Usami, 2002; Ma, 1999), alguns d'ells són efectius contra més d'un membre de la família, fet que complica la seva utilització en validacions funcionals. És per això que vam dissenyar i utilitzar siRNAs específics com a eina per infraexpressar l'AKR1C1 exclusivament. Així, vam poder observar que el decrement en els nivells d'mRNA de l'AKR1C1 mitjançant per RNA d'interferència sensibilitzava les cèl·lules vers el MTX. Aquesta observació està d'acord amb resultats de Chow i col·laboradors, que demostraven que la inhibició de la expressió de l'AKR1C1 mitjançant RNA d'interferència redueix la resistència a la bleomicina en cèl·lules A431 (Chow, 2006).

Ja que s'havia descrit la relació entre les AKRs i la proliferació cel·lular (Desmond, 2003; Tanaka, 2006), vam estudiar i demostrar que la sobreexpressió de l'AKR1C1 mitjançada per un vector d'expressió contraresta l'aturada en la fase S del cicle cel·lular causada pel MTX, observació que suggeria que l'activitat AKR1C1 pot ser necessària perquè les cèl·lules progressin a través del cicle. Aquesta podria ser una estratègia, paral·lela a l'amplificació del *locus dhfr*, per la qual les cèl·lules resistents podrien sobrepassar la pressió metabòlica que exerceix el MTX sobre la síntesi de nucleòtids. Donat que l'AKR1C1 està funcionalment implicada en el metabolisme de xenobiòtics, la seva activitat podria ser efectiva directament sobre el MTX o sobre algun dels seus metabolits, causant un decrement la concentració d'aquest inhibidor de la DHFR.

En aquesta direcció, s'ha descrit en *Leishmania* l'amplificació d'un gen que confereix resistència al MTX i que presenta una certa similitud de seqüència amb membres de la família AKR (Callahan, 1992). Els autors proposen que la funció d'aquest gen podria ser la detoxificació del MTX, d'algun derivat o d'algun metabolit, la acumulació del qual resulta tòxic durant el tractament amb MTX. Callahan i col·laboradors contemplaven també la possibilitat que el MTX inhibís la funció normal d'aquest gen, però no van comprovar cap de les seves dues teories.

També s'ha descrit que l'activitat AKR es correlaciona amb l'apoptosi: Chow i col·laboradors van mostrar que la inhibició de l'expressió de l'AKR1C1 amb RNAi incrementava tan l'apoptosi com la sensibilitat vers la bleomicina en cèl·lules de carcinoma de pell, fet que indicava un paper important per l'AKR1C1 en els

Discussió

mecanismes de protecció de les cèl·lules tumorals i en la progressió tumoral (Chow, 2006). Els nostres resultats estan d'acord amb aquesta possibilitat, ja que la sobreexpressió de l'AKR1C1 contrarresta l'apoptosi induïda pel MTX. En aquest context, els nivells d'expressió segons el microarray de BID i BAX, dos gens pro-apoptòtics, estaven decrementats en les cèl·lules resistents fins a relacions de 0.6 i 0.7, respectivament, respecte a les cèl·lules sensibles. En aquesta direcció, s'ha proposat que un augment en l'activitat AKR1C1 podria ser suficient per reparar les lesions bioquímiques induïdes pel cisplatí, fet que podria donar lloc al desenvolupament de resistència a la droga (Shen, 1997).

L'AKR1C1 ha estat relacionada amb la resistència a quimioteràpia. La sobreexpressió de l'AKR1C1 confereix resistència a cisplatí i adriamicina en cèl·lules NSCLC, probablement a través de l'activació de la PKC, i a causa d'un control alterat de la reparació del DNA i de l'apoptosi (Wang, 2007). A més, una aldo-ceto reductasa de ratolí protegeix les cèl·lules enfront de l'apoptosi induïda per 4-hidroxiacetonal (Li, 2006) i confereix resistència a la acroleïna (Gardner, 2004). De fet, s'ha proposat que els nivells elevats d'una proteïna amb homologia a membres de la família de les AKRs podrien constituir un mecanisme de resistència contra agents tòxics que requereixin un grup aldehid o cetona a la seva forma activa (Inoue, 1993). L'activitat AKR produeix alcohols primaris o secundaris, que poden ser tan conjugats amb sulfats com glucuronidats, modificacions que faciliten la seva secreció (Penning, 2005). També s'ha suggerit que la funció principal de l'AKR1C1 en cèl·lules HT29 resistents a àcid etacrínic seria el metabolisme de compostos exògens, més que no pas de molècules endògenes (Ciaccio, 1993). En aquest sentit, l'AKR1C1 és capaç de convertir daunorubicina a daunorubicinol, un derivat menys tòxic (Ax, 2000). D'acord amb aquesta observació, Ohara i col·laboradors van demostrar, mitjançant assaigs enzimàtics amb proteïna purificada de diferents membres de la família AKR1C, que una gran varietat de drogues amb un grup cetònic podien actuar com a substrat de l'activitat AKR (Ohara, 1995). S'ha proposat un paper fisiològic per a l'AKR1B10 al metabolisme d'esteroides o la detoxificació d'aldehids reactius que provenguin de la dieta (Hyndman, 1998). Tot i així, en altres línies cel·lulars s'ha demostrat que el cisplatí no és substrat ni inhibidor de l'activitat AKR1C1 *in vitro* (Deng 2004).

Existeix una gran controvèrsia respecte a les funcions de l'AKR1C1 en càncer i en resistència. Els nostres resultats indiquen que la sobreexpressió de l'AKR1C1 en les cèl·lules HT29 resistents al MTX representaria un mecanisme, paral·lel a l'amplificació del *locus dhfr*, que podria contribuir a l'establiment de la resistència al MTX. A més, la disminució dels nivells d'mRNA de l'AKR1C1 podria ser útil en teràpies combinades amb MTX.

El segon estudi, en el qual vam analitzar l'expressió gènica diferencial a nivell de genoma humà complet en cèl·lules HT29 resistents al MTX, ens va permetre ampliar el coneixement de la resposta al MTX en aquesta línia cel·lular de càncer de colon.

Vam observar un conjunt de gens, anomenats ZFYVE16, MSH3, RASGRF2, SSBP2, XRCC4, HAPLN1 i EDIL3, que, d'acord amb els resultats dels microarrays, estaven sobreexpressats a les cèl·lules HT29 resistents al MTX i que es localitzen propers al *locus* del gen *dhfr*, al cromosoma 5. Dos dels gens compresos en aquesta localització, MSH3 i XRCC4, tenen una funció en la reparació del DNA (Drummond, 1997; Pandit, 2001; Jones, 2005); dos més, RASGRF2 i SSBP2, han estat relacionats amb vies de senyalització (Arozarena, 2004; Malumbres, 1998; Liang, 2005); i s'ha suggerit que EDIL3 pot prevenir la apoptosi i promoure la proliferació cel·lular (Rezaee, 2002; Petitclerc, 1999). En varies línies cel·lulars de mamífer en cultiu, l'amplificació gènica s'acompanya de la co-amplificació de gens no relacionats situats prop del gen *diana* (Assaraf, 1989). Aquests increments en el número de còpies de dos gens no relacionats involucra un sol procés d'amplificació comú que resulta en un número de còpies semblant pels dos gens situats a la regió amplificada. De manera semblant, la duplicació selectiva d'un gen bacterià pot involucrar fins al 20% del cromosoma bacterià (Anderson, 1976). De fet, des del descobriment de la amplificació del gen *dhfr*, s'ha descrit l'amplificació de varis gens en diferents càncers, tan prèvia com posterior a la quimioteràpia, i aquest procés és considerat un tret distintiu de la inestabilitat genòmica dels neoplasmes (Knuutila, 1998).

Malgrat que vam confirmar la co-amplificació del gen *dhfr* i dels gens flanquejants, els experiments amb siRNAs no van evidenciar una sensibilització clara vers el MTX. Les nostres observacions indiquen que l'increment en el número de còpies a nivell de DNA i la resultant sobreexpressió dels gens estudiats del *locus* 5q14 podria representar una conseqüència de l'amplificació del gen *dhfr* més que una adaptació de les cèl·lules a la resistència al MTX. De fet, algunes espècies de mamífers (ratolí, rata, bou, gos i ximpanzé) presenten aquest conjunt de gens en el mateix ordre que al cromosoma 5 humà (segons consta al MapViewer de NCBI), fet que indica un patró d'organització gènica conservat. D'acord amb aquesta observació, la sobreexpressió de tots aquests gens a les cèl·lules resistents hauria pogut resultar útil per millorar alguns processos

Discussió

cel·lulars que podrien facilitar la supervivència. Malgrat tot, l'increment en número de còpies d'aquest conjunt de gens no afavoreix directament la resistència al MTX.

Així, vam decidir estudiar altres gens sobreexpressats però no amplificats a les cèl·lules resistents pels que s'havia descrit la relació amb resistència a drogues o amb càncer de colon (veure introducció), i avaluar la seva contribució relativa al nostre sistema cel·lular. Els gens seleccionats amb aquests criteris van ser la Caveolina 1, l'Enolasa 2 i la Proteïna quinasa C alfa. La utilització d'RNAs d'interferència va permetre sensibilitzar les cèl·lules vers el MTX, i ens va permetre establir la implicació d'aquests tres gens en la resistència al MTX en cèl·lules HT29.

Tal com s'ha observat amb la PKC α (Benimetskaya, 2001), la infraexpressió d'un sol gen, tot i que pot contribuir, sol resultar insuficient per quimiosensibilitzar totalment a les cèl·lules. De fet, s'ha hipotitzat que la teràpia futura contra el càncer es basarà en més d'una diana, ja que la monoteràpia ha demostrat moltes limitacions (Orian-Rousseau, 2005). Per aquest motiu vam considerar l'opció de realitzar tractaments combinats per tal de millorar la sensibilitat al MTX. Amb aquest tipus d'aproximació també vam aconseguir sensibilitzar les cèl·lules. De totes maneres, els efectes dels tractaments combinats no van resultar la suma dels efectes causats per cada siRNA per separat. Aquest comportament ha estat descrit anteriorment a la bibliografia (Cheok, 2003; Golub, 2003), i podria reflectir la dificultat que suposa transfectar més d'un siRNA a una concentració de 100nM cadascun. De fet, els nivells d'mRNA dels gens després dels tractaments combinats no eren tan baixos com en els tractaments senzills. En el cas de les cèl·lules resistents, no vam aconseguir una resposta clara en cap dels tractaments realitzats, possiblement perquè la sobreexpressió per amplificació del *locus dhfr* és suficient per emmascarar els efectes dels siRNAs.

No només la sobreexpressió gènica pot originar el fenotip resistent. Un dels gens infraexpressats en major grau a les HT29 resistents al MTX que vam confirmar que estava perdut a nivell genòmic, és l'*E-Cadherina*. Aquesta pèrdua gènica podria ser deguda a deleccions o fragmentacions cromosòmiques específiques, tal com s'ha proposat per a altres gens (Alt, 1978). La relació entre l'*E-Cadherina*, el càncer de colon i la malignitat ha estat prèviament descrita (veure introducció). Els nostres experiments mostren que la sobreexpressió moderada de l'*E-Cadherina* causa un augment en la

sensibilitat vers el MTX. Cal tenir en compte, però, que increments en els nivells d'mRNA d'E-Cadherina de més de tres vegades causaven una reducció en la viabilitat cel·lular. Aquest comportament està d'acord amb experiments de Derksen i col·laboradors, que suggerien que la pèrdua d'E-Cadherina podria representar la causa de l'adquisició de resistència a l'apoptosi, ja que cèl·lules parentals de mama deficientes en E-Cadherina sobreviuen mentre que la re-expressió del gen causava apoptosi (Derksen, 2006).

Els tractaments que permetien reduir els nivells de CAV1 i sobreexpressar l'E-Cadherina alhora van resultar la millor combinació. Aquest tractament sensibilitzava marcadament les cèl·lules sensibles i aconseguia reduir dràsticament la viabilitat de les cèl·lules resistents. Aquestes observacions indiquen que és possible revertir la resistència i van fer palès el paper que juguen ambdós gens en la resistència al MTX. Aquests resultats també evidencien les limitacions de les monoteràpies i donen suport a les teràpies combinades.

Rhodes i col·laboradors van intentar establir un perfil transcripcional comú que s'activaria a la majoria de càncers, i que, per tant, reflectís els trets transcripcionals essencials de la transformació neoplàstica, independentment del tipus de càncer (Rhodes, 2004). Aquests autors van comparar els perfils d'expressió gènica de 12 tipus de càncer i van establir que els gens que formaven aquesta meta-signatura estaven relacionats amb el cicle cel·lular, amb la regulació de la transcripció, el plegament de proteïnes i amb el proteasoma. Els mateixos autors també van definir una meta-signatura pel càncer no diferenciat, que incloïa gens associats amb la proliferació, així com gens anti-apoptòtics i relacionats amb la remodelació de la cromatina. La seva activació en tots els tipus de càncer estudiats indicaria que aquests gens serien essencials per la carcinogènesi, i que podrien representar dianes terapèutiques.

Nestl i col·laboradors intentaren establir els perfils d'expressió gènica associats a la metàstasi (Nestl, 2001). Tot i que van utilitzar principalment línies cel·lulars de 3 tipus de càncer de rata, aquests autors van determinar que les cèl·lules tumorals metastàsiques sobreexpressen molts gens amb funcions redundants.

Discussió

De totes maneres, la base gènica de cada tipus cel·lular, i fins i tot de cada línia cel·lular, pot arribar a ser marcadament diferent. Tenint en compte aquesta premissa, alguns autors han proposat que seria més apropiat determinar els canvis en expressió gènica i analitzar les dades d'una manera dependent de la línia cel·lular o del teixit de procedència que no establir conclusions generalitzades que incloguin totes les línies cel·lulars. S'ha comprovat que canvis en l'expressió gènica observats en una sola línia cel·lular no es poden extrapolar a d'altres línies cel·lulars (Novakovic, 2005).

En el nostre tercer treball, vam voler comparar els patrons d'expressió gènica diferencial en set línies cel·lulars representatives de cinc orígens tissulars diferents. Les anàlisis d'agrupament jeràrquic (*hierarchical clustering*) van evidenciar que les dues línies cel·lulars de càncer de colon estudiades (HT29 i CaCo-2) eren les que presentaven uns perfils d'expressió més semblants entre elles, i que les dues línies cel·lulars de càncer de mama (MCF7 i MDA-MB-468) també s'assemblaven més entre elles, en termes d'expressió gènica, que amb cap altra línia cel·lular. Aquests resultats són lògics, ja que línies cel·lulars derivades d'un mateix teixit presentaran expressió gènica semblant. Les línies cel·lulars representatives de càncer de pàncrees (MIA PaCa-2), de leucèmia (K562) i d'osteosarcoma (Saos-2) es van agrupar apart de les altres línies cel·lulars.

Complementàriament, també vam observar que totes les línies resistents al MTX s'assemblaven més a les línies sensibles de les quals deriven que a les altres línies, fossin sensibles o resistents. Aquests resultats estan d'acord amb els de Perou i col·laboradors, que van observar que dues línies tumorals de mama de la mateixa pacient abans i després del tractament amb doxorubicina s'ajuntaven en un agrupament jeràrquic (Perou, 2000). A més, els mateixos autors van demostrar que una metàstasi i el tumor primari del qual derivava eren tan similars en els seus patrons globals d'expressió gènica com ho eren mostres repetides del mateix tumor primari. Per això van proposar que el programa molecular d'un tumor primari és generalment retingut a les seves metàstasis. Resultats semblants han estat descrits en cèl·lules de pacients de leucèmia (Alizadeh, 2000).

L'únic gen diferencialment expressat comú entre totes les línies cel·lulars estudiades va resultar ser la DHFR. La seva sobreexpressió, tan a nivell d'mRNA com a nivell de

proteïna, es va confirmar a les cèl·lules resistents. Un dels mecanismes acceptats de resistència al MTX és l'amplificació gènica del *locus dhfr* (veure apartat 1.2.3.1 de la Introducció). Vam comprovar l'amplificació del gen *dhfr* a les cèl·lules HT29, CaCo-2, MCF-7 i MIA PaCa-2. De fet, l'amplificació del *locus* 5q14, incloent la *dhfr* i els gens flanquejants, ja havia estat descrita prèviament (Selga, 2008a). Per l'altra banda, les altres línies cel·lulars estudiades no presenten canvis en el número de còpies de la DHFR. Així, la resistència a la droga en aquestes línies pot haver estat deguda a qualsevol dels altres mecanismes coneguts de resistència al MTX. A més, cal tenir en compte que el MTX causa l'expressió gènica diferencial de molts gens, que poden resultar reguladors directes o indirectes de la proliferació, de la supervivència o de l'apoptosi, i aquest patró d'expressió contribueix a modular el fenotip resistent. Tal com es discuteix a continuació, la sobreexpressió de DKK1, de les UGT1A i d'EEF1A1 pot representar un mecanisme, paral·lel a la sobreexpressió de la DHFR, que contribueix a la resistència al MTX.

El fet que els patrons d'expressió gènica de les dues línies cel·lulars de càncer de colon estudiades va resultar semblant, fet que també és aplicable a les línies de càncer de mama. Així, ens vam proposar esbrinar els gens comuns diferencialment expressats en càncer de colon i en càncer de mama. Complementàriament, vam estudiar els gens comuns entre les línies de càncer de pàncrees, leucèmia i osteosarcoma.

La llista de gens comuns sobreexpressats a les línies resistents de càncer de colon incloïa, entre d'altres, DHFR, diana d'acció del MTX, AKRs, que ja havien estat objecte d'estudi del grup prèviament, i DKK1. La construcció de xarxes d'associació biològica (BANs) va donar suport a la idea que DKK1 podria representar un bon gen diana, ja que apareixia com un node clar de la xarxa. A més, la relació entre DKK1 i el càncer havia estat prèviament descrita (referir-se a la introducció). El tractament combinat amb un siRNA dirigit contra l'mRNA de DKK1 i MTX va demostrar una sensibilització de les cèl·lules vers el quimioteràpic, fet que ens va fer pensar que el DKK1 podria tenir altres funcions a les cèl·lules HT29 resistents al MTX a part del seu paper a la via de senyalització de Wnt. De fet, s'ha descrit un paper per la sobreexpressió de DKK1 en càncer, metastasi, tumors agressius i proliferació. Malgrat tot, el seu mecanisme d'acció precís no ha estat descrit. En el cas de les cèl·lules HT29 resistents, el paper de DKK1 tampoc no està clar, encara que sembla estar relacionat amb el fenotip resistent. De fet

Discussió

s'ha demostrat que el MTX inhibeix la transcripció de DKK1, pel que la sobreexpressió de *l* gen a les cèl·lules resistents podria constituir un mecanisme per superar la repressió transcripcional exercida pel MTX. Cal recordar que en el segon article hàviem posat l'activació de la via de Wnt com un mecanisme important en la resistència al MTX en cèl·lules HT29. Resulta interessant el fet que DKK1 està regulat transcripcionalment per la via de Wnt. Així, la activació constitutiva d'aquesta via de senyalització podria representar un mecanisme que explicaria la sobreexpressió de DKK1 a les HT29 resistents al MTX.

Les línies cel·lulars resistents de càncer de mama només compartien la sobreexpressió de les UGT1A, pel que es va dissenyar un siRNA dirigit contra l'mRNA d'alguns membres d'aquesta família. Tractaments tot combinant l'siRNA amb MTX van demostrar un paper per aquesta família gènica en la resistència al MTX en línies cel·lulars de càncer de mama. Degut a l'àmpli ventall de substrats de l'acció de les UGT1A, entre els quals trobem drogues quimioterapèutiques (veure apartat 1.3.3.7 de la introducció), resulta temptador hipotetitzar que les cèl·lules MDA-MB-468 resistents podrien utilitzar el MTX com a substrat, tot i que no es pot assegurar amb els resultats obtinguts.

EEF1A1 estava sobreexpressat en les línies cel·lulars MIA PaCa-2, K562 i Saos-2 resistents, conjuntament amb la DHFR i un gen localitzat cromosòmicament proper al *locus dhfr*, entre alguns altres. Es va seleccionar EEF1A1 ja que s'havia descrit la seva relació amb el càncer i amb la resistència a drogues (veure introducció). La utilització d'un siRNA dirigit contra el seu mRNA va establir la relació existent entre EEF1A1 i la resistència al MTX en cèl·lules MIA PaCa-2.

Els resultats obtinguts amb els siRNAs demostren que els gens DKK1, UGT1A i EEF1A1, gens-node seleccionats a partir dels BANs, representarien dianes potencials per al disseny de teràpies combinades amb MTX.

Atès el nombre de gens estudiats diferencialment expressats a les cèl·lules HT29 resistents al MTX, és plausible integrar les seves funcions en conjunt, tal com es representa a l'esquema 11.

S'ha demostrat que PKC α es transloca des del nucli fins a la membrana plasmàtica (Masur, 2001), on s'associa amb les caveoles (Lisanti, 1994; Liu, 2002), i regula la funció i la formació d'aquestes estructures biològiques, que estan bàsicament constituïdes per molècules de CAV1. L'activació de PKC α fa que aquesta s'alliberi de la membrana (Oka, 1997). Aquestes observacions indiquen que PKC α interacciona funcionalment amb les caveoles. De fet, s'ha descrit la unió directa de PKC α amb CAV1. CAV1 presenta tan un lloc d'unió per PKC α com un lloc de fosforilació per aquesta quinasa. Així mateix, PKC α presenta un lloc d'unió a CAV1 al domini regulador, pel que la unió a CAV1 pot inhibir la seva autofosforilació (Oka, 1997). De totes maneres, aquestes observacions no s'han comprovat en cèl·lules intactes. També s'ha proposat que la senyalització per PKC requereix CAV1 (Waschke, 2006).

A més, s'ha suggerit que PKC α podria estar involucrada en la reorganització del citoesquelet, i s'ha descrit la seva associació amb les adhesions focals en fibroblasts embrionaris de rata (Jaken, 1989). Masur i col·laboradors van demostrar que uns majors nivells d'expressió de PKC α i una menor expressió d'E-Cadherina correlacionaven amb una major activitat migradora de les cèl·lules de càncer de colon i de bufeta i, per tant, també resultava major la probabilitat d'establir metàstasis en estadis primerencs del creixement tumoral (Masur, 2001). La sobreexpressió de PKC α pot representar un esdeveniment cel·lular important que podria afavorir la progressió tumoral tot bloquejant altres vies de senyalització. Aquesta hipòtesi està basada en la observació d'expressió decrementada dels gens E-Cadherina i β -catenina en cèl·lules MCF-7 transfectades amb PKC α , que semblava conduir a una pèrdua d'adhesió cèl·lula-cèl·lula dependent de β -catenina i a un fenotip tumoral més agressiu (Lahn, 2003).

Les interaccions proteïna-proteïna entre CAV1 i altres proteïnes podrien regular la senyalització cel·lular (Lisanti, 1994; Okamoto, 1998). De fet, es coneix que CAV1 controla la proliferació cel·lular i la viabilitat tot inhibint l'expressió de survivina, un membre de la família de les IAP (inhibidors de l'apoptosi) via un mecanisme transcripcional que involucra la via de β -catenin-Tcf/Lef-1 (Torres, 2007).

L'E-cadherina promou la co-localització i la co-immunoprecipitació de CAV1 amb la β -catenina, així com també la inhibició de la transcripció d'una gran varietat de gens

Discussió

regulats per la via de β -catenina-Tcf/Lef-1, entre els que es troben survivina, DHFR i DKK1, entre molts d'altres. La β -catenina pot trobar-se en 3 localitzacions: i) a la membrana plasmàtica, tot formant complexos amb l'E-Cadherina a les unions adherents, que són llocs especialitzats de les unions cèl·lula-cèl·lula que lliguen les molècules de cadherina als microfilaments d'actina (Okegawa, 2004); ii) al citoplasma, associada en un complex multiproteic amb GSK3 β , axina i APC, que regula l'estabilitat de la β -catenina; la fosforilació per GSK3 β constitueix un senyal per la seva subseqüent degradació via proteasoma; iii) al nucli, on promou la transcripció de gens diana en conjunció amb els factors Tcf/Lef-1. La localització de la β -catenina està controlada per l'E-Cadherina.

Cal comentar que l'habilitat de CAV1 per regular l'expressió dels gens regulats per la via de β -catenina-Tcf/Lef-1 està afectada en cèl·lules metastàsiques deficientes en E-Cadherina (Torres, 2007). Si la cèl·lula no presenta E-Cadherina, β -catenina no és retinguda a la membrana plasmàtica i pot translocar-se al nucli (Brabletz, 2001), on pot activar l'expressió de gens implicats en la proliferació cel·lular i la progressió tumoral dependents dels factors de transcripció Tcf i Lef-1 (Cavallaro, 2004).

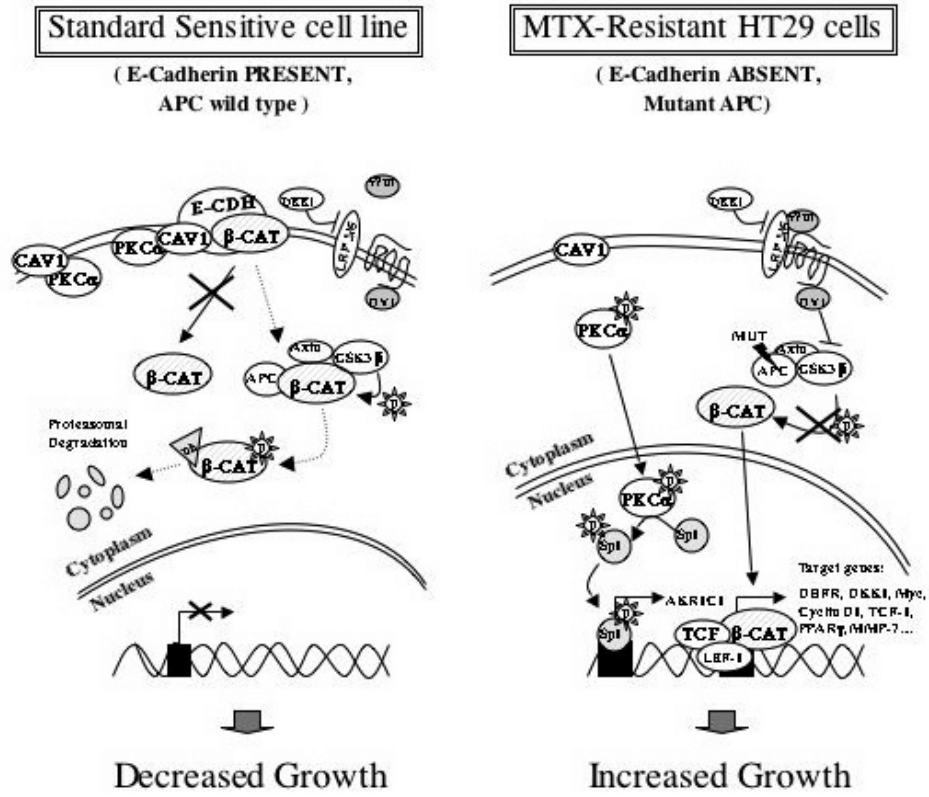
Així, l'E-Cadherina representaria un element permissiu important que defineix les funcions de CAV1 com a supressor de tumors (Torres, 2007). Així, característiques potencialment rellevants perquè CAV1 funcioni com a supressor de tumors estan compromeses en cèl·lules deficientes en E-Cadherina. Complementàriament, Cavallo-Medved i col·laboradors van hipotetitzar que CAV1 podria jugar un paper dual en el desenvolupament tumoral, actuant com a supressor de tumors en estadis primerencs del càncer i com a promotor de la metastasi en estadis avançats de la malaltia (Cavallo-Medved, 2005).

Cal tenir en compte el paper de DKK1 a la via de senyalització de Wnt. S'ha proposat que DKK1 inhibeix la senyalització mitjançada per aquesta via. DKK1 indueix l'endocitosi d'ambdós receptors de Wnt (Semenov, 2001; Mao, 2002), fet que impedeix la iniciació de la cascada de senyalització (Nelson, 2004). Malgrat la inhibició mitjançada per DKK1, l'activació primerenca de la via Wnt / β -catenina és freqüent en la majoria de càncers de colon i d'altres tipus, a causa de mutacions als gen APC o β -catenina (Gonzalez-sancho, 2005; Polakis, 2000). Aquestes mutacions desconnecten la

part efectora de la cascada de senyalització de la part dels receptors de Wnt. Així, de fet, la sobreexpressió de DKK1 a les cèl·lules HT29 resistents, conseqüència de la seva regulació per β -catenina-Tcf/Lef-1, no tindria cap efecte sobre aquesta via a les cèl·lules de càncer de colon.

La relació de l'AKR1C1 amb l'escenari descrit fins ara estaria mitjançada per PKC α . Aquesta quinasa, probablement responsable de la fosforilació d'Sp1 a les cèl·lules resistents, seria important per la regulació transcripcional de l'AKR1C1 en aquesta línia cel·lular. No ha estat descrita la regulació del promotor de l'AKR1C1 a través de la via de β -catenina-Tcf/Lef-1, i l'estudi bioinformàtic de la seqüència promotora no ha evidenciat cap caixa d'unió per Tcf/Lef-1 al promotor proximal del gen. Tampoc consta a la bibliografia la interacció amb cap de les altres proteïnes estudiades. Així, la sobreexpressió de l'AKR1C1 a les cèl·lules resistents deu representar un mecanisme paral·lel que prodria contribuir positivament als efectes de l'escenari prèviament descrit. La via de β -catenina-Tcf/Lef-1 propicia la transcripció de gens que afavoreixen la proliferació i eviten l'apoptosi, i els nostres resultats mostren la relació existent entre la sobreexpressió de l'AKR1C1 i aquests dos processos. Es podria hipotetitzar que l'AKR1C1 podria afavorir o ajudar d'alguna manera que els productes proteics dels gens regulats per la via de β -catenina-Tcf/Lef-1 poguessin exercir el seu efecte, potser metabolitzant algun compost que interferís en la seva funció pro-proliferativa o anti-apoptòtica.

En resum, la gran quantitat de canvis a nivell d'mRNA que succeeixen a les cèl·lules resistents al MTX donen lloc a una gran multitud de canvis en proteïnes involucrades en una gran varietat d'esdeveniments, que acaben estant interconnectats d'alguna manera. La xarxa d'interaccions que se'n deriva és d'una complexitat notòria.



Esquema 11. Integració de les possibles funcions dels gens diferencialment expressats a les cèl·lules HT29 resistents al MTX.

Conclusions

6- Conclusions

- Anàlisis de genòmica funcional amb cèl·lules HT29 resistents al MTX van revelar la sobreexpressió d'una sèrie de membres de la família AKR, entre els quals vam escollir l'AKR1C1 pel seu potencial paper detoxificador.
- L'AKR1C1 està regulada transcripcionalment a les cèl·lules HT29 resistents. L'activació del seu promotor està principalment mitjançada pel factor de transcripció Sp1. Sp3 també és capaç d'activar el promotor de l'AKR1C1, tot i que en menor grau.
- La regulació per Sp1 a les cèl·lules resistents no és deguda a un augment en la quantitat de proteïna, sinó a un increment en l'estat de fosforilació del factor de transcripció a les cèl·lules HT29 resistents.
- La sobreexpressió de l'AKR1C1 a les cèl·lules HT29 resistents no és deguda a un augment en el número de còpies del gen.
- La disminució dels nivells d'mRNA de l'AKR1C1 mitjançada per RNAi sensibilitza les cèl·lules vers el MTX, i la sobreexpressió de l'AKR1C1 a través d'un vector d'expressió confereix resistència al quimioteràpic.
- La sobreexpressió de l'AKR1C1 reverteix el bloqueig en la fase S del cicle cel·lular i l'apoptosi causada pel MTX.
- La sobreexpressió dels gens propers al gen *dhfr* a les cèl·lules HT29 resistents és deguda a un procés d'amplificació gènica i podria resultar útil per estimular processos cel·lulars, com ara la reparació del DNA (MSH3 i XRCC4), la senyalització cel·lular (RASGRF2 i SSBP2) o la proliferació (EDIL3), que facilitessin la supervivència.

Conclusions

- La utilització d'siRNAs dirigits contra CAV1, ENO2, PKC α i DHFR, sols o en combinació, redueix notablement la viabilitat cel·lular i incrementa la sensibilitat vers el MTX en cèl·lules HT29.
- L'E-Cadherina està infraexpressada i deleccionada a nivell genòmic a les cèl·lules resistents. La seva sobreexpressió mitjançant un vector d'expressió sensibilitza les HT29 vers el MTX.
- Experiments de co-transfecció que permeten reduir els nivells d'mRNA de CAV1 i sobreexpressar l'E-cadherina simultàniament causen una gran sensibilització de les cèl·lules sensibles i una disminució dràstica de la viabilitat de les resistents. Per tant, CAV1 i l'E-Cadherina representen bones dianes potencials per desenvolupar un protocol de teràpia coadjuvant.
- Les línies cel·lulars d'un mateix origen tissular presenten patrons semblants d'expressió gènica, e.g. HT29 i Caco-2 de càncer de colon, i MCF-7 i MDA-MB-468 de càncer de mama. A més, les línies resistents al MTX mantenen patrons d'expressió gènica més semblants a les línies sensibles de les quals deriven que als d'altres línies, siguin sensibles o resistents.
- La generació de xarxes d'associació biològica (BANs) a partir de gens comuns diferencialment expressats tant en càncer de colon, de mama, així com de càncer de pàncrees, leucèmia i osteosarcoma, va permetre la identificació de gens que representaven nodes de la resposta biològica al MTX. DKK1, UGT1A i EEF1A1 representen gens-node que juguen un paper en la resistència al MTX en cèl·lules de càncer de colon, de mama i de pàncrees, respectivament, segons es va demostrar mitjançant tecnologia d'RNAi.

Bibliografia

7- Bibliografía

A

Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science*. 1991; 254:1146-53.

Ahmad S Glazer RI. Expression of the antisense cDNA for protein kinase C alpha attenuates resistance in doxorubicin-resistant MCF-7 breast carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 1993; 43:858-62.

Albarracin CT, Parmer TG, Duan WR, Nelson SE Gibori G. Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*. 1994; 134:2453-60.

Alemany C, Noe V Ciudad CJ. Identification by RNA-based arbitrarily primed PCR of the involvement of cytochrome c oxidase in the development of resistance to methotrexate. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1495:319-26.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403:503-11.

Alt FW, Kellems RE, Bertino JR Schimke RT. Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J Biol Chem*. 1978; 253:1357-70.

Anderson RP, Miller CG Roth JR. Tandem duplications of the histidine operon observed following generalized transduction in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol*. 1976; 105:201-18.

Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat*. 2006; 9:227-46.

Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26:153-81.

Assaraf YG, Babani S Goldman ID. Increased activity of a novel low pH folate transporter associated with lipophilic antifolate resistance in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 1998; 273:8106-11.

Assaraf YG, Molina A Schimke RT. Sequential amplification of dihydrofolate reductase and multidrug resistance genes in Chinese hamster ovary cells selected for stepwise resistance to the lipid-soluble antifolate trimetrexate. *J Biol Chem*. 1989; 264:18326-34.

Ax W, Soldan M, Koch L Maser E. Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59:293-300.

B

Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capiiaux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R Bertino JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1587:164-73.

Bar-Joseph Z, Gerber GK, Lee TI, et al. Computational discovery of gene modules and regulatory networks. *Nat Biotechnol*. 2003; 21:1337-42.

Barredo JC, Synold TW, Laver J, et al. Differences in constitutive and post-methotrexate folypolyglutamate synthetase activity in B-lineage and T-lineage leukemia. *Blood*. 1994; 84:564-9.

Barski OA, Gabbay KH Bohren KM. The C-terminal loop of aldehyde reductase determines the substrate and inhibitor specificity. *Biochemistry*. 1996; 35:14276-80.

Basu A. The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol Ther*. 1993; 59:257-80.

Belkov VM, Krynetski EY, Schuetz JD, et al. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood*. 1999; 93:1643-50.

Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL Mercurio AM. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res*. 2005; 65:10938-45.

Bender FC, Reymond MA, Bron C Quest AF. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res*. 2000; 60:5870-8.

Benimetskaya L, Miller P, Benimetsky S, et al. Inhibition of potentially anti-apoptotic proteins by antisense protein kinase C-alpha (Isis 3521) and antisense bcl-2 (G3139) phosphorothioate oligodeoxynucleotides: relationship to the decreased viability of T24 bladder and PC3 prostate cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2001; 60:1296-307.

Bertino JR. The Mechanism of Action of the Folate Antagonists in Man. *Cancer Res*. 1963; 23:1286-306.

Borst P Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71:537-92.

Bouwman P, Gollner H, Elsasser HP, et al. Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *Embo J*. 2000; 19:655-61.

Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:10356-61.

Branda RF, O'Neill JP, Brooks EM, Trombley LM, Nicklas JA. The effect of folate deficiency on the cytotoxic and mutagenic responses to ethyl methanesulfonate in human lymphoblastoid cell lines that differ in p53 status. *Mutat Res.* 2001; 473:51-71.

Brazma A, Vilo J. Gene expression data analysis. *Microbes Infect.* 2001; 3:823-9.

Burczynski ME, Lin HK, Penning TM. Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Res.* 1999; 59:607-14.

Burczynski ME, Sridhar GR, Palackal NT, Penning TM. The reactive oxygen species-- and Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the alpha,beta-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-nonenone. *J Biol Chem.* 2001; 276:2890-7.

C

Callahan HL, Beverley SM. A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *J Biol Chem.* 1992; 267:24165-8.

Campbell L, Gumbleton M, Griffiths DF. Caveolin-1 overexpression predicts poor disease-free survival of patients with clinically confined renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003; 89:1909-13.

Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:118-32.

Cavallo-Medved D, Mai J, Dosesco J, Sameni M, Sloane BF. Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J Cell Sci.* 2005; 118:1493-503.

Chen WJ, Zhu T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. *Trends Plant Sci.* 2004; 9:591-6.

Chen YJ, Yuan CC, Chow KC, et al. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase is associated with cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2005; 97:110-7.

Cheng Q, Cheng C, Crews KR, et al. Epigenetic regulation of human gamma-glutamyl hydrolase activity in acute lymphoblastic leukemia cells. *Am J Hum Genet.* 2006; 79:264-74.

Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:117-29.

Cheok MH, Yang W, Pui CH, et al. Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells. *Nat Genet.* 2003; 34:85-90.

Bibliografia

Chow KC, Lu MP Wu MT. Expression of dihydrodiol dehydrogenase plays important roles in apoptosis- and drug-resistance of A431 squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2006; 41:205-12.

Chu S Ferro TJ. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene.* 2005; 348:1-11.

Ciaccio PJ, Jaiswal AK Tew KD. Regulation of human dihydrodiol dehydrogenase by Michael acceptor xenobiotics. *J Biol Chem.* 1994; 269:15558-62.

Ciaccio PJ, Stuart JE Tew KD. Overproduction of a 37.5-kDa cytosolic protein structurally related to prostaglandin F synthase in ethacrynic acid-resistant human colon cells. *Mol Pharmacol.* 1993; 43:845-53.

Ciaccio PJ Tew KD. cDNA and deduced amino acid sequences of a human colon dihydrodiol dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1186:129-32.

Ciudad CJ, Morris AE, Jeng C Chasin LA. Point mutational analysis of the hamster dihydrofolate reductase minimum promoter. *J Biol Chem.* 1992; 267:3650-6.

Ciudad CJ, Urlaub G Chasin LA. Deletion analysis of the Chinese hamster dihydrofolate reductase gene promoter. *J Biol Chem.* 1988; 263:16274-82.

Cowan KH Jolivet J. A methotrexate-resistant human breast cancer cell line with multiple defects, including diminished formation of methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem.* 1984; 259:10793-800.

D

Deng HB, Adikari M, Parekh HK Simpkins H. Ubiquitous induction of resistance to platinum drugs in human ovarian, cervical, germ-cell and lung carcinoma tumor cells overexpressing isoforms 1 and 2 of dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 54:301-7.

Deng HB, Parekh HK, Chow KC Simpkins H. Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2002; 277:15035-43.

Derksen PW, Liu X, Saridin F, et al. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell.* 2006; 10:437-49.

Desmond JC, Mountford JC, Drayson MT, et al. The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res.* 2003; 63:505-12.

Devi GR. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 2006; 13:819-29.

Ding BC, Witt TL, Hukku B, Heng H, Zhang L Matherly LH. Association of deletions and translocation of the reduced folate carrier gene with profound loss of gene expression in methotrexate-resistant K562 human erythroleukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61:665-75.

Dorudi S, Hanby AM, Poulson R, Northover J Hart IR. Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *Br J Cancer.* 1995; 71:614-6.

Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM Hart IR. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol.* 1993; 142:981-6.

Drummond JT, Genschel J, Wolf E Modrich P. DHFR/MSH3 amplification in methotrexate-resistant cells alters the hMutSalph/hMutSbeta ratio and reduces the efficiency of base-base mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:10144-9.

E

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:14863-8.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001; 411:494-8.

Eldar H, Zisman Y, Ullrich A Livneh E. Overexpression of protein kinase C alpha-subtype in Swiss/3T3 fibroblasts causes loss of both high and low affinity receptor numbers for epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990; 265:13290-6.

Elnakat H Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56:1067-84.

Elnakat H Ratnam M. Role of folate receptor genes in reproduction and related cancers. *Front Biosci.* 2006; 11:506-19.

F

Ferreri AJ, Dell'Oro S, Capello D, et al. Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas. *Br J Haematol.* 2004; 126:657-64.

Bibliografia

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391:806-11.

Fiskerstrand T, Ueland PM Refsum H. Folate depletion induced by methotrexate affects methionine synthase activity and its susceptibility to inactivation by nitrous oxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 282:1305-11.

Fiucci G, Ravid D, Reich R Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene*. 2002; 21:2365-75.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991; 113:173-85.

Fujiwara H, Arima N, Ohtsubo H, et al. Clinical significance of serum neuron-specific enolase in patients with adult T-cell leukemia. *Am J Hematol*. 2002; 71:80-4.

G

Gagliardi G, Kandemir O, Liu D, et al. Changes in E-cadherin immunoreactivity in the adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. *Virchows Arch*. 1995; 426:149-54.

Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R Yin D. Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther*. 2000; 85:207-15.

Gardner R, Kazi S Ellis EM. Detoxication of the environmental pollutant acrolein by a rat liver aldo-keto reductase. *Toxicol Lett*. 2004; 148:65-72.

Gerhold DL, Jensen RV Gullans SR. Better therapeutics through microarrays. *Nat Genet*. 2002; 32 Suppl:547-51.

Golub TR. Mining the genome for combination therapies. *Nat Med*. 2003; 9:510-1.

Gopalakrishna R Barsky SH. Tumor promoter-induced membrane-bound protein kinase C regulates hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85:612-6.

Gorlick R, Goker E, Trippett T, et al. Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood*. 1997; 89:1013-8.

Graffner-Nordberg M, Fyfe M, Brattsand R, Mellgard B Hallberg A. Design and synthesis of dihydrofolate reductase inhibitors encompassing a bridging ester group. Evaluation in a mouse colitis model. *J Med Chem*. 2003; 46:3455-62.

Grekova MC, Scherer SW, Trabb J Richert JR. Localization of the human SP3 gene to chromosome 7p14-p15.2. The lack of expression in multiple sclerosis does not reflect abnormal gene organization. *J Neuroimmunol*. 2000; 106:214-9.

Guglielmi A, Barni S, Zaniboni A, et al. Phase II study of a triplet regimen in advanced colorectal cancer using methotrexate, oxaliplatin and 5-fluorouracil. *Br J Cancer*. 2004; 91:1428-33.

Guo W, Healey JH, Meyers PA, et al. Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. *Clin Cancer Res*. 1999; 5:621-7.

H

Haber DA, Beverley SM, Kiely ML, Schimke RT. Properties of an altered dihydrofolate reductase encoded by amplified genes in cultured mouse fibroblasts. *J Biol Chem*. 1981; 256:9501-10.

Haeusler J, Hoegel J, Bachmann N, et al. Association of a CAV-1 haplotype to familial aggressive prostate cancer. *Prostate*. 2005; 65:171-7.

Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20:5519-25.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70.

Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002; 418:244-51.

Hara A, Matsuura K, Tamada Y, et al. Relationship of human liver dihydrodiol dehydrogenases to hepatic bile-acid-binding protein and an oxidoreductase of human colon cells. *Biochem J*. 1996; 313 (Pt 2):373-6.

Hedrick L, Cho KR, Vogelstein B. Cell adhesion molecules as tumour suppressors. *Trends Cell Biol*. 1993; 3:36-9.

Hegde P, Qi R, Abernathy K, et al. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques*. 2000; 29:548-50, 52-4, 56 passim.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med*. 1997; 3:177-82.

Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1997; 272:19095-8.

Hess KR, Zhang W, Baggerly KA, Stivers DN, Coombes KR. Microarrays: handling the deluge of data and extracting reliable information. *Trends Biotechnol*. 2001; 19:463-8.

Hirabayashi K, Ishida M, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Characterization and functional analysis of the 5'-flanking region of the mouse 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochem J*. 2004; 382:975-80.

Bibliografia

Ho CC, Huang PH, Huang HY, Chen YH, Yang PC Hsu SM. Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol.* 2002; 161:1647-56.

Hryniuk WM Bertino JR. Treatment of leukemia with large doses of methotrexate and folic acid: clinical-biochemical correlates. *J Clin Invest.* 1969; 48:2140-55.

Hsu NY, Ho HC, Chow KC, et al. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase as a prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:2727-31.

Hung JJ, Chow KC, Wang HW Wang LS. Expression of dihydrodiol dehydrogenase and resistance to chemotherapy and radiotherapy in adenocarcinoma cells of lung. *Anticancer Res.* 2006; 26:2949-55.

Hung KF, Lin SC, Liu CJ, Chang CS, Chang KW Kao SY. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32:461-7.

Hyndman DJ Flynn TG. Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1399:198-202.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992; 69:11-25.

I

Inoue S, Sharma RC, Schimke RT Simoni RD. Cellular detoxification of tripeptidyl aldehydes by an aldo-keto reductase. *J Biol Chem.* 1993; 268:5894-8.

J

Jaken S, Leach K Klauck T. Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts. *J Cell Biol.* 1989; 109:697-704.

Jez JM Penning TM. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact.* 2001; 130-132:499-525.

Ji Q, Aoyama C, Chen PK, Stolz A Liu P. Localization and altered expression of AKR1C family members in human ovarian tissues. *Mol Cell Probes.* 2005; 19:261-6.

Ji Q, Aoyama C, Nien YD, et al. Selective loss of AKR1C1 and AKR1C2 in breast cancer and their potential effect on progesterone signaling. *Cancer Res.* 2004; 64:7610-7.

Jones KR, Gewirtz DA, Yannone SM, et al. Radiosensitization of MDA-MB-231 breast tumor cells by adenovirus-mediated overexpression of a fragment of the XRCC4 protein. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4:1541-7.

K

Karnak D, Beder S, Kayacan O, Ibis E Oflaz G. Neuron-specific enolase and lung cancer. *Am J Clin Oncol*. 2005; 28:586-90.

Katayama M, Hirai S, Kamihagi K, Nakagawa K, Yasumoto M Kato I. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br J Cancer*. 1994; 69:580-5.

Katayama M, Nakano H, Ishiuchi A, et al. Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg Today*. 2006; 36:1085-93.

Kato K, Hida Y, Miyamoto M, et al. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer*. 2002; 94:929-33.

Kaufman Y, Ifergan I, Rothem L, Jansen G Assaraf YG. Coexistence of multiple mechanisms of PT523 resistance in human leukemia cells harboring 3 reduced folate carrier alleles: transcriptional silencing, inactivating mutations, and allele loss. *Blood*. 2006; 107:3288-94.

Kim YI. Role of folate in colon cancer development and progression. *J Nutr*. 2003; 133:3731S-9S.

Kimura E, Nishimura K, Sakata K, Oga S, Kashiwagi K Igarashi K. Methotrexate differentially affects growth of suspension and adherent cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36:814-25.

Kitakata H, Yasumoto K, Sudo Y, Minato H Takahashi Y. A case of primary small cell carcinoma of the breast. *Breast Cancer*. 2007; 14:414-9.

Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, et al. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol*. 1998; 152:1107-23.

Kobayashi H, Takemura Y Ohnuma T. Variable expression of RFC1 in human leukemia cell lines resistant to antifolates. *Cancer Lett*. 1998; 124:135-42.

Kondo KH, Kai MH, Setoguchi Y, et al. Cloning and expression of cDNA of human delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase and substrate specificity of the expressed enzyme. *Eur J Biochem*. 1994; 219:357-63.

Korczak B, Whale C Kerbel RS. Possible involvement of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation in the induction of spontaneous metastasis by mouse mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. 1989; 49:2597-602.

Kozian DH Kirschbaum BJ. Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol*. 1999; 17:73-8.

L

Lahn M, Kohler G, Sundell K, et al. Protein kinase C alpha expression in breast and ovarian cancer. *Oncology*. 2004; 67:1-10.

Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem*. 1998; 273:32380-3.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998; 396:643-9.

Leteurtre E, Gouyer V, Rousseau K, et al. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biol Cell*. 2004; 96:145-51.

Lewis MJ, Wiebe JP, Heathcote JG. Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2004; 4:27.

Li WW, Waltham M, Tong W, Schweitzer BI, Bertino JR. Increased activity of gamma-glutamyl hydrolase in human sarcoma cell lines: a novel mechanism of intrinsic resistance to methotrexate (MTX). *Adv Exp Med Biol*. 1993; 338:635-8.

Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 1992; 52:6966-8.

Liani E, Rothem L, Bunni MA, Smith CA, Jansen G, Assaraf YG. Loss of folylpoly-gamma-glutamate synthetase activity is a dominant mechanism of resistance to polyglutamylation-dependent novel antifolates in multiple human leukemia sublines. *Int J Cancer*. 2003; 103:587-99.

Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, et al. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol*. 1994; 126:111-26.

Liu M, Ge Y, Payton SG, et al. Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:608-16.

Liu M, Whetstone JR, Payton SG, Ge Y, Flatley RM, Matherly LH. Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochem J*. 2004; 383:249-57.

Liu P, Rudick M, Anderson RG. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem*. 2002; 277:41295-8.

Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 1992; 70:923-35.

Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991; 51:3075-9.

Lu Z, Ghosh S, Wang Z Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell.* 2003; 4:499-515.

M

Ma D, Huang H Moscow JA. Down-regulation of reduced folate carrier gene (RFC1) expression after exposure to methotrexate in ZR-75-1 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 279:891-7.

Ma H Penning TM. Characterization of homogeneous recombinant rat ovarian 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: fluorescent properties and inhibition profile. *Biochem J.* 1999; 341 (Pt 3):853-9.

Mao J, Duan RW, Zhong L, Gibori G Azhar S. Expression, purification and characterization of the rat luteal 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology.* 1997; 138:182-90.

Mariani BD, Slate DL Schimke RT. S phase-specific synthesis of dihydrofolate reductase in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78:4985-9.

Martelli AM, Sang N, Borgatti P, Capitani S Neri LM. Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J Cell Biochem.* 1999; 74:499-521.

Masur K, Lang K, Niggemann B, Zanker KS Entschladen F. High PKC alpha and low E-cadherin expression contribute to high migratory activity of colon carcinoma cells. *Mol Biol Cell.* 2001; 12:1973-82.

Mauritz R, Peters GJ, Priest DG, et al. Multiple mechanisms of resistance to methotrexate and novel antifolates in human CCRF-CEM leukemia cells and their implications for folate homeostasis. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63:105-15.

McCloskey DE, McGuire JJ, Russell CA, et al. Decreased folylpolyglutamate synthetase activity as a mechanism of methotrexate resistance in CCRF-CEM human leukemia sublines. *J Biol Chem.* 1991; 266:6181-7.

Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA Matzke AJ. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J.* 2000; 19:5194-201.

Moran RG, Werkheiser WC Zakrzewski SF. Folate metabolism in mammalian cells in culture. I Partial characterization of the folate derivatives present in L1210 mouse leukemia cells. *J Biol Chem.* 1976; 251:3569-75.

Bibliografía

Munro SB, Turner IM, Farookhi R, Blaschuk OW, Jothy S. E-cadherin and OB-cadherin mRNA levels in normal human colon and colon carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 1995; 62:118-22.

N

Nakajima T, Yasuda K, Nishizawa M, et al. Expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in human endometrium and decidua. *Endocr J.* 2003; 50:105-11.

Nestl A, Von Stein OD, Zatloukal K, et al. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res.* 2001; 61:1569-77.

Neumann K, Al-Batayneh KM, Kuiper MJ, et al. A single point mutation in *Drosophila* dihydrofolate reductase confers methotrexate resistance to a transgenic CHO cell line. *Genome.* 2003; 46:707-15.

Noe V, Alemany C, Chasin LA, Ciudad CJ. Retinoblastoma protein associates with SP1 and activates the hamster dihydrofolate reductase promoter. *Oncogene.* 1998; 16:1931-8.

Noe V, Alemany C, Nicolas M, Ciudad CJ. Sp1 involvement in the 4beta-phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-mediated increase in resistance to methotrexate in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem.* 2001; 268:3163-73.

Noe V, Chen C, Alemany C, et al. Cell-growth regulation of the hamster dihydrofolate reductase gene promoter by transcription factor Sp1. *Eur J Biochem.* 1997; 249:13-20.

Noe V, Ciudad CJ. Protein kinase C inhibitors reduce phorbol ester-induced resistance to methotrexate in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50:337-46.

Noe V, Ciudad CJ, Chasin LA. Effect of differential polyadenylation and cell growth phase on dihydrofolate reductase mRNA stability. *J Biol Chem.* 1999; 274:27807-14.

Noe V, MacKenzie S, Ciudad CJ. An intron is required for dihydrofolate reductase protein stability. *J Biol Chem.* 2003; 278:38292-300.

Novakovic P, Stempak JM, Sohn KJ, Kim YI. Effects of folate deficiency on gene expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2006; 27:916-24.

O

O'Connor T, Ireland LS, Harrison DJ, Hayes JD. Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem J.* 1999; 343 Pt 2:487-504.

Ohara H, Miyabe Y, Deyashiki Y, Matsuura K Hara A. Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50:221-7.

Oka N, Yamamoto M, Schwencke C, et al. Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem.* 1997; 272:33416-21.

Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 1998; 273:5419-22.

Okegawa T, Pong RC, Li Y Hsieh JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol.* 2004; 51:445-57.

Orian-Rousseau V, Mink S, Mengwasser J, et al. Genes upregulated in a metastasizing human colon carcinoma cell line. *Int J Cancer.* 2005; 113:699-705.

P

Pal-Bhadra M, Bhadra U Birchler JA. Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. *Cell.* 1997; 90:479-90.

Pan MR Hung WC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2002; 277:32775-80.

Pandit B, Roy M, Dutta J, Padhi BK, Bhoumik G Bhattacharyya NP. Co-amplification of dhfr and a homologue of hmsh3 in a Chinese hamster methotrexate-resistant cell line correlates with resistance to a range of chemotherapeutic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001; 48:312-8.

Pennie WD. Use of cDNA microarrays to probe and understand the toxicological consequences of altered gene expression. *Toxicol Lett.* 2000; 112-113:473-7.

Pennie WD. Custom cDNA microarrays; technologies and applications. *Toxicology.* 2002; 181-182:551-4.

Penning TM. AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:1687-90.

Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, et al. Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J.* 2000; 351:67-77.

Bibliografía

Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, et al. Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 171:137-49.

Penning TM, Jin Y, Heredia VV, Lewis M. Structure-function relationships in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 85:247-55.

Penning TM, Pawlowski JE, Schlegel BP, et al. Mammalian 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids.* 1996; 61:508-23.

Penuelas S, Alemany C, Noe V, Ciudad CJ. The expression of retinoblastoma and Sp1 is increased by low concentrations of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Eur J Biochem.* 2003; 270:4809-22.

Penuelas S, Noe V, Ciudad CJ. Modulation of IMPDH2, survivin, topoisomerase I and vimentin increases sensitivity to methotrexate in HT29 human colon cancer cells. *Febs J.* 2005; 272:696-710.

Penuelas S, Noe V, Morales R, Ciudad CJ. Sensitization of human erythroleukemia K562 cells resistant to methotrexate by inhibiting IMPDH. *Med Sci Monit* 2005, 11:BR6-12.

Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell.* 2003; 112:535-48.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406:747-52.

Petitclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, et al. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* 1999; 59:2724-30.

Pignatello R, Guccione S, Forte S, et al. Lipophilic conjugates of methotrexate with short-chain alkylamino acids as DHFR inhibitors. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *Bioorg Med Chem.* 2004; 12:2951-64.

Q

Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:418-27.

R

Rahman LK Chhabra SR. The chemistry of methotrexate and its analogues. *Med Res Rev.* 1988; 8:95-155.

Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Aggarwal BB, Srivastava SK. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002; 277:32063-70.

Ramana KV, Friedrich B, Bhatnagar A, Srivastava SK. Aldose reductase mediates cytotoxic signals of hyperglycemia and TNF-alpha in human lens epithelial cells. *Faseb J.* 2003; 17:315-7.

Rezaee M, Penta K, Quertermous T. Del1 mediates VSMC adhesion, migration, and proliferation through interaction with integrin alpha(v)beta(3). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282:H1924-32.

Rhodes DR, Yu J, Shanker K, et al. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:9309-14.

Rizner TL, Lin HK, Peehl DM, Steckelbroeck S, Bauman DR, Penning TM. Human type 3 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells. *Endocrinology.* 2003; 144:2922-32.

Rizner TL, Smuc T, Ruprecht R, Sinkovec J, Penning TM. AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2006; 248:126-35.

Rosowsky A, Forsch R. Methotrexate analogues. 16. Importance of the side-chain amide carbonyl group as a structural determinant of biological activity. *J Med Chem.* 1982; 25:1454-9.

Rosowsky A, Forsch RA, Freisheim JH, Moran RG, Wick M. Methotrexate analogues. 19. Replacement of the glutamate side chain in classical antifolates by L-homocysteic acid and L-cysteic acid: effect on enzyme inhibition and antitumor activity. *J Med Chem.* 1984; 27:600-4.

Rosowsky A, Forsch RA, Moran RG, Kohler W, Freisheim JH. Methotrexate analogues. 32. Chain extension, alpha-carboxyl deletion, and gamma-carboxyl replacement by sulfonate and phosphonate: effect on enzyme binding and cell-growth inhibition. *J Med Chem.* 1988; 31:1326-31.

Rosowsky A, Forsch RA, Wright JE. Synthesis and in vitro antifolate activity of rotationally restricted aminopterin and methotrexate analogues. *J Med Chem.* 2004; 47:6958-63.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 1992; 68:673-82.

Rothem L, Aronheim A, Assaraf YG. Alterations in the expression of transcription factors and the reduced folate carrier as a novel mechanism of antifolate resistance in human leukemia cells. *J Biol Chem.* 2003; 278:8935-41.

Bibliografia

Rothem L, Ifergan I, Kaufman Y, Priest DG, Jansen G Assaraf YG. Resistance to multiple novel antifolates is mediated via defective drug transport resulting from clustered mutations in the reduced folate carrier gene in human leukaemia cell lines. *Biochem J.* 2002; 367:741-50.

Rothem L, Stark M Assaraf YG. Impaired CREB-1 phosphorylation in antifolate-resistant cell lines with down-regulation of the reduced folate carrier gene. *Mol Pharmacol.* 2004; 66:1536-43.

Roy K, Egan MG, Sirlin S Sirotinak FM. Posttranscriptionally mediated decreases in folypolyglutamate synthetase gene expression in some folate analogue-resistant variants of the L1210 cell. Evidence for an altered cognate mRNA in the variants affecting the rate of de novo synthesis of the enzyme. *J Biol Chem.* 1997; 272:6903-8.

Roy K, Tolner B, Chiao JH Sirotinak FM. A single amino acid difference within the folate transporter encoded by the murine RFC-1 gene selectively alters its interaction with folate analogues. Implications for intrinsic antifolate resistance and directional orientation of the transporter within the plasma membrane of tumor cells. *J Biol Chem.* 1998; 273:2526-31.

S

Schimke RT, Kaufman RJ, Alt FW Kellems RF. Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells. *Science.* 1978; 202:1051-5.

Schneider E Ryan TJ. Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin Chim Acta.* 2006; 374:25-32.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003; 115:199-208.

Sharma RC, Assaraf YG Schimke RT. A phenotype conferring selective resistance to lipophilic antifolates in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1991; 51:2949-59.

Sharom FJ. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol.* 1997; 160:161-75.

Shen H, Kauvar L Tew KD. Importance of glutathione and associated enzymes in drug response. *Oncol Res.* 1997; 9:295-302.

Sierra EE, Brigle KE, Spinella MJ Goldman ID. pH dependence of methotrexate transport by the reduced folate carrier and the folate receptor in L1210 leukemia cells. Further evidence for a third route mediated at low pH. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53:223-31.

Sierra EE Goldman ID. Characterization of folate transport mediated by a low pH route in mouse L1210 leukemia cells with defective reduced folate carrier function. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55:1505-12.

- Silink M, Reddel R, Bethel M Rowe PB. Gamma-glutamyl hydrolase conjugase). Purification and properties of the bovine hepatic enzyme. *J Biol Chem.* 1975; 250:5982-94.
- Singh R, Fouladi-Nashta AA, Li D, Halliday N, Barrett DA Sinclair KD. Methotrexate induced differentiation in colon cancer cells is primarily due to purine deprivation. *J Cell Biochem.* 2006; 99:146-55.
- Smithgall TE, Harvey RG Penning TM. Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *J Biol Chem.* 1988; 263:1814-20.
- Sobrero A, Frassinetti G, Falcone A, et al. Adjuvant sequential methotrexate --> 5-fluorouracil vs 5-fluorouracil plus leucovorin in radically resected stage III and high-risk stage II colon cancer. *Br J Cancer.* 2005; 92:24-9.
- Soinov LA, Krestyaninova MA Brazma A. Towards reconstruction of gene networks from expression data by supervised learning. *Genome Biol.* 2003; 4:R6.
- Spencer HT, Sorrentino BP, Pui CH, Chunduru SK, Sleep SE Blakley RL. Mutations in the gene for human dihydrofolate reductase: an unlikely cause of clinical relapse in pediatric leukemia after therapy with methotrexate. *Leukemia.* 1996; 10:439-46.
- Srimatkandada S, Medina WD, Cashmore AR, et al. Amplification and organization of dihydrofolate reductase genes in a human leukemic cell line, K-562, resistant to methotrexate. *Biochemistry.* 1983; 22:5774-81.
- Srimatkandada S, Schweitzer BI, Moroson BA, Dube S Bertino JR. Amplification of a polymorphic dihydrofolate reductase gene expressing an enzyme with decreased binding to methotrexate in a human colon carcinoma cell line, HCT-8R4, resistant to this drug. *J Biol Chem.* 1989; 264:3524-8.
- Stadtman ER Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.* 1997; 10:485-94.
- Stark M Assaraf YG. Loss of Sp1 function via inhibitory phosphorylation in antifolate-resistant human leukemia cells with down-regulation of the reduced folate carrier. *Blood.* 2006; 107:708-15.
- Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene.* 1999; 238:291-300.
- Suzuki-Yamamoto T, Nishizawa M, Fukui M, et al. cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett.* 1999; 462:335-40.
- Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K, et al. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2002; 87:1140-4.
- Synold TW, Relling MV, Boyett JM, et al. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 1994; 94:1996-2001.

T

Taddei I, Piazzini M, Bartoletti R, Dal Canto M Sardi I. Molecular alterations of E-cadherin gene: possible role in human bladder carcinogenesis. *Int J Mol Med.* 2000; 6:201-8.

Takenaga K Takahashi K. Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on adhesiveness and lung-colonizing ability of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 1986; 46:375-80.

Tanaka NM, Shiota K, Noda K, et al. Effects of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and its inhibitors on canine osteosarcoma cell growth in vitro. *J Vet Med Sci.* 1996; 58:623-7.

Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ Church GM. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet.* 1999; 22:281-5.

Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, et al. E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 2007; 27:7703-17.

V

Valin A Gill G. Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35:1393-6.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995; 270:484-7.

Vogel K, Bentley P, Platt KL Oesch F. Rat liver cytoplasmic dihydrodiol dehydrogenase. Purification to apparent homogeneity and properties. *J Biol Chem.* 1980; 255:9621-5.

W

Wang LS, Chow KC, Wu YC, Lin TY Li WY. Inverse expression of dihydrodiol dehydrogenase and glutathione-S-transferase in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2004; 111:246-51.

Wang XY, Repasky E Liu HT. Antisense inhibition of protein kinase Calpha reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 1999; 250:253-63.

Waschke J, Golenhofen N, Kurzchalia TV Drenckhahn D. Protein kinase C-mediated endothelial barrier regulation is caveolin-1-dependent. *Histochem Cell Biol.* 2006; 126:17-26.

Ways DK, Kukoly CA, deVente J, et al. MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C-alpha exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype. *J Clin Invest.* 1995; 95:1906-15.

Wettergren Y, Odin E, Nilsson S, Willen R, Carlsson G, Gustavsson B. Low expression of reduced folate carrier-1 and folylpolyglutamate synthase correlates with lack of a deleted in colorectal carcinoma mRNA splice variant in normal-appearing mucosa of colorectal carcinoma patients. *Cancer Detect Prev.* 2005; 29:348-55.

Whetstine JR, Witt TL, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and sp1 transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism. *J Biol Chem.* 2002; 277:43873-80.

Wiebe JP, Muzia D, Hu J, Szwajcer D, Hill SA, Seachrist JL. The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res.* 2000; 60:936-43.

Wiedemann LM, Johnson LF. Regulation of dihydrofolate reductase synthesis in an overproducing 3T6 cell line during transition from resting to growing state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76:2818-22.

Wike-Hooley JL, Haveman J, Reinhold HS. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol.* 1984; 2:343-66.

Worm J, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Guldberg P. Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:39990-40000.

Wyrick JJ, Young RA. Deciphering gene expression regulatory networks. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12:130-6.

Y

Yang G, Truong LD, Timme TL, et al. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998; 4:1873-80.

Yeh CS, Wang JY, Chung FY, et al. Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncol Rep.* 2008; 19:81-91.

Yu G, Ahmad S, Aquino A, et al. Transfection with protein kinase C alpha confers increased multidrug resistance to MCF-7 cells expressing P-glycoprotein. *Cancer Commun.* 1991; 3:181-9.

Z

Zampino MG, Lorizzo K, Rocca A, et al. Oxaliplatin combined with 5-fluorouracil and methotrexate in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2006; 26:2425-8.

Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ES. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2005; 4:1686-96.

Zhang L, Taub JW, Williamson M, et al. Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clin Cancer Res.* 1998; 4:2169-77.

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science.* 1997; 276:1268-72.

Zhang Y, Dufort I, Rheault P, Luu-The V. Characterization of a human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25:221-8.

Zhao R, Hanscom M, Chattopadhyay S, Goldman ID. Selective preservation of pemetrexed pharmacological activity in HeLa cells lacking the reduced folate carrier: association with the presence of a secondary transport pathway. *Cancer Res.* 2004; 64:3313-9.

Zhong L, Ou J, Barkai U, Mao JF, Frasar J, Gibori G. Molecular cloning and characterization of the rat ovarian 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249:797-803.