

Paper de la UGT1A6 en la resistència al metotrexat : estudi dels harpins de polipurines per disminuir l'expressió gènica

M^a Cristina de Almagro García

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
Programa de Doctorat de Biotecnologia

PAPER DE LA UGT1A6 EN LA RESISTÈNCIA AL METOTREXAT: ESTUDI
DELS HAIRPINS DE POLIPURINES PER DISMINUIR L'EXPRESSIÓ GÈNICA

Memòria presentada per M^aCristina de Almagro García per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Dr. Carles J. Ciudad Gómez

Dra. Verónica Noé Mata

M^aCristina de Almagro García

Barcelona
2010



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PAPER DE LA UGT1A6 EN LA RESISTÈNCIA AL METOTREXAT: ESTUDI
DELS HAIRPINS DE POLIPURINES PER DISMINUIR L'EXPRESSIÓ GÈNICA

M^aCRISTINA DE ALMAGRO GARCÍA

2010

Y la vida empezó
en el mar ...

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi és el resultat de tot el treball, temps i voluntat que ha posat el Dr. Carlos Ciudad en mi. Gràcies a ell per introduir-me en el món de la recerca quan encara estava estudiant la carrera, i contagiar-me la seva il·lusió per aquest treball que em va portar a fer el doctorat. Sense la seva ajuda aquesta tesi doctoral no hauria estat possible. Gràcies per tot el que he après, encara que em vagi agafant a la meua manera el “chupete”, continuï dient tropomiles i un porrón i tingui desregulat el repressor del somriure. Així mateix, gràcies per tots els moments que hem compartit, com algun que altre viatge en moto, les jornades de “ranneros”, i els subministres de xocolata blanca (sí, per mi la blanca es considera xocolata).

Així mateix, gràcies a la Vero per tots els moments de “¿te puedo hacer una preguntita?”, per les seves correccions d’articles i tesi en temps rècords, i per tots els bons moments que ens fa passar al lab amb mil i una historietes.

Gràcies a tot el City lab, a la Sílvia com a “mare” científica i donació de la seva poiata; a l’Alícia per totes aquelles tardes de pensament crític i mirar les coses des d’un altre punt de vista, així com la gran troballa del chino; a l’Eli per tot el que em va ensenyar (no només paraules de gironí profund) així com per les caminades pel parc; a la Carlota per les fiestukis (si, no et trauràs la fama) i la gestió; a la Núria pels seus bailoteos i paciència; a la Xènia per les seves xeniades i per la música que em permet una concentració zen; al Pau per la seva curiositat i interès; així com per totes les altres persones que han anat passant pel lab i que sempre han aportat alguna cosa nova: Isabel, Mariana, Estela, Sara, Anna, Eduard, Audrey, Sabine i Laura.

Per descomptat gràcies a tot el departament pels bons moments que hem passat junts, ja sigui en els passadissos o fora del lab. Als nostres veïns i rivals de campana, als veïns de davant, als de peixos per totes les rialles, als colis per algun que altre prèstam, als de pedro i diego, i als de plantes. Així mateix gràcies a la Sílvia i l’Andrés per arreglar la situació quan algun aparell no funcionava, així com a Brugués, M^aCarmen i Montse.

També donar les gràcies pels bons moments i aprenentatge a tots aquells amb els qui hem col·laborat com Leitat (i els ratolins que en pau descansin), grup de Marta Cascante, Rhémi i Cinta, grup de Ramon, i tots els de Columbus del grup del Dr.Croce, vull agrair-los la seva ajuda i suport.

Donar les gràcies a tots els meus amics ja siguin del màster, la carrera o de sempre per estar sempre allà, especialment a les Teresitas. També a la meva família, Pochi II i Pochi III, així com a Piltra (aunque no me perdones lo de Almagrensis, you never know) i Peque (por todas esas tontilocuras). També al nostre CrisLu de Dum Dum, sense el qual moltes coses haurien sigut diferents.

Gràcies a tothom.

Índex	1
Abreviacions	5
Presentació	7
1. Introducció	13
1.1- Càncer	15
1.1.1- Càncer de mama	16
1.2- DHFR-MTX	18
1.2.1- DHFR	18
1.2.2- MTX	19
1.2.3- Resistència al MTX	19
1.3- UGTs	22
1.3.1- UGT1A6	25
1.4- Teràpia gènica	27
1.4.1- Utilització d'oligonucleòtids en teràpia gènica	30
1.4.1.1- Enllaços Hoogsteen	30
1.4.1.2- TFOs	31
1.4.1.3- PPRHs	32
1.4.2- Gens diana amb aplicacions terapèutiques	35
1.4.2.1- DHFR	35
1.4.2.2- Survivina	35
1.4.2.3- Telomerasa	35
1.4.2.4- c-myc	36
1.4.2.5- Topoisomerasa I	36
1.4.2.6- Mdm2	36
1.4.2.7- Bcl-2	37

1.4.3- Gens de resposta immune a oligonucleòtids	38
1.4.3.1- DAI	38
1.4.3.2- INF α I IFN β	38
1.4.3.3- OAS1	39
2. Objectius	41
3. Materials i mètodes	45
3.1- Materials	47
3.1.1- Línies cel·lulars	47
3.1.2- Medis de cultiu	48
3.1.3- aODNS, PPRHs i siRNAs	48
3.1.3.1- aODNs	48
3.1.3.2- PPRHs	49
3.1.3.3- siRNAs	51
3.1.4- Vectors plasmídics	52
3.1.4.1- Vectors d'expressió eucariota	52
3.1.4.2- Vectors amb el gen luc	52
3.2- Mètodes	53
3.2.1- Disseny de PPRHs	53
3.2.2- Transcripció in vitro	54
3.2.3- Splicing in vitro	55
4. Resultats	57
4.1- Article I	59
4.2- Article II	73
4.3- Article III	87
ANNEX	
4.3.1. Activació de la resposta immune	129
4.3.2. Aplicació dels Template-PPRHs	130
5. Discussió	137

5.1 – UGT1A6	140
5.2 - Template-PPRHs	144
5.3 - Coding-PPRHs	148
5.4 – Activació immune i gens amb importància terapèutica	152
6. Conclusions	155
Annex	159
Bibliografia	163

A	Adenina
Ab	Anticòs
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
aODN	Oligonucleòtid antisense
APRT	Adenosina fosforibosil transferasa
ARNT	AhR nuclear transporter
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Base pair
C	Citosina
Ci	Curies
cDNA	DNA còpia
cpm	comptes per minut
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DEPC	Dietil pirocarbonat
DHFR	Dihidrofolat reductasa
DNA	Àcid desoxiribonuclèic
dNTPs	Deoxiribonucleòtids trifosfat
EMSA	Assaig de retardació de la mobilitat electroforètica
G	Guanina
-GHT	Medi F12 sense glicina, hipoxantina ni timidina
HIF-1	Hypoxia inducible factor
Hp	Hairpin
Luc	Luciferasa
MDR	Multidrug resistance
MTX	Metotrexat
mRNA	Àcid ribonuclèic missatger
nt	Nucleòtid
OAS	2'-5' oligoadenylate synthetase
PCR	Polymerase chain reaction
PPRH	Polipurine Reverse Hoogsteen hairpin
RNA	Àcid ribonuclèic
RT	Reverse transcription
siRNA	small interference RNA
T	Timidina

TFO	Triplex forming oligonucleotids
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Uridina
UGT	UDP-glucuronosil transferasa
UMP	Uridina monofosfat
UTR	Untranslated region
XRE	Xenobiotic response element

PRESENTACIÓ

El treball presentat en aquesta memòria es centra en l'estudi dels mecanismes pels quals el quimioteràpic metotrexat (MTX) desenvolupa resistència en cèl·lules canceroses. Dins d'aquest objectiu es creen dues línies d'estudi: i) trobar nous mecanismes d'inhibició de la dihidrofolat reductasa (DHFR), principal causant de la resistència al MTX, i ii) trobar nous gens que puguin estar implicats en aquest procés de resistència.

Anteriorment, en el nostre grup d'investigació s'havien estudiat els mecanismes pels quals les cèl·lules esdevenen resistents al MTX en diferents tipus de càncers. Es van identificar diferents gens que estaven involucrats en el procés de resistència, com gens implicats en senyalització intracel·lular com la PKC α (Noé et al. 1995), en metabolisme com la subunitat II de la *citocrom-c oxidasa* (COX II) (Alemany et al. 2000), en el metabolisme de nucleòtids (IMPDH2 i IMPCH), en reparació del DNA (*topoisomerasa I*) i apoptosi (*survivina* i *vimentina*) (Peñuelas et al. 2005a; Penuelas et al. 2005b) així com en detoxificació com ara l'*aldo-ceto reductasa 1C1* (AKR1C1) (Selga et al. 2008).

En cèl·lules de càncer de còlon HT29 resistents al MTX es va observar una sobreexpressió de l'AKR1C1, que estava implicada en cert grau en el metabolisme del MTX (Selga et al. 2008). Així mateix, es va trobar també en aquestes cèl·lules que els gens *caveolina-1* (CAV1), *E-Caderina*, PKC α i *enolasa-2* (ENO2) també estaven involucrats en el procés de resistència al MTX (Selga et al. 2008).

Analitzant altres tipus de càncers, es va observar que les dues línies cel·lulars de càncer de còlon HT29 i CaCo2 resistents al MTX compartien la sobreexpressió del *Dikkopf homolog-1* (DKK1); i que les cèl·lules de càncer de pàncrees, leucèmia i osteosarcoma, sobreexpressaven l'*eukaryotic translation elongation factor-1 alpha-1* (EEF1A1). Ambdós gens, al ser inhibits feien les cèl·lules més sensibles al MTX (Selga et al. 2009).

En el present estudi, hem analitzat la resistència al MTX en cèl·lules de càncer de mama. S'han realitzat microarrays d'expressió amb dues línies cel·lulars sensibles i resistents al MTX, els quals han originat com a únic gen en comú entre les cèl·lules resistents d'ambdues línies la família de les UDP-glucuronosil transferases (UGT1A). Hem estudiat aquesta família de gens, i s'ha identificat la UGT1A6 com principal responsable de la sobreexpressió de les UGTs en les cèl·lules resistents. En aquest treball

s'ha analitzat la implicació de la UGT1A6 en la resistència al MTX. També hem analitzat la inducció transcripcional del MTX sobre la UGT1A6, així com els factors transcripcionals involucrats en aquest procés. A més, s'han estudiat les repercussions terapèutiques que pot tenir la sobreexpressió de la UGT1A6 quan es dona MTX en combinació amb altres fàrmacs glucuronidables.

Dins de la recerca de nous mètodes per inhibir la DHFR diferents als quimioteràpics clàssics com el MTX, trobem els basats en teràpia gènica. En treballs anteriors del nostre grup s'havien desenvolupat diversos tipus de molècules per disminuir l'expressió de la *dhfr*, tal com oligonucleòtids antisentit (aODNs) (Rodríguez et al. 2002), siRNAs i Triplex forming oligonucleotides (TFOs).

A partir dels TFOs es van fer les primeres aproximacions als enllaços Hoogsteen. Anteriorment, al nostre grup s'havien dissenyat TFOs contra el gen *dhfr* de hamster, i es va determinar que els més efectius en inhibir la transcripció eren els dirigits contra el promotor del gen.

Tot seguint la línia dels TFOs, es van dissenyar els hairpins antiparal·lels de polipurines (PPRHs) destinats a unir-se a regions de polipirimidines presents a la doble cadena del DNA. Aquestes estructures consisteixen en dos dominis homopurina units entre sí per un bucle de timidines. Es va estudiar la capacitat dels hairpins de lligar-se *in vitro* tant a una cadena simple com a una cadena doble de DNA de forma específica i estable. S'observà que els hairpins antiparal·lels de purines eren capaços d'unir-se als àcids nucleics inclús a concentracions fisiològiques de cations divalents. Així mateix, es va analitzar l'efecte que tenia en la unió del hairpin una interrupció d'una guanina a la cadena de polipirimidines del DNA, trobant-se que la millor base per posar al hairpin era una adenina (Coma et al. 2005).

En aquest treball hem desenvolupat Template-PPRHs i Coding-PPRHs, hairpins destinats a unir-se a la cadena motlle o codificant del DNA i mRNA, respectivament. Hem estudiat la capacitat citotòxica que tenen els PPRHs en cèl·lules de càncer de mama utilitzant com a model el gen *dhfr* humà, així com el mecanisme d'acció pel qual aquestes molècules inhibeixen la DHFR. També hem analitzat la capacitat *in vitro* dels hairpins d'unir-se a la seva seqüència diana i la influència que té la presència

d'interrupcions de purines a la cadena de polipirimidines i la forma de minimitzar els seus efectes. Així mateix, hem estudiat l'estabilitat d'aquestes molècules, la seva especificitat i l'activació de la resposta immune. S'ha analitzat l'aplicació terapèutica a partir de la utilització de PPRHs contra la *dhfr* en cèl·lules de càncer de mama resistents al MTX, així com el disseny de diferents PPRHs dirigits contra gens amb importància terapèutica en càncer.

INTRODUCCIÓ

1.1-Càncer

El càncer és un conjunt de malalties que es caracteritza per una proliferació descontrolada i aberrant de les cèl·lules. Degut a mutacions o desregulacions en gens implicats en processos cel·lulars, es trenca l'equilibri homeostàtic entre creixement i mort cel·lular. El càncer és la segona causa de mort en humans, per darrere de les malalties cardiovasculars.

Una característica de les cèl·lules canceroses és la seva invasivitat. Aquestes cèl·lules no presenten inhibició del creixement per contacte amb les cèl·lules veïnes, provocant el creixement dels tumors. Una de les conseqüències d'aquest creixement incontrolat pot ser el mal funcionament dels òrgans degut a la compressió que exerceix el creixement del tumor sobre aquests. Aquesta invasivitat també està compresa com la capacitat de migració de les cèl·lules tumorals. Les cèl·lules canceroses són capaces de deslligar-se de la matriu extracel·lular i anar al torrent sanguini o la limfa, per on es distribuïran a altres parts del cos. La presència de determinats sucres a les membranes de les cèl·lules endotelials, els faran unir-se a aquestes i migrar cap als teixits, i així podran causar un nou tumor en una zona de l'organisme diferent a la del tumor inicial (Perez-Garay et al. 2010). Aquest procés es coneix com a metàstasi.

Una altra característica de les cèl·lules tumorals és l'angiogènesi. Degut al ràpid creixement dels tumors, les cèl·lules canceroses necessiten d'un gran aport d'energia, i a la mateixa vegada, aquest creixement fa que les zones interiors del tumor es quedin sense irrigació. Les cèl·lules tumorals tenen la capacitat de crear nous vasos sanguinis que irriguin el tumor i li aportin tots els nutrients i oxigen necessaris a partir de la secreció del factor de creixement endotelial vascular (VEGF) (Ma et al.). Així mateix, la presència d'aquests vasos facilita el desenvolupament de metàstasi.

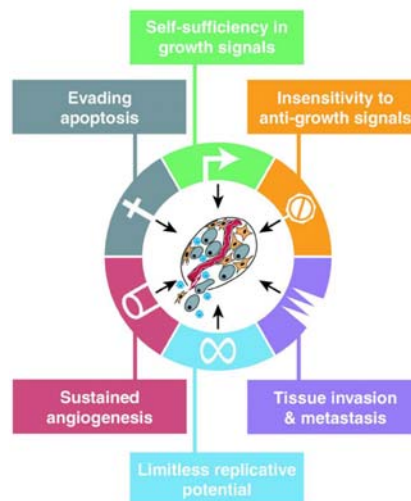
Les cèl·lules canceroses són cèl·lules diferents a les del teixit en que es desenvolupa el càncer, però no són reconegudes pel sistema immune com cèl·lules estranyes, degut a tot un sistema d'eliminació de receptors i marcadors de membrana, que fa que siguin invisibles pel sistema immune (Zitvogel et al. 2006).

Així mateix, la principal característica que permet a aquestes cèl·lules anar-se dividint i crear tumors és el procés de desdiferenciació i immortalització que sofreixen, es fan

insensibles a senyals inhibidors del creixement i fabriquen els seus propis factors de creixement (Hanahan et al. 2000). A més, alteracions en els processos d'apoptosi en aquestes cèl·lules contribueixen al desenvolupament de tumors, degut a que es prolonga de forma anormal la vida de les cèl·lules amb acumulació de mutacions (Thompson 1995). Hi ha estudis que proposen que no és que totes les cèl·lules canceroses siguin immortals, sinó que dins del tumor hi ha un determinat nombre de cèl·lules mare que van generant cèl·lules tumorals (Pardal et al. 2003). Així mateix, es produeixen una sèrie de canvis d'expressió en oncògens i supressors de tumors, com la telomerasa que fa que les cèl·lules no morin per escurçament dels telòmers, i permet que aquestes cèl·lules es puguin dividir indefinidament (Shay et al. 1997).

L'estatus de cèl·lula cancerosa és el resultat de l'acumulació d'una sèrie de mutacions, no d'un únic canvi.

Característiques de les cèl·lules canceroses
(Hanahan and Weinberg 2000)



1.1.1- Càncer de mama

El càncer de mama és la primera causa de mort en dones de 45-55 anys. Cada any es diagnostiquen a Espanya uns 15.000 nous casos, i una de cada 16-18 espanyoles patirà un càncer de mama. La taxa de curació és d'un 60%, i la taxa de recaigudes és d'un 30% en cas de pacients sense afectació ganglionar, mentre que si hi ha afectació ganglionar augmenta la probabilitat, arribant a un 90% si hi ha una afectació de més de 10 ganglis (www.elmundosalud.com). També hi ha càncer de mama en homes, però la seva incidència és molt menor, d'un 1%.

La majoria de tumors mamaris es tracten de tumors benignes. Els tumors malignes, es classifiquen segons el lloc de la mama on hi hagi el creixement i l'estadia.

Els tipus de càncer de mama:

- Carcinoma ductal *in situ*: és un càncer molt localitzat. La taxa de curació ronda el 100%.
- Carcinoma ductal infiltrant o invasiu: s'inicia en el conducte mamari però passa al teixit adipós de la mama i es pot estendre més. Representa el 80% dels casos.
- Carcinoma lobular *in situ*: s'origina als lòbuls mamaris. No és un veritable càncer però augmenta la probabilitat de desenvolupar-ne un en el futur.
- Carcinoma lobular infiltrant o invasiu: té tendència a estendre's. Són entre el 10% i el 15% dels tumors de mama.
- Carcinoma inflamatori: només representa un 1% del total dels tumors cancerosos de mama. És agressiu i de ràpid creixement.

Hi ha dos gens involucrats en el càncer de mama hereditari, BRCA1 i BRCA2, que representen cadascun un 20% dels càncers hereditaris. Quan aquests es troben mutats, augmenten les probabilitats de patir un càncer de mama. Així mateix, la mutació de CHEK2 i p53, causa un 5% i 1% dels càncers de mama hereditaris, respectivament (Figuerola et al. 2009). Altres mutacions associades a càncer de mama hereditari són les que afecten a PTEN, ATM, NBS1, RAD50, BRIP, i PALB2 (Walsh et al. 2007).

Les hormones també tenen un paper important en el risc a patir càncer de mama. Quan més temps s'estigui en contacte amb estrògens, existeix més probabilitat de patir càncer de mama. Això fa que la menstruació abans dels 12 anys i la menopàusia després dels 55 augmenti el risc a patir aquest tipus de càncer (Cancer. 2001). La utilització d'anticonceptius ha comportat una gran controvèrsia, i encara que els últims estudis apunten a que no tindrien un efecte perjudicial en la incidència de càncer de mama, no s'ha arribat a una conclusió definitiva respecte aquest tema. En canvi, sí que es sap del perjudici de la teràpia hormonal substitutiva durant la menopàusia (Beral 2003).

1.2- DHFR-MTX

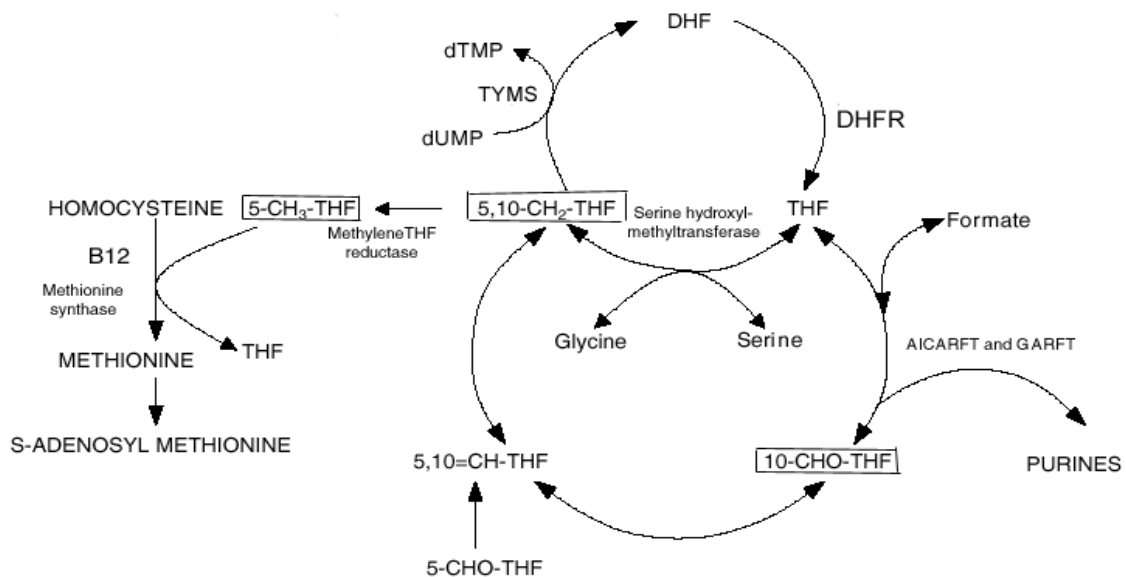
Entre les diferents estratègies existents per tractar el càncer, trobem la basada en la inhibició de gens essencials per la cèl·lula, com seria el cas de la dihidrofolat reductasa.

1.2.1- DHFR

La dihidrofolat reductasa és un enzim que participa en la biosíntesis *de novo* de glicina, hipoxantina i timidilat. Aquest enzim està implicat en la síntesi de nucleòtids, per tant la seva inhibició impedeix la formació de DNA, RNA i proteïnes, i la conseqüent proliferació cel·lular.

El gen *dhfr* es troba localitzada al cromosoma 5, i està format per 6 exons i 5 introns, sent l'intró 3 el més llarg, d'unes 11 Kb (Emine Abalia 2008).

La DHFR redueix el 7,8-dihidrofolat (DHF) a 5,6,7,8-tetrahidrofolat (THF) utilitzant NADPH com a donador d'electrons. El THF serà utilitzat com transportador i donador de grups monocarbonats (metil, formil, metilen). El THF passa a metilen-THF i juntament amb deoxiuridina monofosfat, formen la timidina monofosfat.

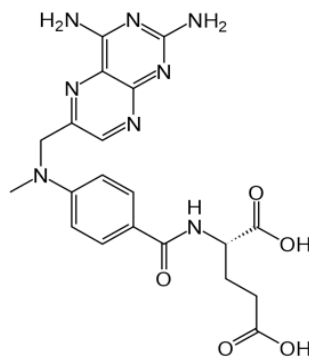


El DHF i les seves formes poliglutaminades són els principals substrats de la DHFR.

L'activitat DHFR es troba incrementada en la fase S del cicle cel·lular, la fase de síntesi del DNA, degut tant a un augment transcripcional com a una estabilització del mRNA en aquesta fase del cicle cel·lular (Noé et al. 1997; Noé et al. 1999).

1.2.2- MTX

El metotrexat (àcid 4-amino-10-metil-pteròilglutàmic) és un quimioteràpic del tipus dels antimetabòlits, un antifolat. És un inhibidor competitiu i reversible de la DHFR, i s'uneix amb més afinitat que el substrat natural (DHF), interferint en la regeneració del THF. Aquesta inhibició de la DHFR bloqueja la síntesi *de novo* de purines i polipirimidines, i per tant impedeix la divisió cel·lular. El MTX no només inhibeix la DHFR, sinó també altres enzims depenents de folats com són la timidilat sintasa i l'aminoimidazol carboxamida transformilasa (Dervieux et al. 2004). D'igual manera, el trimetoprim i la pirimetamina també són fàrmacs antifolat (Sasso et al. 1994).



Molècula de MTX

El MTX és un fàrmac hidròfil, que s'elimina en un 70% per orina, i la resta per la bilis, amb una petita proporció de formació de 7-hidroximetotrexat. Es tracta d'una molècula aniónica, així que al ronyó surt per filtració, però al fetge surt per transport actiu per *oat1-3*, *oatp2 i 4*, *abcc2-4* i *abcg2* (Shibayama et al. 2006; Hardwick et al. 2007).

Degut a la inhibició en la divisió cel·lular produïda pel MTX, s'utilitza en malalties que cursen amb proliferació cel·lular com el càncer (leucèmia limfoblàstica aguda, limfoma no-Hodgkin, osteosarcoma, coriocarcinoma, càncer d'ovari, càncer de mama, de cap i coll), l'artritis reumatoide, malaltia intestinal inflamatòria, prevenció del rebuig de trasplant vs hoste, avortaments i psoriasi (Banerjee et al. 1995; Schmiegelow 2009). Es sol utilitzar a dosis de 25-100 mg/m², que equival a 10⁻⁵-10⁻⁶M en plasma (Flórez et al. 1992).

1.2.3- Resistència al MTX

Un dels principals problemes del metotrexat i dels quimioteràpics en general, és l'aparició de resistències en cèl·lules canceroses i per tant la pèrdua d'activitat

terapèutica. Això fa que per poder mantenir l'efecte terapèutic s'hagin d'augmentar les dosis, però fins arribar al límit d'efectes secundaris tolerables.

Les principals causes de resistència al MTX segons Bertino són:

- Disminució de l'acumulació degut a alteracions en el transport tant d'entrada com d'expulsió
- Retenció disminuïda degut a la falta de formació del poliglutamats o a la seva hidròlisi
- Amplificació gènica de la *dhfr*
- Mutació en la DHFR que causa que el MTX s'uneixi amb menys afinitat
- Metabolisme i degradació del MTX

L'entrada del MTX dins de la cèl·lula té lloc principalment pel transportador actiu *reduced folate carrier 1* (RFC1 o SLC19A1) (Gorlick et al. 1996). Simultàniament hi ha un eflux de MTX realitzat pels transportadors ABC, específicament pels ABCC1-4 i ABCG2 (Swerts et al. 2006).

Dins de la cèl·lula, tant el MTX com els folats naturals es lliguen a poliglutamats, formant llargues cadenes de 2 a 5 glutamats, de manera que es produeix una sortida del MTX de la cèl·lula molt més lenta; a més, aquests derivats poliglutamats tenen la mateixa afinitat per la DHFR. S'ha observat que leucèmies amb derivats poliglutamats més llargs, tenen millor pronòstic que aquelles amb derivats més curts (Banerjee et al. 1995). El contingut intracel·lular de MTX està controlat per un balanç entre la formació dels poliglutamats per part de la *folilpoliglutamats sintetasa* (FPGS) i la destrucció d'aquestes cadenes de glutamat per part de la *glutamil hidrolasa* (GH) (Bertino et al. 1996).

La resistència deguda a amplificació gènica de la *dhfr*, és deguda a que es necessita una major concentració de MTX per inhibir l'activitat de la DHFR. S'ha observat que aquelles cèl·lules que tenen el gen supressor de tumors p53 mutat tenen més predisposició a amplificar el gen *dhfr* (Banerjee et al. 1995).

Un altre possible causa de la resistència és la pèrdua de la proteïna retinoblastoma (pRb) ja que aquestes cèl·lules presenten nivells superiors d'enzims relacionats amb la

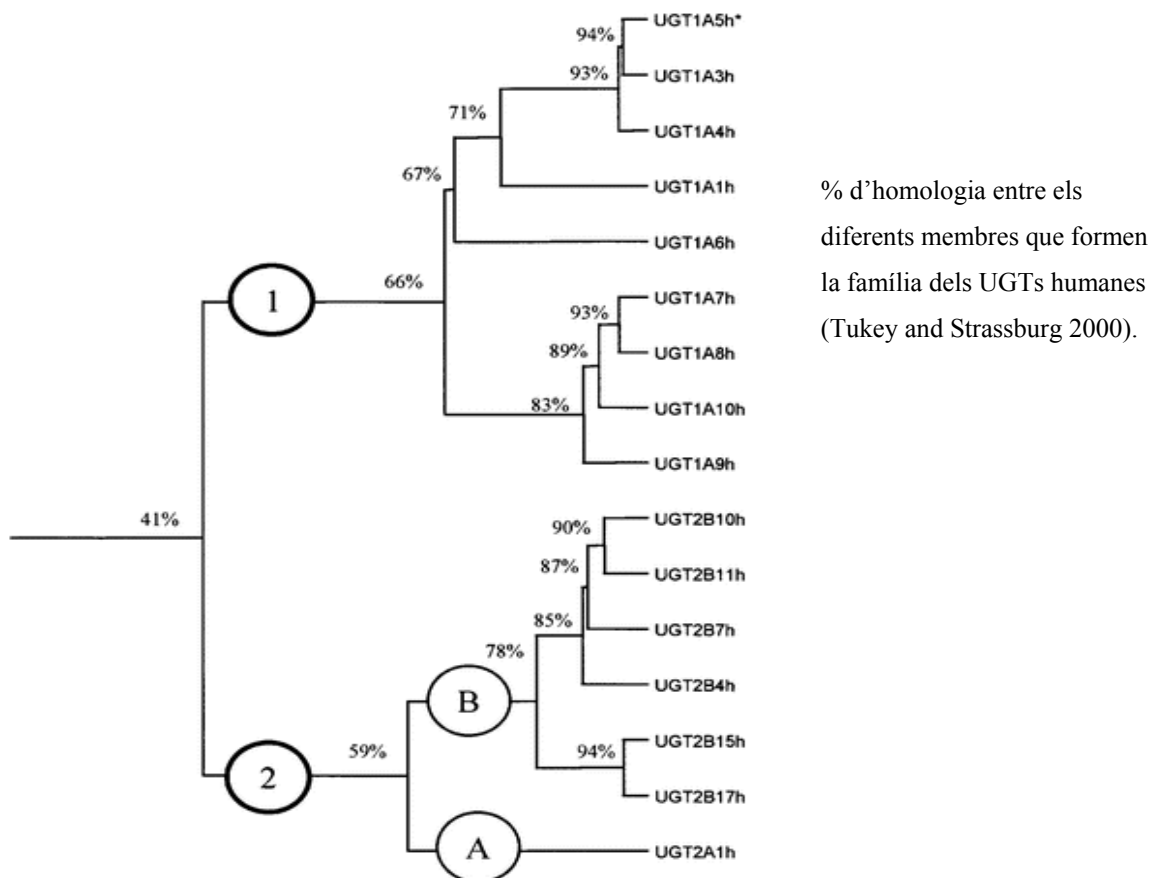
proliferació com a conseqüència de majors nivells de E2F lliure, un factor de transcripció que normalment es troba inhibit per l'hipofosforilació duta a terme per pRb (Banerjee et al. 1995). Aquesta pèrdua de pRb faria augmentar els nivells de transcripció de la DHFR.

Així mateix s'ha vist que la ciclina D1 (involucrada en cicle cel·lular), al ser sobreexpressada en cèl·lules de fibrosarcoma produeix una disminució en la sensibilitat al MTX (Banerjee et al. 1995).

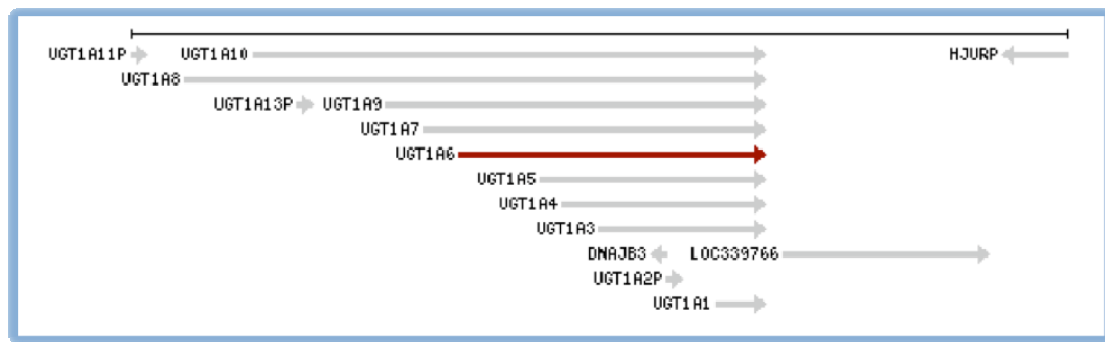
1.3- UGTs

Les UDP-glucuronosil-transferases són una família d'enzims involucrats en el metabolisme de fase II. La seva funció més destacada és al fetge, on participen en el metabolisme de nutrients, xenobiòtics i productes cel·lulars, però també es troben presents en altres teixits.

La funció de les UGTs en el metabolisme de fase II consisteix en fer les molècules liposolubles més hidrosolubles, de forma que puguin ser eliminades per orina i bilis (Dutton 1980). Les UGTs afegeixen un grup glicosil provinent de l'àcid UDP-glucurònic (UDPA) mitjançant un enllaç covalent a una molècula diana. Els glucuroníds es formen a través d'un grup hidroxil (alcohòlic, fenòlic), carboxil, sulfuril, carbonil, o amino (primari, secundari, o terciari) (Tukey et al. 2000). Aquesta diversitat d'especificitat de substrat permet l'acceptació de milers de molècules per ser glucuronidades. Encara que hi ha exemples de glucuroníds tenint activitat biològica, com el poder analgèsic de la morfina-6-glucurònic, aquesta ruta metabòlica és principalment catabòlica i per tant de detoxificació (Tukey and Strassburg 2000).



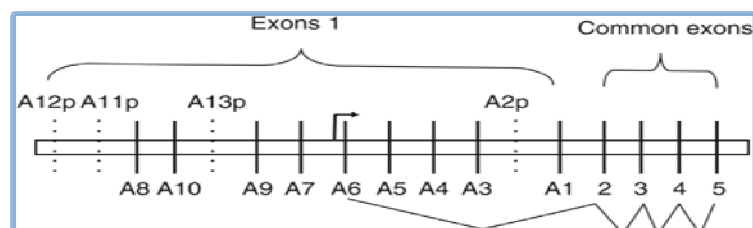
La família de les UGTs està subdividida en 2 famílies, UGT1 i UGT2, que comparteixen menys d'un 50% d'homologia. Dins de la família UGT1, es troben 13 isoformes, encara que només 9 es transcriuen (UGT1A1, UGT1A3-10) (Gong et al. 2001). A la seva vegada, els membres de la família UGT1A es divideixen en dos clústers, en el que les UGT1A7-10 tenen més d'un 70% d'homologia, i el clúster UGT1A1-6 un 60%. Totes aquestes isoformes es troben localitzades en el mateix *locus* del cromosoma 2 (Tukey and Strassburg 2000).



NCBI, gene UGT1A6

Les UGT1As estan formades per 6 exons, sent els exons del 2 al 5 comuns entre totes elles, i on es troba l'activitat catalítica. El primer exó és característic de cada isoforma, i és el que confereix l'especificitat de substrat (Dutton 1980). Els diferents exons 1 de cada isoforma es troben localitzats en tàndem un darrere de l'altre al *locus* de la UGT1A. Cada exó 1 està precedit pel seu propi promotor, i el fet de que estiguin en tàndem fa que a vegades el promotor d'una isoforma coincideixi amb el final de l'exó 1 d'altre. La regió 3' de cada exó 1 conté una seqüència consensus d'empalmament 5', en canvi no es troba cap seqüència d'empalmament 3' fins al començament de l'exó 2 (Tukey and Strassburg 2000). D'aquesta forma, si es vol transcriure per exemple la UGT1A7, els exons 1 de les UGT1A6-1 també es transcriuran però seran considerats com a un intró i seran eliminats en el procés d'empalmament. Aquesta estructura gènica característica fa que les UGT1As tinguin una gran homologia de seqüència, i per tant que sigui difícil diferenciar una de l'altre.

S. Nagar and R. P. Rimmel.
Oncogene (2006) 25, 1659–1672



Les UGT1As són enzims que es troben localitzats a la membrana del reticle endoplasmàtic (Tukey and Strassburg 2000).

Aquests enzims tenen una gran repercussió farmacològica, ja que estan implicats en el metabolisme de molts xenobiòtics com l'irinotecà, el tamoxifè, el topotecan, la doxorubicina, l'aspirina, la morfina, el cloramfenicol... (Nagar et al. 2006; Buckley et al. 2007). A més, aquests enzims tenen una gran inducibilitat, hi ha una gran quantitat de xenobiòtics que fan variar la seva expressió, i per tant el metabolisme d'un nombrós grup de fàrmacs (Buckley et al. 2009).

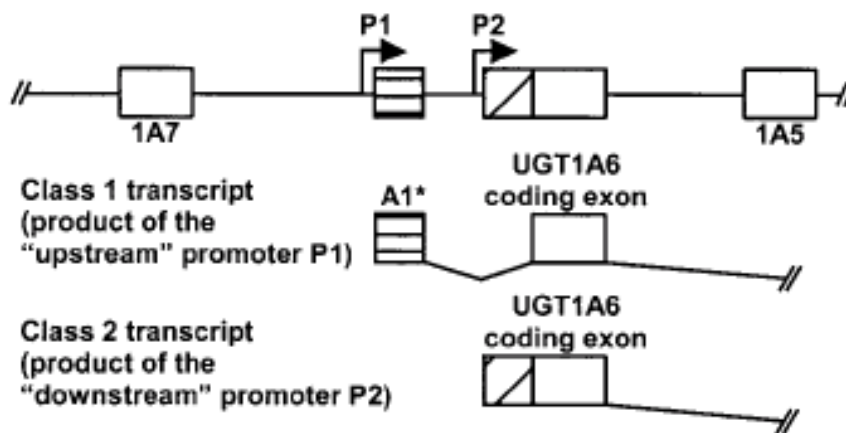
Les UGTs estan implicades en una sèrie de malalties com són hiperbilirubinèmia, càncer i autoimmunitat. La hiperbilirubinèmia no-conjugada hereditària és una malaltia on hi ha un augment en els nivells de bilirubina degut a una mutació que inactiva la única UGT capaç de metabolitzar la bilirubina, l'UGT1A1 (Bissel 1986). La bilirubina és el producte de la metabolització del grup hemo de l'hemoglobina i d'altres enzims que contenen aquest grup. La bilirubina és altament hidrofòbica i per tant es troba conjugada a albúmina o glucuronidada per la seva eliminació. Quan aquesta no es pot eliminar, augmenten els seus nivells en sang i pot passar la barrera hematoencefàlica i causar mort neuronal.

Les UGTs també es troben implicades en processos cancerígens, ja que aquestes són responsables del metabolisme de molts xenobiòtics, alguns dels quals amb poder carcinogènic. Principalment, alteracions en aquest mecanisme de detoxificació està involucrat en tumors d'esòfag, estómac, bufeta, fetge, colon, pulmó i pleura (Bock 1991). A més, degut a la capacitat de les UGTs de metabolitzar hormones esteroïdes, també estan en estudi els possibles efectes de la desregulació de les UGTs en càncers sensibles a hormones com són els de pròstata, ovari i mama (Belanger et al. 1998).

També s'ha identificat la implicació de les UGTs en l'hepatitis autoimmune, i en l'hepatitis viral C i D. En aquestes, es creen autoanticossos contra els enzims metabolitzadors del fetge, havent-hi també autoanticossos contra les UGT1As (Philipp et al. 1994).

1.3.1- UGT1A6

L'UGT1A6 és un membre de la família UGT1A que glucuronida fenols planars i arilamines (Bock et al. 2005). S'expressa principalment al fetge, però també es pot trobar a altres teixits. Aquesta isoforma a la seva vegada es troba dividida en dos tipus, que es diferencien en l'exó 1. El tipus 1 conté el 5'-UTR i l'exó 1 complet, mentre que el tipus 2 sofreix empalmament alternatiu, eliminant-se part del 5'-UTR i exó 1. Es creu que la UGT1A6 tipus 2 és una isoforma que es transcriu però que no és funcional perquè li falta el domini d'unió a l'aglicó (Krishnaswamy et al. 2005).



Promotor de la UGT1A6 de rata, que difereix lleugerament del d'humà (Auyeung et al. 2001).

L'UGT1A6 està implicada al metabolisme de diversos xenobiòtics i substàncies endògenes, com l'aspirina, el paracetamol, naproxè, la serotonina, i carcinògens (Bock and Kohle 2005; Hubner et al. 2006). Per exemple, degut a l'ampli coneixement de la farmacocinètica del paracetamol, la seva glucuronidació ha estat utilitzada com a test per estudiar la variabilitat interindividual en glucuronidació hepàtica, la capacitat dels pacients de glucuronidar sota la influència d'agents inductors (Bock et al. 1987).

D'aquests tipus de test es va poder corroborar que l'UGT1A6 és un enzim molt regulable i induïble per fàrmacs, com la rifampicina i fenitoïna. Entre els diferents factors de transcripció que regulen la seva expressió es troben el *receptor pregnan X* (PXR), el *receptor constitutiu d'androstans* (CAR), el *receptor aril-hidrocarboni* (AhR), i el factor de transcripció Nrf2, que respon a estres oxidatiu /electròfil (Munzel et al. 1998; Bock and Kohle 2005).

S'ha observat que l'UGT1A6 té la capacitat de dimeritzar en la membrana del reticle endoplasmàtic, afectant a la seva especificitat de substrat, com és en el cas de glucuronidació del 1-naftol (Uchaipichat et al. 2004).

1.4- Teràpia gènica

La teràpia gènica consisteix en la introducció de material genètic (oligonucleòtids, plasmidis, ...) a les cèl·lules. La seva finalitat és restablir la correcta expressió dels gens per guarir malalties ja sigui:

- Inhibint gens que es trobin sobreexpressats
- Expressant gens que es trobin infraexpressats
- Reparant o suplantant gens que es trobin mutats

Aquesta es pot realitzar en:

- Cèl·lules somàtiques: els canvis realitzats són a nivell d'individu, no heretables, i normalment a nivell d'un determinat teixit
- Cèl·lules germinals: aquests canvis seran heretables i a nivell de tots els teixits del nou individu

La modulació de l'expressió gènica a nivell d'àcids nucleics tindria que ser més efectiva que la inhibició de la proteïna corresponent, degut a que en la transcripció es generen un nombre notable de mRNAs de cada gen (10^2 - 10^4), i cadascun d'aquests mRNAs en la traducció donarà lloc a un gran nombre de molècules de la proteïna corresponent (10^4 - 10^6) (Peyman et al. 1995). Segons on actuïn les molècules utilitzades tindrem:

- Oligonucleòtids inhibidors de la transcripció: s'uneixen al DNA impedit la seva transcripció, com és el cas dels TFOs
- Oligonucleòtids inhibidors de la traducció: s'uneixen al mRNA i el degraden o impedeixen la seva traducció. Trobem els aODNs, siRNAs, microRNAs, LNAs i ribozims
- Oligonucleòtids inhibidors de proteïnes: aquests oligonucleòtids són capaços d'unir-se a proteïnes i inhibir-les. En aquest grup es troben els aptàmers

La teràpia gènica es pot classificar segons el tipus de vehicle utilitzat per introduir el DNA:

- Viral: consisteix en la utilització de vectors virals per introduir material genètic en les cèl·lules. S'aprofita la capacitat natural dels virus de transportar material genètic i transduïr les cèl·lules. Aquest tipus de vectors es "desarmen", es a dir, se'ls hi treuen tots els gens que no siguin indispensables per la transducció, incloent tots els gens causants de malalties. Aquests vectors donen la possibilitat d'integrar el material genètic

al DNA genòmic, de forma que siguin canvis permanents. Però aquesta integració té el perill d'inserció en zones del genoma no desitjables que causin mutacions o activació d'oncògens o inhibició de supressors de tumors.

- No viral:

- Liposomes: es basa en la utilització de vesícules liposomals per la formació de lipoplexes. Tenen l'habilitat de protegir els àcids nucleics de la degradació durant la transfecció. Hi ha tres tipus de lípids: aniònics, neutres i catiònics. Els dos primers no s'utilitzen massa degut a la seva toxicitat i incompatibilitat amb fluids corporals. Els catiònics gràcies a la seva càrrega positiva faciliten l'encapsulament dels àcids nucleics, i la interacció amb la membrana cel·lular, però llavors presenten el problema de l'alliberació en el citoplasma. S'han desenvolupat lípids capaços de desestabilitzar la membrana endosomal i ajudar a l'alliberament dels àcids nucleics. Hi ha hagut un gran desenvolupament en el camp dels liposomes, trobant-se una gran varietat de modificacions químiques, òptimes per la transfecció de cada tipus de molècula d'una forma molt eficaç. Aquest tipus de transfeccions difícilment causen integració del material genètic, i presenten una major seguretat.

- Poliplexes: són complexos formats per DNA i polímers. Majoritàriament es tracta de polímers catiònics de forma que uneixen els àcids nucleics per interaccions iòniques. La principal diferència entre els poliplexes i els lipoplexes és la gran dificultat dels poliplexes d'alliberar el DNA al citoplasma.

- "Naked" DNA: és la introducció de DNA sense cap molècula que l'acompanyi. L'expressió gènica que s'obté per aquest mètode és inferior a la de tècniques com els lipoplexes. Hi ha diferents mètodes, com són l'electroporació, el shut-gun (es dispara el DNA amb boletes d'or), el fosfat càlcic, o les injeccions de gran volum durant un espai de temps molt curt (injecció hidrodinàmica) (Aliño et al. 2010).

- Dendrímers: els dendrímers són macromolècules molt ramificades amb forma esfèrica. Aquestes poden tenir càrrega positiva, cosa que els permet associar-se amb els àcids nucleics. El complexe dendrímer-àcid nucleic entra a la cèl·lula per endocitosi. Els dendrímers ofereixen construccions robustes.

La teràpia gènica és especialment efectiva per malalties monogèniques, en les que només hi ha un gen implicat, com seria el cas de la fibrosi cística o la deficiència en adenosina desaminasa.

1.4.1- Utilització d'oligonucleòtids en teràpia gènica

La repressió de l'expressió genètica constitueix una poderosa eina terapèutica ja que permet la inhibició de la síntesi de proteïnes involucrades en processos patològics.

Entre les diferents molècules que poden inhibir l'expressió gènica trobem aODNs, siRNAs, LNAs, TFOs i els PPRHs, basant-se aquests dos últims en la utilització d'enllaços Hoogsteen.

1.4.1.1- Enllaços Hoogsteen

Es tracta d'un tipus d'enllaç entre àcids nucleics que permet la formació de triples hèlix, en les que una cadena de DNA pot simultàniament fer enllaços Watson-Crick amb una cadena, alhora que estableix enllaços Hoogsteen amb altre. Són enllaços per pont d'hidrogen al solc major de la doble cadena de DNA (Aviñó et al. 2003). L'habilitat d'aquest tipus d'enllaços de formar triples hèlix ha fet que siguin àmpliament estudiats degut a les seves possibles aplicacions biomèdiques i biotecnològiques.

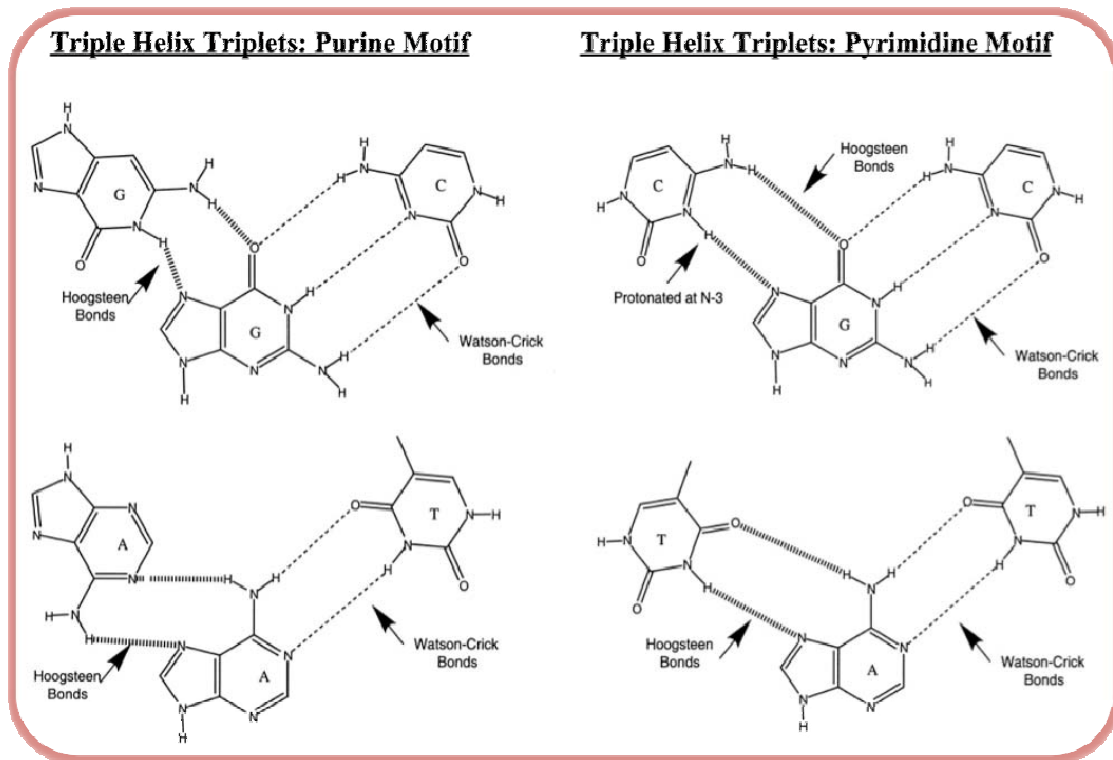
Hi ha principalment dos tipus de enllaços Hoogsteen:

- Paral·lels

En aquest cas es segueixen les mateixes normes que per Watson-Crick, és a dir, una T s'uneix a una A, i una C a una G \rightarrow (T#A·T) i (C#G·C), on les # corresponen a enllaços tipus Hoogsteen, i · a enllaços Watson-Crick. L'orientació entre les dues cadenes que fan enllaços Hoogsteen és paral·lela. El principal problema que presenten aquest tipus d'enllaç és que necessiten pH àcid per formar-se, ja que la citosina ha d'estar protonada al N3 (Husler et al. 1995).

- Antiparal·lels

En aquest tipus d'enllaços una purina s'uneix a un altre purina igual que ella mateixa \rightarrow (A#A·T) i (G#G·C). En aquest cas, l'orientació entre les dues cadenes que estableixen enllaços Hoogsteen és antiparal·lela.



(Knauert et al. 2001)

Els enllaços Hoogsteen es poden trobar de forma natural a les cèl·lules, com és el cas dels G-quàdruplex. En els telòmers d'organismes eucariotes, en regions riques en guanines, hi ha formació espontània d'aquest tipus d'enllaços.

1.4.1.2- Triplex Forming Oligonucleotides (TFOs)

La capacitat dels àcids nucleics per formar tríplex va ser descoberta per Felsenfeld en 1957. Va ser, però, al 1968 quan es va descriure per primera vegada la utilització de tríplex de forma específica de seqüència per inhibir la transcripció (Morgan et al. 1968).

Els TFOs són molècules de DNA de cadena senzilla d'uns 10-30 nt de llargada. Aquests s'uneixen de forma específica de seqüència a la seva diana mitjançant enllaços Hoogsteen. Encara que els TFOs siguin de purines o de polipirimidines, la seva seqüència diana sempre és de purines (Knauert and Glazer 2001). Per aquesta raó l'inconvenient que presenten aquestes molècules és que estan limitades a la presència en el DNA o RNA de regions homopurines. S'han realitzat diverses modificacions en la composició de les bases o enllaços per tal de fer els TFOs més estables o específics.

Els TFOs han estat utilitzats per disminuir l'expressió gènica, mutagènesi i recombinació. Aquests inhibeixen la transcripció degut a que impedeixen la unió de factors de transcripció al promotor, o perquè impedeixen que pugui passar la RNA polimerasa (Praseuth et al. 1999). Hi ha TFOs que han estat modificats per conjugació a fàrmacs com seria el cas de psoralens, per ser utilitzats com a vehicle cap a una regió específica del DNA (Song et al. 2004).

1.4.1.3- PolyPurine Reverse Hoogsteen hairpins (PPRHs)

Els PPRHs es van inspirar en els TFOs i oligonucleòtids circulars, i van aparèixer per solucionar els problemes d'estabilitat i especificitat que presentaven els TFOs. Els hairpins presenten majors afinitats d'unió per a la seva diana i més resistència a nucleases que els TFOs. Així mateix permeten la funcionalització del "pont" que aquests tenen en la seva estructura (Aviñó et al. 2003).

Els hairpins consisteixen en dos cadenes de DNA unides per un pont, que formen una estructura de tipus pinça gràcies a enllaços Hoogsteen intramoleculars (Giovannangeli et al. 1991; Kandimalla 1995; Aviñó et al. 2001; Cubero et al. 2002). Aquestes dues cadenes poden ser de tipus paral·lel o antiparal·lel, encara que els hairpins antiparal·lels són més prometedors en el camp biomèdic ja que formen tríplex independentment del pH, en canvi els hairpins paral·lels necessiten d'un pH àcid (Faucon et al. 1996), però ara s'estan desenvolupant modificacions químiques de les citosines que fan aquests hairpins independents de pH. Un dels possibles problemes que podrien tenir els hairpins antiparal·lels seria la formació de G-quàdruplex degut a l'abundància de G. Tot hi així, la formació d'aquestes estructures no s'ha observat després d'anàlisis per T_m i mobilitat electroforètica a concentracions fisiològiques de potassi (Coma et al. 2005). Això pot ser degut a la dispersió de les G dins del hairpin. Així mateix, s'ha observat la capacitat dels hairpins d'unir-se al RNA i ssDNA encara que aquests adoptin estructures secundàries, unint-se amb més afinitat els hairpins antiparal·lels que els paral·lels (Nadal et al. 2005).

Els PPRHs són molècules de DNA formades per dos dominis homopurina units entre sí per un pont de 5 timidines (Giovannangeli et al. 1991; Kandimalla 1995; Aviñó et al. 2001; Aviñó et al. 2002; Cubero et al. 2002; Coma et al. 2005). Els dos dominis homopurina s'uneixen per enllaços intramoleculars Hoogsteen reversos, formant

l'estructura d'una pinça. Simultàniament, una de les cadenes polipurines pot formar enllaços Watson-Crick amb una cadena diana de polipirimidines, formant un tríplex. L'orientació entre les 3 cadenes que formen el tríplex és antiparal·lela.

Estructura hairpin

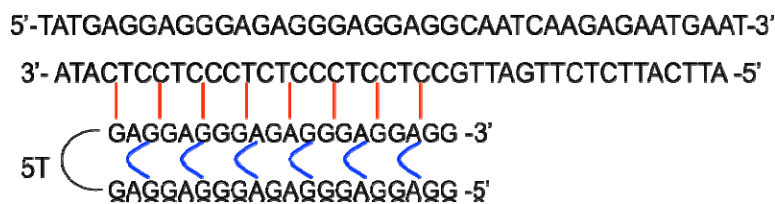


Aquestes molècules es sintetitzen com a cadenes simples de DNA, i elles mateixes adopten la conformació de hairpin. La regió homopurina és d'uns 20-35 nt, i preferentment sense interrupcions de pirimidines.

Es van dissenyar 2 tipus de PPRHs:

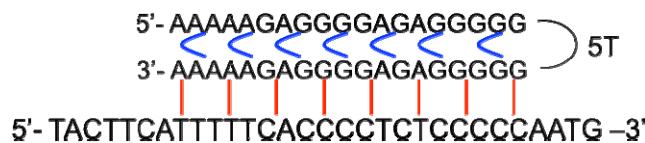
- Template

Aquests hairpins van dirigits contra la cadena motlle del DNA. S'uneixen a la seva diana de polipirimidines tot inhibint la transcripció.



- Coding

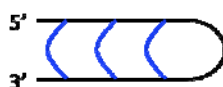
Van dirigits contra la cadena codificant del DNA, i per tant també contra el mRNA.



Dins dels 2 tipus de PPRHs es troben diferents estructures de PPRHs:

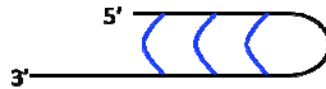
- Blunt

Les dos seqüències de purines tenen la mateixa llargada.



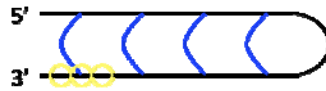
- Tailed

La cadena homopurina destinada a unir-se a la seqüència diana és més llarga.



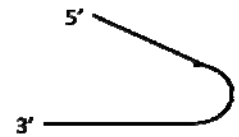
- Blunt-Tailed

Té les dues cadenes esteses, de la mateixa llargària



- No Hoogsteen

Té la seqüència d'unió a la seqüència diana, però no pot formar enllaços Hoogsteen intramoleculars. Ens serveixen per estudiar la importància dels enllaços Hoogsteen en l'activitat dels PPRHs.



- Watson-Crick

Es tracta d'un hairpin amb enllaços intramoleculars Watson-Crick, en comptes de Hoogsteen. No té capacitat per unir-se a la seqüència diana. Permet estudiar l'efecte que té la transfecció d'una estructura tipus hairpin a la cèl·lula.



- Scrambled

És un hairpin amb seqüència aleatòria que teòricament no té cap diana d'unió.

1.4.2- Gens diana amb aplicacions terapèutiques

Els següents gens van ser triats com a dianes terapèutiques pel disseny de hairpins degut a que són gens essencials per la viabilitat cel·lular o per la seva activitat anti-apoptòtica. Aquests gens en ser inhibits causarien mort cel·lular, i això permetria que fossin utilitzats per eliminar cèl·lules canceroses.

1.4.2.1- DHFR

La *dihidrofolat reductasa* és un gen implicat en la síntesi de glicina, hipoxantina i timidilat, per tant, està implicada en la síntesi de DNA. La seva inhibició causa arrest del cicle cel·lular i de la proliferació.

1.4.2.2- Survivina

Aquest gen també és conegut com a BIRC5. Es tracta d'un membre de la família de les proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP). La *survivina* inhibeix les caspases, per tant, la mort cel·lular. El seu mecanisme d'acció encara no es coneix detalladament, però podria estar implicada en la regulació del cicle cel·lular, concretament en la progressió a fase S durant la mitosi (Ambrosini et al. 1998); també podria estar regulada per p53 i per la via de Wnt, així com per la β -catenina (Li 2005).

L'expressió de la *survivina* és exclusiva del desenvolupament fetal i tumors (Sah et al. 2006), per tant és una bona diana antitumoral perquè no afectaria a la resta de cèl·lules. En cèl·lules canceroses, la seva expressió fa que les cèl·lules tinguin un fenotip més agressiu i que siguin més resistents a la quimioteràpia (Olie et al. 2000). Per tant, la seva inhibició faria les cèl·lules més sensibles a l'apoptosi.

1.4.2.3- Telomerasa

La *telomerasa* és una ribonucleoproteïna polimerasa, que té la funció de mantenir la llargada dels telòmers. Aquest enzim afegeix repeticions TTAGGG al final dels cromosomes eucariotes. D'aquesta forma, quan la cèl·lula es replica, com que no és capaç de replicar bé el final dels cromosomes, perd un fragment de telòmers en comptes d'un fragment d'un gen. La *telomerasa* consisteix en una transcriptasa reversa, que conté un tros de RNA que li serveix de motlle per a la síntesi de les repeticions de telòmers (Greider et al. 1985).

La *telomerasa* està implicada en el procés de senescència cel·lular i envelliment, ja que aquesta està expressada en cèl·lules somàtiques en el període postnatal, però després no, fent que es vagin escurçant els telòmers. La *telomerasa* també es troba àmpliament expressada en tumors, permetent que es vagin dividint i siguin immortals (Shay and Bacchetti 1997).

1.4.2.4- c-myc

Myc és una proteïna implicada en la progressió del cicle cel·lular, apoptosi i transformació cel·lular. Es tracta d'una fosfoproteïna que actua com a factor de transcripció d'una gran quantitat de gens com p21, BAX, FADD,... (Dang et al. 1999).

La mutació i sobreexpressió d'aquest gen fa que es desreguli l'expressió d'un nombrós grup de gens, sent alguns d'ells de proliferació cel·lular, i podent causar tumors (Soucek et al. 2008). Està implicat en un gran nombre de tumors, sobretot hematopoètics degut a la seva implicació en la homeostasi hematopoiètica (Nesbit et al. 1999).

1.4.2.5- Topoisomerasa I

És un enzim que controla la topologia del DNA. Quan el DNA s'ha de transcriure o replicar, la doble hebra del DNA es té que obrir, i llavors, aquesta obertura de la doble hèlix causaria una gran torsió en les zones flanquejants del DNA. Per tal d'evitar aquestes tensions la *topoisomerasa* s'uneix a una de les cadenes del DNA i fa un tall, permetent que giri lliurement per eliminar la torsió, i després la torna a lligar (Koster et al. 2010).

Aquest es tracta d'un enzim essencial, i ha estat diana de fàrmacs anticancerosos com és l'irinotecà o del seu metabolit actiu SN-38 (Rivory et al. 1996).

1.4.2.6- Mdm2

El *murine doble minute 2* és una fosfoproteïna inhibidora del gen supressor de tumors p53, el qual està implicat en cicle cel·lular, apoptosi, reparació de DNA, diferenciació, i senescència. Aquesta proteïna s'uneix a p53 i l'ubiquitinitza, causant la seva degradació (Uhrinova et al. 2005). També pot unir-se a p53 pels seu domini de factor de transcripció, i llavors es perd la seva activitat supressora de tumors.

La disminució en *mdm2* causa apoptosi depenent de p53 en molts tipus cel·lulars. Mdm2 també està implicada en cycle cel·lular i tumorogènesi degut a la seva interacció amb altres proteïnes com retinoblastoma i E2F1 (Stevens et al. 2008).

1.4.2.7- Bcl-2

B-cell linfoma-2 és una proteïna de la membrana externa mitocondrial. Bcl-2 va ser un dels primers reguladors de l'apoptosi descobert en mamífers. Aquesta proteïna bloqueja l'apoptosi al regular la permeabilitat mitocondrial, ja que inhibeix a Bax, responsable de la formació de porus a la mitocòndria i la sortida del citocrom-c, que causaria el desacoplament de la cadena respiratòria (Antonsson et al. 1997). Bcl-2 forma part d'una família de proteïnes implicades en apoptosi que es divideixen segons la seva funció pro o antiapoptòtica.

La translocació d'aquest gen està involucrada en l'aparició de determinats tumors com el limfoma fol·licular, càncer de mama i melanoma. Així mateix, s'ha observat que la seva sobreexpressió pot conferir un fenotip MDR, i per tant una menor resposta als quimoteràpics (Miyashita et al. 1993).

1.4.3- Gens de resposta immune a oligonucleòtids

Un dels principals problemes que té la introducció de gens exògens és l'activació del sistema immune, com és el cas dels plasmidis, o la coneguda resposta de l'interferó per RNA de doble cadena (Sledz et al. 2003). Aquesta activació del sistema immune davant d'àcids nucleics externs és un mecanisme de protecció de les cèl·lules enfront a la infecció per virus, bacteries i transposons. Entre els diferents gens encarregats de la resposta immune, hi ha una sèrie que regulen especialment la presència d'àcids nucleics forans en la cèl·lula.

1.4.3.1- DAI

El gen *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* és un sensor citosòlic de DNA. El DNA, ja sigui d'origen microbià o d'altres cèl·lules que hagin mort i no s'hagi eliminat, és un potent activador de la resposta immune innata. Aquest activa la resposta immune en entrar al citosol d'una cèl·lula (Takaoka et al. 2007).

DAI activa l'interferó de tipus I (IFN), de forma independent dels receptors de membrana Tool-like, que reconeixen DNA hipometilat en les illes CpG (Takaoka et al. 2007).

1.4.3.2- $INF\alpha$ i $INF\beta$

L'activació de la via de l'interferó tipus I (IFN) per part dels siRNAs en cèl·lules de mamífer és l'efecte secundari més important que tenen aquestes molècules (Sledz et al. 2003). En canvi, es creu que els short-hairpin RNAs (shRNAs) indueixen menys aquesta via, ja que no són detectats pels receptors de membrana de dsRNA. Tots els dsRNAs de més de 21 bp, són tallats per Dicer en molècules més petites amb 2 nt sobresortints a 3' (Vermeulen et al. 2005).

El dsRNA és considerat com a patogen i és detectat pels sensors d'immunitat cel·lular innata, els *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Aquests activen la via de l'interferó quan detecten dsRNA de més de 21 bp, ssRNA amb 5'-trifosfats (5'-ppp), l'anàleg de dsRNA àcid poliinosinic-policitidilic (poly I:C), i determinats dsDNA (Kenworthy et al. 2009).

1.4.3.3- OAS1

La 2'-5' *oligoadenilat sintetasa* és una proteïna antiviral intracel·lular. Aquest gen és un dels implicats en la resposta de l'interferó als siRNAs. Inhibeix la síntesi de proteïnes en induir la degradació general de RNA en una cèl·lula infectada per tal d'inhibir la replicació viral (Clemens et al. 1978).

L'IFN indueix l'expressió de OAS, però s'expressa com a proteïna latent que necessita de la presència de dsRNA per activar-se. L'activació de OAS1 catalitza la síntesi de 2'-5'-*linked oligoadenylates* (2-5As) a partir d'ATP. Aquestes molècules activen la RNasa L, que degradarà el sRNAs (Melchjorsen et al. 2009).

OBJECTIUS

Aquesta tesi doctoral es proposa com a objectiu disminuir la resistència al tractament amb metotrexat, ja sigui trobant gens que puguin estar implicats en la resistència a aquest fàrmac (I) o mitjançant nous sistemes per disminuir l'expressió gènica de la DHFR (II).

- I) A nivell de Genòmica Funcional en cèl·lules de càncer de mama resistents al MTX:
 - a. Ja que es va detectar la família de les UGT1As en una anàlisi preliminar de Genòmica Funcional per identificar gens diferencialment expressats en la resistència al MTX, es procedirà a la identificació del membre o membres d'aquesta família responsable de la sobreexpressió d'aquesta
 - b. Anàlisi de les causes de la sobreexpressió del membre o membres de la família de les UGT1As sobreexpressats: anàlisi de la possible amplificació gènica de UGT1A, així com estudi de la regulació transcripcional i dels possibles factors de transcripció responsables
 - c. Estudi del paper de UGT1A en la resistència al MTX degut a la seva sobreexpressió en cèl·lules de càncer de mama
 - d. Efectes de la sobreexpressió de les UGT1As causada pel MTX, quan s'administra MTX en combinació amb altres fàrmacs glucuronidables.

- II) A nivell de Teràpia Gènica per tal de modular l'expressió gènica:
 - a. Desenvolupament de dos tipus de PPRHs, amb la finalitat de disminuir l'expressió gènica: Template-PPRHs, destinats a unir-se a la cadena motlle del DNA, i Coding-PPRHs, que s'uniran a la cadena codificant del DNA i RNA
 - b. Estudi de la capacitat d'unió dels PPRHs a la seva seqüència diana
 - c. Estudi dels mecanismes d'acció i funcionalitat dels PPRHs en cèl·lules
 - d. Estudi de l'especificitat dels PPRHs cap a la seva diana, activació de la resposta immune com a conseqüència de la transfecció d'un PPRH i estabilitat de la molècula.
 - e. Estudi de les aplicacions terapèutiques dels hairpins a partir de PPRHs dirigits contra el gen *dhfr* en cèl·lules resistents al metotrexat, així com

amb el disseny de PPRHs dirigits contra altres gens clau per tal de causar mort cel·lular

MATERIALS I MÈTODES

La descripció dels mètodes de Biologia Molecular més habituals es troba inclosa en els corresponents articles, en la secció de resultats d'aquesta memòria.

Degut a la novetat d'alguns dels mètodes emprats en aquest treball, en aquesta secció es descriuen amb més detall. Així mateix, es presenta una descripció del material biològic i de les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats.

3.1- Materials

3.1.1- Línies cel·lulars

- Línies cel·lulars de hámster

- DCHM1: són cèl·lules *dhfr⁻* DG44 CHO que han estat transfectades amb el plasmidi pDCHIP (descriu a 3.1.4.1) de forma estable.

- DCHM1-Hp: són cèl·lules *dhfr⁻* DG44 CHO que han estat transfectades amb el plasmidi pDCHIP (descriu a 3.1.4.1) de forma estable.

- Línies cel·lulars canceroses humanes

- MCF7-S: cèl·lules d'adenocarcinoma mamari. Aquesta línia cel·lular es caracteritza per l'expressió del receptor d'estrògens (ER). ATCC HTB-22.

- MCF7-R: cèl·lules derivades de MCF7-S, resistents a 10^{-6} M MTX.

- MDA-MB 468-S: cèl·lules d'adenocarcinoma mamari. Aquesta línia cel·lular es caracteritza per l'expressió de l'*epidermal growth factor* (EGF). ATCC HTB-132.

- MDA-MB 468-R: cèl·lules derivades de MDA-MB-S, resistents a 10^{-6} M MTX.

- SKBR3: cèl·lules d'adenocarcinoma mamari. Aquesta línia cel·lular es caracteritza per la sobreexpressió de HER2/c-erb-2. ATCC HTB-30.

- JURKAT: són limfòcits T, provinents de leucèmia aguda de cèl·lules T.

3.1.2- Medis de cultiu

Les línies cel·lulars MCF7-S, MDA-MB 468-S, SKBR3 i JURKAT es mantenen en medi Ham's F12 suplementat amb 14 mM de bicarbonat sòdic (1,176 g/l), penicil·lina G sòdica (100 U/ml), estreptomina (100 mg/l) i sèrum boví fetal (7% V/V).

Les línies cel·lulars DCHM1, DCHM1-Hp, MCF7-R i MDA-MB 468-R es cultivaven en medi -GHT. Aquest medi és medi Ham's F12 però sense els productes finals de la activitat DHFR: glicina, hipoxantina i timidilat. A l'igual que el medi Ham's F12, el medi -GHT es troba suplementat amb bicarbonat sòdic, penicil·lina G sòdica, estreptomina (100 mg/l) i sèrum boví fetal (7% V/V), però en aquest cas, el sèrum ha estat dialitzat prèviament per eliminar la glicina, hipoxantina i timidina que hi pogués estar present. Aquesta diàlisi es realitzava en PBS 1X a 4°C durant 3 dies, canviant el PBS cada 12 hores.

Les cèl·lules s'incubaven a 37°C en una atmosfera amb un 5% de CO₂. Quan les cèl·lules arribaven a confluència, s'expandia el cultiu mitjançant tractament amb tripsina al 0,05% en PBS 1x (136,9 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄ i 2,8 NaH₂PO₄ a pH 7,4) amb la finalitat de desenganxar les cèl·lules de la placa. Per les línies MDA-MB es va afegir EDTA 0,05%.

Els dos medis de cultiu i la tripsina s'esterilitzaven en ser filtrats amb filtres de 0,2 µm de diàmetre de porus.

3.1.3- aODNs, PPRHs i siRNAs

A continuació es presenta la seqüència dels diferents oligonucleòtids utilitzats.

3.1.3.1- aODNs

HATNL-24	5'-gatGcAGtttAGcGAAccAAccaT-3'
UGT1A1	5' gccctGGGActccAcAGccat
UGT1A3-5	5' ggGAAcctGGAGtctGtGGccat

Per minimitzar la degradació deguda a DNases, es van introduir enllaços fosfotioat als aODNs. Aquests estan presents en el enllaços 3' de les bases indicades en minúscula. HATNL i ATNL van dirigits contra l'inici de traducció del gen *dhfr* humà o de hámster, respectivament.

3.1.3.2- PPRHs

Les lletres en negreta corresponen a les interrupcions del PPRH amb la seqüència diana. Les lletres subratllades corresponen a seqüències complementàries, que fan el PPRH més llarg.

Template-PPRHs

<i>Name</i>	<i>Sequence</i>
<i>dhfr</i> Target 1	Target sequence Intron 3 - reverse strand
Template	5'- (CATTCTCTGATTG)CCTCCTCCCTCTCCCTCCTC -3'
HpdI3- B	5'- GGAGGAGGGAGAGGGAGGAG-(T) ₅ - GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG -3'
HpdI3-T	5'-GGAGGAGGGAGAGGGAGGAG-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG <u>CAATCAAGAGAATG</u> -3'
HpdI3-BT	5'- <u>AAGAGAAAAA</u> AGGAGGAGGGAGAGGGAGGAG-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG <u>AAAAAAGAGAA</u> -3'
HpdI3-WC	5'- CCTCCTCCCTCTCCCTCCTC-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-3'
HpdI3- NH	5'- AAGAAGAAAGAGAAAGAAGA-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-3'
HpdI3- Sc	5'- GAGAGGAGGAGGGAGGGAGA-(T) ₅ -AGAGGGAGGGAGGAGGAGAG-3'
HpdI3- C	5'- GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-(T) ₅ -GGAGGAGGGAGAGGGAGGAG-3'
HpdI3-BF	5'- <u>EGGAGGAGGGAGAGGGAGGAG</u> -(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-3'
<i>dhfr</i> Target 2	Target sequence Intron 3 - reverse strand
Template	5'- AA(CTCCACTCCCCCTCCCCC)AA -3'
HpdI3- misTA	5'- GGGGGGAAGGGGGGAGAGGAG-(T) ₅ -GAGGAGAGGGGGGAAGGGGGG-3'
HpdI3- misTG	5'- GGGGGGAAGGGGGGAGGGGAG-(T) ₅ -GAGGGGAGGGGGGAAGGGGGG-3'
HpdI3- misTT	5'- GGGGGGAAGGGGGGAGTGGAG-(T) ₅ -GAGGTGAGGGGGGAAGGGGGG-3'
<i>dhfr</i> Target 3	Target sequence Intron 3 - reverse strand
Template	5'- TT(CCTGTTTCTCTCCCCCTCTTC)TG -3'
HpdI3- misCA	5'- GAAGAGGGGGAGAGAAAAAGG-(T) ₅ -GGAAAAAGAGAGGGGGAGAAG-3'
<i>tert</i>	Target sequence Intron 8 - reverse strand

Template	5'- CCTCCTGCCTTCCTCCCGCTTCCTTGTCCT-3'
HptI8- B	5'- GGAGGAAGGAAGGAGGGAGAAGGAAAAGGA-(T) ₅ - AGGAAAAGGAAGAGGGAGGAAGGAAGGAGG-3'
HptI8- WC	5'-CCTCCTTCCTTCCTCCCTCTTCCTTTTCCT-(T) ₅ - AGGAAAAGGAAGAGGGAGGAAGGAAGGAGG-3'
HptI8- Sc	5'-AAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGG-(T) ₅ - GGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAAA-3'
<i>birc5</i>	Target sequence Exon 3 - reverse strand
Template	5'- CTGCCTTCTTCCTCCCTCACTTCTCACCT -3'
HpsE3- B	5'-GAAGGAAGAAGGAGGGAGAGAAGAGAGGA-(T) ₅ - AGGAGAGAAGAGAGGGAGGAAGAAGGAAG-3'
<i>birc5</i>	Target sequence Promoter- reverse strand
Template	5'- CCCCTCCCACCCCGCCCCATTCTTT -3'
HpsPr- B	5'-GGGGAGGGAGGGGAGGGGAAAGAAA-(T) ₅ -AAAGAAAGGGGGAGGGGAGGGAGGGG-3'
HpsPr- Sc	5'- AAGAGAAAAAGAGAAAGAAGAGAGGG-(T) ₅ -GGGAGAGAAGAAAGAGAAAAAGAGAA-3'
HpsPr- WC	5'- CCCCTCCCTCCCTCCCTTTTCTTT-(T) ₅ -AAAGAAAGGGGGAGGGGAGGGAGGGG-3'
<i>myc</i>	Target sequence Intron 1 - reverse strand
Template	5'- CCCGTTTTCCCTCTGCCTTCTCCTCTCCCATCTT -3'
HpmycI1-B	5'- GGGAAAAGGGAGAAGGAAGAGGAGGGAAAGAA-TTTTT- AAGAAGGGAGAGGAGAAGGAAGAGGGAAAAAGGG-3'
HpmycI1-WC	5'- CCCTTTTTCCCTCTCCTTCTCCTCTCCCTTCTT-TTTTT- AAGAAGGGAGAGGAGAAGGAAGAGGGAAAAAGGG-3'
HpmycI1-Sc	5'- AGAGAAGAGGAAGAGAGGAAAGAGAGGAAGAGGA-TTTTT- AGGAGAAGGAGAGAAAGGAGAGAAGGAGAAGAGA-3'
<i>Bcl-2</i>	Target sequence Intron 2 - reverse strand
Template	5'- TCTCTCACTTCTCTCTACTACCCCTTC -3'
HpbclI2-B	5'-AGAGAGAGAAGAGAGAGAAGAAGGGGAAG-TTTTT- GAAGGGGAAGAAGAGAGAGAAGAGAGAGA-3'
HpBclI2-WC	5'- TCTCTCTTCTCTCTCTTCTTCCCTTC -TTTTT- GAAGGGGAAGAAGAGAGAGAAGAGAGAGA -3'
<i>Top1</i>	Target sequence Intron 2- reverse strand
Template	5'- CCTCACCTCCTCCCTCTTTT -3'
HptopI2-B	5'- GGAGAGGAGGAGGGAGAAAA-TTTTT-AAAAGAGGGAGGAGGAGAGG -3'
HptopI2-WC	5'- CCTCACCTCCTCCCTCTTTT-TTTTT-AAAAGAGGGAGGAGGAGAGG -3'
HptopI2-Sc	5'- AGAGGAGAGAAGGAAGGAGG-TTTTT-GGAGGAAGGAAGAGAGGAGA -3'

<i>Mdm2</i>	Target sequence Intron 7 - reverse strand
Template	5'- CCCTTCCTGTCTTCTGCCCCG-3'
Hpmdml7-B	5'- GGGAAAGAAAGAAGAAGGGAG-TTTTT-GAGGGAAGAAGAAAGGAAGGG-3'
Hpmdml7-WC	5'- CCCTTCCTTTCTTCTCCCTC-TTTTT-GAGGGAAGAAGAAAGGAAGGG-3'
Hpmdml7-Sc	5'- GAGAAGAGGAAGAGAGGAAGG-TTTTT-GGAAGGAGAGAAGGAGAAGAG-3'

Coding-PPRHs

<i>Name</i>	<i>Sequence</i>
<i>dhfr</i>	Target sequence Intron 3 - forward strand
Coding	5'- (TACTTCA) TTTTCACCCCTCTCCCC (AATG) -3'
HpdI3-A-TA	5'- AAAAAGAGGGGAGAGGGGG-(T) ₅ -GGGGGAGAGGGGAGAAAAA-3'
HpdI3-A-TG	5'- AAAAAGGGGGAGAGGGGG-(T) ₅ -GGGGGAGAGGGGGGAAAAA-3'
HpdI3-A-TA-WC	5'- TTTTCTCCCCTCTCCCC-(T) ₅ -GGGGGAGAGGGGAGAAAAA-3'
HpdI3-A-TA-NH	5'- GGGGGAGAAAAGAGAAAAA-(T) ₅ -GGGGGAGAGGGGAGAAAAA-3'

3.1.3.3- siRNAs

En el cas dels siRNAs s'indica la seqüència de la cadena sentit.

UGT1A6-1	5'- CGAGUGGCCAACUCCUUGdTdT-3'
UGT1A6-2	5'- GAACCGUUACCAAUCAUUdTdT-3'
UGT1A	5'- GUGCUGGGCAAGUUUACUdTdT-3'
DHFR2	5'- CCUCCACAAGGAGCUCAUdTdT-3'
Luciferasa	5'- GUAUCUCUUCAUAGCCUAdTdT-3'

3.1.4- Vectors plasmídics

3.1.4.1- Vectors d'expressió eucariota

Aquest vectors consten d'un promotor d'expressió en eucariotes que permet expressar de forma exògena diferents gens, els quals poden haver estat modificats genèticament.

- **pCVM-UGT1A6-1**: vector pCMV6-XL4 amb resistència a ampicil·lina, que inclou el cDNA de la UGT1A6 tipus 1 humana.

- **pDCHIP**: vector amb resistència a ampicil·lina, que inclou un minigen *dhfr* de hàmmster. Consisteix en els sis exons de la *dhfr*, l'intró 1, unes 900 bp del 5'-UTR, i un lloc de poliadenilació (el primer poliA).

- **pDCHIP-Hp**: aquest vector deriva de pDCHIP al qual s'ha introduït a l'intró 1 la seqüència diana de 31 nt del HpdI3-A-TA (un fragment de l'intró 3 del gen *dhfr* humà).

3.1.4.2- Vectors amb el gen *luc*

Els vectors que contenen el gen *luciferasa* de la cuca de llum (*Photinus pyralis*) permeten estudiar com afecten possibles elements reguladors a 5'-UTR o 3'-UTR a l'expressió gènica. En els estudis realitzats en aquesta memòria, s'ha utilitzat aquest tipus de vector per estudiar la regulació d'un determinat promotor, així com per determinar les zones claus encarregades de l'activació transcripcional.

- **pGL4-basic**: vector, amb resistència a ampicil·lina, al qual li manquen tant el promotor eucariota com seqüències enhancer i que conté el gen *luciferasa*. Així mateix conté un polilinker en la zona promotora per tal de clonar la seqüència desitjada.

- **pUGT1A6-Prom1000**: vector pGL4 en el qual s'han introduït 1071 bp del promotor de la UGT1A6.

- **pUGT1A6-Prom2000**: vector pGL4 en el qual s'han introduït 2001 bp del promotor de la UGT1A6.

3.2- Mètodes


3.2.1- Disseny de PPRHs

Els PPRHs són pinces de polipurines que s'uneixen intramolecularment per enllaços Hoogsteen i que després s'uneixen a la seqüència diana per enllaços Watson i Crick de polipirimidines.

A partir de l'eina informàtica de recerca de seqüències riques en purines "The Triplex-Forming Oligonucleotide Target Sequence Search software" (Anderson Cancer Center, <http://spi.mdanderson.org/tfo/>), podem localitzar possibles dianes pels nostres PPRHs. Ja que aquest software ens indica regions de polipurines, la nostra seqüència diana de polipirimidines es trobarà a la cadena complementària.

Els Template-PPRHs estan destinats a unir-se a la cadena motlle del DNA, per tant haurem de buscar seqüències de polipurines a la cadena codificant o "forward". En canvi si volem dissenyar Coding-PPRHs, com que aquests s'uniran a regions de polipirimidines de l'mRNA, que té la mateixa seqüència que la cadena codificant, tindrem que buscar regions polipurines a la cadena motlle o "reverse".

S'ha de tenir en compte en utilitzar aquest programa l'orientació del gen, ja que pot modificar-se la relació de cadena motlle i codificant.

UT M.D. Anderson Cancer Center • Science Park Research Division
Triplex-Forming Oligonucleotide Target Sequence Search 

Gene information

Species	Gene Name	Entrez Gene ID	Alternate Symbols	Description	Chromosome	Transcription Direction
Hs	DHFR	1719		dihydrofolate reductase	5	reverse

Transcript information¹

Transcript (link is to NCBI GenBank)	Transcript Length	Location on Chromosome
NM_000791.3	28756	79957801-79986556

TFO Target Sequence Search Parameters and Results

Minimum Length	Maximum Length	Minimum %G	Allowable Number of Pyrimidines	Putative Promoter Region Length	Downstream Region Length	Number of TFO Target Sequences Found	Mask for repeat sequences prior to searching
15	no limit	50	3	2000	0	50	Yes

TFO target sequences

TFO Target Sequence ²	Length	% G	Strand	Start ³ in Chromosome	Start ⁴ in Gene	Region ⁴	BLAST ⁵	Repeat Sequence ⁶	Overlapping Gene ⁷
GTGGGAAAGGGATAGGGGAGGTGGAGAA	29	58.6	forward	79963608	5808	intron_5	BLAST		
GAGATACAGGGAAATGGAGGGGGAAAG	28	50.0	reverse	79960001	2201	exon_6	BLAST		
ATATGAGGAGGGAGAGGGAGGAGGCAA	27	51.9	reverse	79971248	13448	intron_3	BLAST		
GGGGGAGAGGGGTGAAAAATGAAGTA	26	50.0	forward	79978331	20531	intron_3	BLAST		
GGGCAGTGGAGAAGAGAGGGTAA	24	50.0	reverse	79985264	27464	intron_2	BLAST		
GTGAGTGGTAGGGGGAGAGAGAA	23	56.5	forward	79977451	19651	intron_3	BLAST		

De les diferents possibles dianes pels PPRHs proposades pel software, s'han de triar aquelles que com a mínim tinguin uns 20 nt, per evitar problemes d'especificitat, i que no continguin interrupcions de pirimidines a la seqüència de polipurines, o si en tenen, que siguin inferiors a 3. Un dels factors decisius per triar un PPRH és l'especificitat mitjançant anàlisi de BLAST. S'hauran de triar aquells PPRHs que continguin dominis de polipurines que no hibridin en cap altre gen que no sigui la nostra diana. En la nostra pràctica no vam utilitzar hairpins que hibridessin en altres seqüències amb una similitud superior al 80% (5 nt com a mínim en una seqüència de 20 nt).

3.2.2- Transcripció *in vitro*

Amb la finalitat d'estudiar si els Coding-PPRHs interfereixen en l'empalmament, es van construir dues sondes a partir dels plasmidis pDCHIP i pDCHIP-Hp. La sonda DCHIP conté l'intró 1 normal, i la sonda DCHIP-Hp, en l'intró 1 té a més inserida la seqüència d'unió del HpdI3-A-TA.

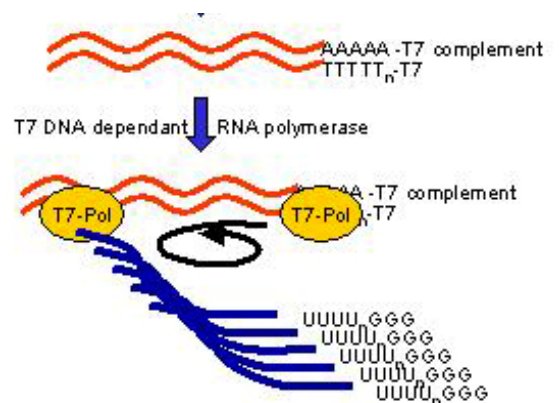
A partir dels plasmidis pDCHIP i pDCHIP-Hp, per PCR, es van generar dues sondes òptimes per ser sotmeses a transcripció *in vitro* i generar els corresponents pre-mRNAs. Per tal que aquestes sondes poguessin ésser transcrites, els oligonucleòtids utilitzats per a la PCR introduïen una seqüència d'entrada de la T7 RNA polimerasa i una de cua d'unió per U1A.

- T7Dex1: 5'-TAATACGACTCACTATAGCCAAACTTGGGGGAAGCA-3'

- Dex3UITail: 5'-ATACTTA CCTGCGATTCTTCTCAGGAATGGAG-3'

Els productes de PCR es van purificar mitjançant un gel de poliacrilamida al 5%.

Una vegada purificades les sondes, es va procedir a la transcripció *in vitro*. En aquest procés, la sonda es va incubar amb l'enzim RiboScribe T7 RNA polimerasa i α -³²P-UTP per tal de que el transcrit generat fos radioactiu. A continuació es detalla la composició de la reacció:



Esquema transcripció

<http://www.ipc.nxgenomics.org/newsletter/no7.htm>

Aigua RNAsa free	q.s.p. 20µl
Sonda de DNA	0,5 µg
Tampó de transcripció	1X
ATP/GTP/CTP	0,5 mM
UTP	15 µM
α - ³² P-UTP	30 µCi
DTT	10 mM
RiboScribe T7 RNA polimerasa	0,5 U/µl
RNAsin	40 U
Anàleg del CAP	750 µM

La reacció es va incubar durant 3 h a 37°C. Transcorregut aquest temps, es va parar la transcripció per adició de tampó de càrrega de l'electroforesi, amb una composició d'un 80% de formamida en TBE 5X. Es va escalfar la mostra 5 min a 85°-95°C per tal d'eliminar estructures secundàries. La purificació del transcrit es va fer en un gel d'acrilamida al 5%, 7M d'urea i a 55°C (voltatge de 350V perquè produeixi escalfor), per tal de que es mantinguessin condicions desnaturalitzants. Com tampó d'electroforesi s'utilitzà TBE.

Una vegada acabada l'electroforesi, el gel radioactiu es posava sobre un suport. El gel es va dipositar en un cassette, i a la cambra fosca, es va contactar amb una pel·lícula fotogràfica per tal de fer una autoradiografia. Es revel·là el film i superposant-lo amb el gel, es va localitzar la banda del transcrit radioactiu. Es va retallar la banda i es va procedir a la seva purificació. Es va precipitar la sonda amb etanol absolut fred i NaCl, i es va resuspendre en aigua DEPC. Es van quantificar les cpm de la mostra radioactiva.

3.2.3- Splicing *in vitro*

Primerament es van incubar els PPRHs amb els transcrits radioactius DCHIP o DCHIP-Hp (20.000 cpm o 1 µg) en presència de l'inhibidor de RNAses (RNAsin, 4 U) i 5,8 mM Mg(AcO)₂ (Vf de reacció 8,65 µl) durant 45 min a 37°C, per tal que es produís la unió entre el PPRH i la seva diana.

Després es va procedir a la reacció d'empalmament, que es va realitzar barrejant els següents components:

RNA-PPRH	
ATP	1 mM
Creatinina-P	5 mM
DTT	0,5 mM
H ₂ O DEPC	qsp 10 µl

+

Extractes nuclears de Hela	40-80 µg
KAcO	80 mM
H ₂ O DEPC	qsp 15 µl

La reacció va tenir lloc durant 2h a 30°C. Es va aturar la reacció en afegir 50 µl del tampó Stop (100 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, 1% SDS, 150 mM NaCl, 300 mM NaAcO).

Els àcids nucleics de la reacció van ser extrets pel mètode de fenol-cloroform-alcohol isoamílic (25:24:1) i es precipità en isopropanol fred. La mostra es va resuspendre en tampó de càrrega de formamida i s'escalfà durant 5 min a 85-95°C.

Es va fer una electroforesi en condicions denaturants. El gel s'assecava i es deixava en contacte amb una placa d'europi, la qual era escanejada mitjançant Phosphorimager (model Storm 840 de Molecular Dynamics) i quantificat el senyal utilitzant el software ImageQuant 5.2.

RESULTATS

4.1- Article I:

UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE 1A6 OVEREXPRESSION IN BREAST CANCER CELLS RESISTANT TO METHOTREXATE

M. Cristina de Almagro, Elisabet Selga, Rémi Thibaut, Cinta Porte, Véronique Noé and
Carlos J. Ciudad

Biochemical Pharmacology 2010

L'objectiu d'aquest treball ha estat trobar gens diferencialment expressats en cèl·lules de càncer de mama resistents al quimioteràpic metotrexat, que puguin estar implicats en el procés o estatus resistent d'aquestes cèl·lules.

Es van realitzar microarrays d'expressió d'Affymetrix de tot el genoma humà per tal de comparar l'expressió gènica entre cèl·lules sensibles i resistents al metotrexat en dues línies cel·lulars de càncer de mama humanes: MCF7 i MDA-MB 468. En analitzar les dades i fer tots els filtratges i tests estadístics, es va obtenir només una família de gens en comú entre les dues línies resistents al MTX, les UGT1As.

Es va validar en cèl·lules resistents la sobreexpressió i l'augment en l'activitat enzimàtica de les UGT1As. La família de les UGT1As està formada per diferents membres que tenen un primer exó característic de cada isoforma, i els exons del 2 al 5 comuns, per tant, els diferents membres de la família comparteixen una gran homologia de seqüència. Es va procedir a analitzar els nivells d'expressió de cadascun dels membres de la família per identificar la isoforma causant de la sobreexpressió, i es va trobar la UGT1A6 com a principal responsable. La UGT1A6 està formada per 2 isoformes que es diferencien en que una ha sofert empalmament alternatiu d'un fragment del 5'UTR i de l'exó 1, mentre que l'altre té la seqüència completa. Les cèl·lules MCF7-R i MDA-MB-R tenien en comú la sobreexpressió de UGT1A6 tipus 1. Es va procedir a estudiar si la seva sobreexpressió era deguda a un augment transcripcional o era conseqüència d'una amplificació gènica. Es van mesurar el nombre de còpies de UGT1A6 i no es van trobar variacions entre cèl·lules sensibles i les resistents a MTX.

Per determinar si UGT1A6 jugava algun paper en el procés de resistència al MTX, es van transfectar cèl·lules resistents amb 2 siRNAs contra UGT1A6 en presència o absència de MTX. No es va observar sensibilització al MTX, així que es van dissenyar aODNs contra UGT1A1 i UGT1A3-5, altres de les isoformes sobreexpressades per veure si podien ser aquestes les responsables, però no es va veure cap efecte. En estudis anteriors del nostre grup, quan cèl·lules resistents es transfectaven amb un siRNA dirigit contra tota la família UGT1A sí s'havia observat sensibilització al MTX. Es va procedir a la transfecció de cèl·lules sensibles amb un plasmidi d'expressió per UGT1A6, i al ser tractades amb MTX es va observar una major resistència.

Les UGT1As són enzims molt induïbles per una gran quantitat de substàncies, així que es va procedir a estudiar si el MTX era capaç d'induir-les. Quan les cèl·lules sensibles eren incubades amb MTX, augmentaven els nivells de mRNA de UGT1A6 a les 24h, així com la seva activitat enzimàtica a les 48h.

A continuació, es va procedir a l'estudi del promotor. Es van generar dues construccions luciferasa de 1000 i 2000 pb per tal d'identificar la regió promotora responsable de la inducció. En incubar cèl·lules transfectades amb els plasmidis i MTX es va observar que la regió de 1000-2000 bp incrementava l'activitat luciferasa. Mitjançant una base de dades es van identificar els factors de transcripció localitzats en la regió de 1000-2000 bp, entre els quals es trobaven AhR/ARNT i ARNT.

Es van realitzar assajos de gel-shift, per veure si les seqüències dianes d'AhR/ARNT (XRE) i ARNT (HIF-1) en ser incubades amb extractes nuclears, s'unien a alguna proteïna i patien retardació. Per tal de confirmar si les proteïnes que s'unien al XRE i HIF-1 eren AhR/ARNT i ARNT, es van fer assajos de super-shift en que es va confirmar que es tractava d'aquests factors de transcripció.

Ja que el MTX induïa les UGT1As, es van incubar cèl·lules MCF7 i MDA-MB en presència de MTX i dos quimioteràpics glucuronidables, l'irinotecà i el tamoxifè. En ambdós casos es va observar una disminució de la citotoxicitat produïda pels quimioteràpics quan s'administraven en combinació amb el MTX.

Com a conclusió, el MTX induïx l'expressió i activitat de UGT1A6, fet que cal tenir en compte quan s'administri el MTX en combinació amb altres fàrmacs glucuronidables, ja que faria disminuir el poder terapèutic dels darrers.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



UDP-glucuronosyltransferase 1A6 overexpression in breast cancer cells resistant to methotrexate

M. Cristina de Almagro^a, Elisabet Selga^{a,1}, Rémi Thibaut^b, Cinta Porte^b,
Véronique Noé^a, Carlos J. Ciudad^{a,*}

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

^b Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, c/Jordi Girona 18, E-08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2010

Received in revised form 7 September 2010

Accepted 9 September 2010

Available online xxx

Keywords:

Methotrexate

Breast cancer

UGT1A6

Microarray

Drug resistance

ABSTRACT

Methotrexate is a chemotherapeutic agent used in breast cancer treatment, but the occurrence of resistance limits its therapeutic use. A microarrays analysis between sensitive and methotrexate resistant MCF7 and MDA-MB-468 breast cancer cells pointed out the UDP-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A) family as a common deregulated node in both cell lines. This family of genes is involved in Phase II metabolism. UGT1A6 was the main isoform responsible for UGT1A family overexpression in these cells. Its overexpression was not due to gene amplification. Transfection of a vector encoding for UGT1A6 in sensitive cells counteracted the cytotoxicity caused by methotrexate. Methotrexate increased the transcriptional activity from a luciferase reporter driven by the UGT1A6 promoter and induced UGT1A6 mRNA and enzymatic activity. Promoter analysis suggested that UGT1A6 induction by methotrexate could be driven by the transcription factors ARNT (HIF-1) and AhR/ARNT. Cells incubated with anticancer drugs susceptible to glucuronidation, such as tamoxifen or irinotecan, together with methotrexate, showed a lesser degree of cytotoxicity, due to UGT1A6 induction. The pharmacological effect of this induction should be taken into account when combining methotrexate with other drugs that are glucuronidated.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women in developed countries, and after lung cancer, the tumour that causes more deaths among females [1]. One of the possible treatments for this cancer is methotrexate (MTX), usually given in combination with cyclophosphamide and 5-fluorouracil. MTX is also used in other types of cancer such as acute lymphocytic leukaemia, non-Hodgkin's lymphoma, osteosarcoma, choriocarcinoma, and head and neck cancer; as well as autoimmune diseases as psoriasis and rheumatoid arthritis [2,3]. However, a major problem of methotrexate, in common with other chemotherapeutic drugs, is the occurrence of drug resistance.

Methotrexate is a folate analogue that reversibly binds to the dihydrofolate reductase (DHFR) enzyme. Dihydrofolate reductase catalyzes the reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate, needed for the synthesis of thymidylate, hypoxanthine and glycine [4]. MTX inhibition of DHFR results in the blockage of DNA synthesis and cell growth. Different mechanisms of MTX resistance had been described including *dhfr* locus amplification, mutation of the target, alteration in the degree of polyglutamation, MDR phenotype, and decreased entrance of the drug [3].

With the aim to get further insight into the mechanisms of MTX resistance, functional genomic analysis using microarrays were performed in breast cancer cell lines sensitive and resistant to MTX. We identified UGT1A as the common gene among the differentially expressed genes in the two breast cancer cell lines resistant to MTX.

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are a family of enzymes involved in phase II metabolism. The addition of a glycosyl group from uridine diphosphoglucuronic acid (UDPGA) renders hydrophobic compounds more soluble for their elimination via bile and urine. UGTs catalyse the glucuronidation of many lipophilic endogenous substrates such as bilirubin and estrogens, and xenobiotics. Anticancer agents such as irinotecan, topotecan, doxorubicin and tamoxifen as well as carcinogens, are glucuroni-

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 934034455; fax: +34 934024520.

E-mail addresses: cdealmagro@ub.edu (M.C. de Almagro), eselga@gencardio.com (E. Selga), remi.thibaut@gmail.com (R. Thibaut), cinta.porte@cid.csic.es (C. Porte), vnoe@ub.edu (S. Noé), cciuudad@ub.edu (C.J. Ciudad).

¹ Present address: Centre de Genètica Cardiovascular, Universitat de Girona-IdIBGi, Parc Científic i Tecnològic, Pic de Peguera 11-15, 17003 Girona, Spain.

dated, contributing significantly to the overall availability and pharmacological effect of these xenobiotics [5].

The UGT superfamily is divided into families and subfamilies based on protein sequence identity, where UGT1 and UGT2 families share less than 50% of identity [6]. The UGT1 gene family expresses nine functional UGT1A proteins by alternative splicing of 13 different tandem exons 1 with the common exons 2–5 [7–9]. Thus, all the UGT1A isozymes have a highly conserved “common” region, which is believed to contain the cofactor-binding site, and a variable region containing unique substrate-binding sites. Significant overlap exists in substrate specificity among the UGT family members [10–12]. The UGT1A genes are divided in two clusters, the UGT1A7–10 cluster of genes showing >70% similar in their first exon sequence and <60% similar to the other UGT1A1–6 genes [8].

UGT1A6 metabolizes planar phenols and arylamines. Two types of UGT1A6 formed by alternative splicing have been identified, which differ in the beginning of the first exon [13,14]. Type 1 has a longer and complete exon 1 and 5'UTR, typical of the UGT1A genes; whereas Type 2 suffers alternative splicing in the 5'UTR, removing part of the beginning of exon 1 and resulting in a shorter isoform. UGT1A6 expression is highly modulated by hormones, drugs, and other xenobiotics that serve as ligands for multiple sensors, including the pregnane X receptor (PXR), the constitutive androstane receptor (CAR), the aryl hydrocarbon (AhR) receptor, and the transcription factor Nrf2, which responds to oxidative/electrophile stress [14,15].

In this study, the relevance of UGT1A6 overexpression in MTX resistance was analysed in breast cancer cells sensitive and resistant to this drug. Moreover, the induction of UGT1A6 by MTX and the transcription factors involved were studied.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

SN-38 and tamoxifen were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and dissolved in DMSO. Methotrexate i/v was purchased from Almirall (Barcelona, Spain).

2.2. Cell culture

MCF7 and MDA-MB-468 (abbreviated in this study as MDA-MB) breast cancer cells were grown in Ham's F-12 medium containing 7% foetal bovine serum (GIBCO Invitrogen, Barcelona, Spain), and incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. MCF7-R and MDA-MB-R were breast cancer cells resistant to 10⁻⁶ M Methotrexate (MTX), generated in our laboratory upon incubation with stepwise concentrations of MTX, following the methodology previously described in Ref. [16]. These cells were 100-fold resistant compared to sensitive cells. These cell lines were grown in Ham's F-12 medium lacking the final products of DHFR activity: glycine, hypoxanthine and thymidine, (–GHT medium, [17]) containing 7% of dialyzed foetal bovine serum. Cells were detached with 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

2.3. Microarrays

Gene expression was analyzed by hybridization to the GeneChip[®] Human Genome U133 PLUS 2.0 from Affymetrix, containing over 54,000 transcripts and variants. Total RNA for cDNA arrays was prepared from triplicate samples of every sensitive and resistant cell line using RNAeasy Mini kit (Qiagen, Madrid, Spain) following the recommendations of the manufacturer. Labelling, 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 [18] and are accessible through

GEO Series accession number GSE16070 for MCF7 cells and GSE16080 for MDA-MB-468 cells.

2.4. Microarray data analyses

Gene expression analyses were performed using three samples of both sensitive and resistant cell lines. These analyses were carried out with the GeneSpring GX software v 7.3.1 (Agilent Technologies, Madrid, Spain), using the latest gene annotations available (March 2009). Normalization was applied in two steps: 'per chip normalization', by which each measurement was divided by the 50th percentile of all measurements in its array; and '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 each condition relative to control (sensitive) 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 [9] 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 first filter was performed selecting the genes that displayed a *p* value, corrected by false discovery rate (Benjamini and Hochberg false discovery rate), of less than 0.05. The output of this analysis was then filtered by fold expression. Thus, lists of genes differentially expressed by at least two fold were generated for each cell line.

2.5. mRNA analysis

Total mRNA was extracted from cells using the Ultraspec[™] RNA Kit (Bioteck, Houston, Texas), according to the manufacturer's specifications. The amount of RNA was determined by measuring its absorbance (260 nm) at 25 °C in a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. For the induction experiments, mRNA was extracted 24 h after incubation of 500,000 cells with methotrexate. mRNA was subjected to DNase treatment to avoid DNA contamination in the PCR step of the RT-PCR analysis.

cDNA was synthesized in a 20 µl reaction mixture containing 0.2–0.5 µg of total RNA, 125 ng random hexamers (Roche, Mannheim, Germany), 10 mM dithiothreitol, 20 units of RNasin (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain), 0.5 mM dNTPs (Appli-Chem, Ecogen, Barcelona, Spain), 4 µl of 5× RT buffer and 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Barcelona, Spain). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 1 h. Three µl of cDNA mixture were used for PCR amplification by Real Time.

Real Time-PCR: the reaction was performed using the ABI-Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). For *ugt1a10*, the reaction was carried out in a final volume of 20 µl, containing 1× Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Barcelona, Spain), 1× of TaqMan probe (Applied Biosystems, Barcelona, Spain), 3 µl of cDNA and H₂O. For *ugt1a*, *ugt1a1*, *ugt1a3–9*, and *ugt1a6* Type 1 and 2, a Sybr Green PCR reaction was performed in a final volume of 20 µl, containing 1× Sybr Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Barcelona, Spain), 0.25 µM of reverse and forward primers (Ecogen, Barcelona, Spain), 3 µl of cDNA and H₂O. Either for the Taqman or the Sybr Green reactions, the adenosylphosphoribosyl transferase (APRT) for mRNA, was used to normalize the results. The primer sequences are listed on additional Table 1. PCR cycling conditions were 2 min at 50 °C, 10 min denaturation at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The mRNA amount of the target gene, normalized to APRT, was given by the $\Delta\Delta C_T$ method, where C_T is the threshold cycle indicating the fractional cycle number at which the amount of amplified mRNA reached threshold.

Table 1

Sequences of the primers used in the study.

Primers	For	Rev
UGT1A Ex3-4	TAAGTGCTACCCAAAACG	CTCCAGCTCCCTAGTCTCC
UGT1A1	CATCAGAGACGGAGCATTTTACAC	GTCCGTCAGCATGACATCAAAG
UGT1A3	TAACAGACCCCGTTAACCTCTGC	AAAAGCATGGCAAATGTAGGACAG
UGT1A4	CTTCTGCTGAGATGGCCAGAG	CTGGTCCATGGAACAGCATAG
UGT1A5	GGGAAGGTGCTGGTGGTG	TGTTTCAAAGAACGATTGAGTGTG
UGT1A6	GGCTACCATCTGTGTACCTCTTC	ATCCACATCTCTTGTAGGACAGC
UGT1A7	CTTTGCCAAGGCAGGGAAG	AGAAAATGCACTTCGCAATGG
UGT1A8	CCTATGTGTTTCTCTGCTGTGAC	TCCAGATCCTCCAGAGTGTATGAG
UGT1A9	AGCCCTTCTCTATGTGT	TGGCATGACTACAACCACCT
UGT1A10	TAQMAN PROBE Hs02516990_s1	
UGT1A6-1 UTR	GCCGTATGACCAAGAAGAGC	GGTGGTCTGTGAAAAGAG
UGT1A6-2 UTR	GAAGCTCAGGAGAGGAGTC	GAAGTATAAGTCTAGCCAGTACC
APRT	TAQMAN PROBE Hs00356991_m1	
APRT-H-DNA	CGGGAACCTCTCTTTCGCCCC	GCCTCGGGGCTCAATCTCACAAAC
APRT-H	GCAGCTGGTTGAGCAGCGAT	AGAGTGGGCTGCAGCTTC

2.6. UGT copy number determination

Genomic DNA from either sensitive or resistant cells was obtained with the WizardTM Genomic DNA Purification Kit (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) following the manufacturer's recommendations. One hundred nanogram of DNA were used for Sybr Green Real Time-PCR amplification. Primers used for UGT1A6 and UGT1A4 were the mRNA For and the UGT1A Ex4 Rev primers (listed on additional Table 1). APRT for DNA was used to normalize the results.

2.7. UGT1A6 activity assay

2.7.1. Preparation of S9 fractions from cell cultures

Cells plated in 100-mm plates were trypsinized, washed with PBS and centrifuged at $800 \times g$ for 5 min. The resulting pellet was resuspended in 300 μ l of cold potassium-phosphate buffer (100 mM; pH 7.4) and cells were homogenized by sonication. S9 fractions were obtained by centrifugation at $9000 \times g$ for 20 min at 4 °C. Protein content of S9 fractions was determined with the Bradford method [19] (Bradford purchased from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) using bovine serum albumin as protein standard.

2.7.2. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) activity

UGT activity was measured in S9 fractions prepared from MCF7 and MDA-MB sensitive and resistant cells, using [1-¹⁴C]- α -naphthol (American Radiolabeled Chemical Inc., St. Louis, Missouri) as substrate. S9 fractions (125 μ g) were incubated in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, 10 mM MgCl₂ with 6 μ M [1-¹⁴C]- α -naphthol and 1 mM UDPGA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) (final volume 250 μ l) at 37 °C for 1 h. Reactions were stopped by addition of 250 μ l of acetonitrile and samples were centrifuged for 5 min at $10,000 \times g$. Supernatant samples (100 μ l) were analyzed by HPLC coupled to on-line radioactivity detection according to Thibaut et al. [20]. α -Naphthol and α -naphthol-glucuronide were quantified by integrating the area under the radioactive peak.

2.8. Transfection

Cells were plated in 35-mm plates the day before transfection. aODNs were mixed with N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP, Roche, Mannheim, Germany) 10 μ M for 15 min at RT before lipofecting the cells. siRNAs were mixed with 2 μ l of Metafectene (Biontex, Martinsried/Planegg, Germany), and plasmids with 3 μ l of Fugene (Roche, Mannheim, Germany) in medium without serum nor antibiotics for 15 min at RT. aODNs sequences were (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain): UGT1A1 5'-GCCTgggaCtCCaCagCCAT-3'; UGT1A3-5 5'-GGaaCCTggagTcCTgTggCCAT-3'; and aCDK4 5'-ctcAtAtcGA-

GAGGtAgccaT-3' (the capital letters contained phosphorothioate linkages). siRNAs sequences were (Thermo, Barcelona, Spain): UGT1A6-A anti strand 5'-CAAGGAAGUUGGCCACUCGTT-3'; UGT1A6-B anti strand 5'-AAAUGAUUGGUUACGGUUCT-3'; Luciferase sense strand 5'-UAAGGCUAUGAAGAGUAUCT-3; DHFR2-MIS anti strand 5'-AAUGAGGAGGUUGUGGAGGTT-3'. Plasmid pCMV-UGT1A6-1 (Type 1) was purchased from Origene (Rockville, Maryland).

2.9. MTT assay

Cells (30,000) were plated in 35-mm plates in 1 ml of -GHT medium. Methotrexate was added 48 h after transfection. However, it was supplied at the time of plating when performing experiments using SN-38 and Tamoxifen that were added 24 h later. Seven days after plated, 500 μ g of MTT (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 5.6 mg of succinate (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) were added and allowed to react for 3 h at 37 °C before the addition of the solubilisation reagent (0.57% acetic acid and 10% SDS in DMSO). Cell viability was measured at 570 nm in a WPA S2100 Diode Array Spectrophotometer.

2.10. Plasmid construction

Two plasmids of different insert length containing the UGT1A6 human promoter were constructed: pUGT1A6-Prom1000 and pUGT1A6-Prom2000. The two promoter inserts of 1071 and 2001 nt in length respectively were generated by PCR amplification, using as template Human Genomic DNA (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain), and the high-fidelity DNA polymerase Phusion (Finnzymes, Espoo, Finland). UGT1A6 Prom-1000-Fw 5'-cacttgctagcTGGACACAGCTCTGAAACC-3'; UGT1A6 Prom-1000-Rv 5'-gcacaagcttTCCAAATCACAGGGCTCCTA-3'; UGT1A6 Prom-2000-Fw 5'-cacttgctagcTCAGCTCCTTCTCCAACCTC-3'; UGT1A6 Prom-2000-Rv 5'-gcacaagcttAACCCTGCTTTTTCACAGGTC-3'; NheI site in Fw primers and HindIII site in Rv are underlined. The fragments were cloned in a pGI4-basic (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) vector at the HindIII and NheI sites. The plasmid constructions were sequenced by MacroGen (Korea) using the primers pGL4-Prom-Fw 5'-AAATAGGCTGTCCCCAGTGC-3'; pGL4-Prom-Rv 5'-CGTCTTCGAGTGGGTAGAATG-3' and UGT1A6 Pr-2000 seq 5'-AGGCTTCTTCTCCCTTCTG-3'. No difference was observed when comparing the sequences with that reported in Genbank (Accession number NC_000002.11). The MatchTM software, using TRANSFAC 6.0 database was used to determine the putative transcription factor binding sites present in UGT1A6 promoter. There are putative ARNT and AhR/ARNT binding sites at -1230 and -1504 nt, respectively, from the UGT1A6 type 2 translational start codon (ATG).

2.11. Luciferase assays

Cells were seeded into 35-mm plates the day before transfection at a density of 2×10^5 cells/well in –GHT medium. Each well was co-transfected with 300 ng of the appropriate plasmid and 10 ng of Renilla plasmid (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) using FUGENE™6 (Roche, Mannheim, Germany). Luciferase activity was assayed 30 h after transfection. Cell extracts were prepared by lysing the cells with 200 μ l of freshly diluted $1 \times$ Reporter Lysis Buffer (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain). The lysate was centrifuged at $13,000 \times g$ for 2 min to pellet the cell debris and the supernatants were transferred to a fresh tube. A 15- μ l aliquot of the extract was added to 15 μ l of the luciferase assay substrate (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain) and the luminescence of the samples was read immediately on a Gloomax 20/20 luminometer (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain), in which the light production (relative light units, RLU) was measured for 5 s. Then, 15 μ l of the $1 \times$ Renilla substrate in Stop & Glo buffer was added, and light production was measured to normalize the results. A ratio between the luciferase and Renilla RLU was given.

2.12. Binding analysis

2.12.1. Preparation of AhR/ARNT and ARNT duplexes

The probes for the gel-shifts were generated by mixing 25 μ g of each single-stranded oligodeoxynucleotides in 150 mM NaCl: AhR-Fw 5'-aggaactcGCGTccagcca-3'; AhR-Rv 5'-tggctggCACGcgagttcct-3'; ARNT-Fw 5'-ttctcacCACGTactggcta-3'; and ARNT-Rv 5'-tagccagtACGTggtgagaa-3' (the capital letters stand for the transcription factor binding site). After incubation at 90 °C for 5 min, solutions were allowed to cool down slowly until reaching room temperature. Duplexes were purified in a non-denaturing 20% polyacrylamide gel and quantified by their absorbance at 260 nm at 25 °C.

2.12.2. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts were prepared from exponentially growing sensitive or resistant cells as described [21]. A double-stranded DNA probe corresponding to the AhR/ARNT or ARNT UGT1A6 promoter sites, was end-labelled with T4 polynucleotide Kinase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) and [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer, Madrid, Spain), and used in the gel-shift assays. DNA binding assays were performed as described [22] and were analyzed on a Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics). Salmon Testes DNA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was used as a non-specific competitor in a 1:8 non-specific/specific ratio. In the supershift experiments, 1 μ g of rabbit polyclonal antibody AhR or ARNT (both from Santa Cruz, Heidelberg, Germany) was added to the reaction mixture. Both antibodies were added at the same time as the probe and AhR was incubated OVN at 4 °C and ARNT was incubated for 30 min at room temperature.

2.13. Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's t-test using InStat software for Mac OS X. Results were considered significant if * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

3. Results

3.1. Differential gene expression between cells sensitive and resistant to MTX

Microarray analyses between sensitive and resistant cells to 10^{-6} M methotrexate were performed using MCF7 and MDA-MB-

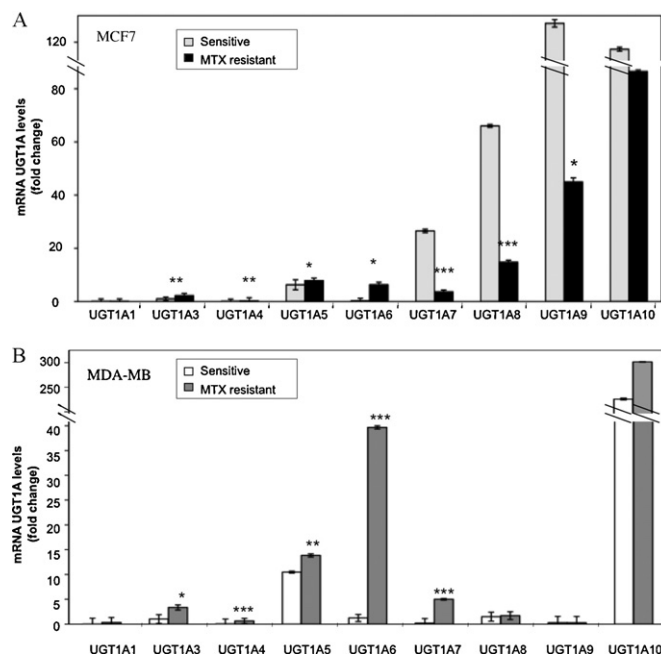


Fig. 1. UGT1A mRNA levels. Basal mRNA levels of the different members of the UGT1A family in sensitive or 10^{-6} M MTX resistant cells. Prior to RT-Real Time PCR, mRNA was submitted to DNase treatment. Expression data of UGT1A family members are referred to UGT1A3 mRNA levels of sensitive cells, whose value was taken as 1. (A) MCF7-S and MCF7-R. (B) MDA-MB-S and MDA-MB-R. Data represent the mean \pm SEM of at least four experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

468 breast cancer cell lines. A list of the 2-fold differentially expressed genes that were statistically significant and passed the Benjamini and Hochberg-FDR was obtained for each cell line. Both cell lines overexpressed UGT1A, a 24-fold increase in MCF7-R and a 28-fold increase in MDA-MB-R. Validation of UGT1A family overexpression was carried out by RT-Real Time PCR (Fig. 1). Among the members of the UGT1A family a different expression pattern was observed. MCF7-R (Fig. 1A) and MDA-MB-R (Fig. 1B) shared UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5 and UGT1A6 overexpression. UGT1A6 was the family member that showed the greatest increase between resistant and sensitive cells in both cell lines, 15-fold increase in MCF7-R cells and 46-fold in MDA-MB-R. UGT1A6 is composed of two isoforms that differ on the 5'UTR and the transcription start site, Type 1 and Type 2. MCF7-R cells showed a noticeable increase in Type 1 UGT1A6, a 12-fold increase, whereas MDA-MB-R had an increase in both Type 1 and Type 2 UGT1A6, 55- and 40-fold increase, respectively (Fig. 2A MCF7 and Fig. 2B MDA-MB).

3.2. Copy number

We explored whether or not UGT1A6 overexpression was due to gene amplification by Real Time-PCR. No changes in copy number were found between sensitive and resistant cells in both cell lines for either UGT1A6 or UGT1A4, another UGT family member with a noticeable overexpression (Fig. 2C MCF7 and Fig. 2D MDA-MB), suggesting an increase in the transcription rate.

3.3. UGT1A activity

We studied whether the noticeable increase in UGT1A6 mRNA levels in MTX resistant cells was followed by a rise in UGT1A6 activity. The measurement of UGT1A activity, determined by [14 C]- α -naphthol-glucuronide formation, showed a clear increase in MCF7-R and MDA-MB-R cells, of 2-fold and 9-fold, respectively (Fig. 2E).

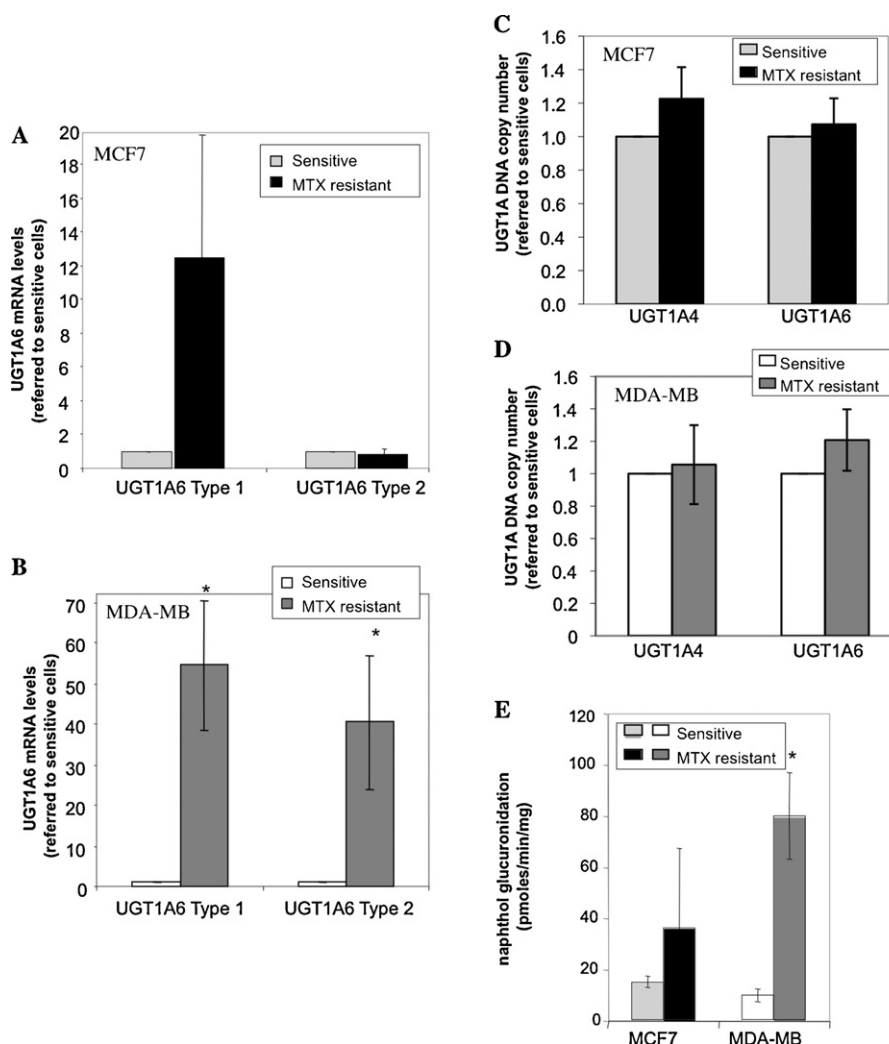


Fig. 2. Type 1 and type 2 UGT1A6 mRNA levels, copy number and UGT activity. Basal UGT1A6 mRNA levels of sensitive and 10^{-6} M MTX resistant cells; (A) MCF7 and (B) MDA-MB. Prior to RT-Real Time PCR, mRNA was submitted to DNase treatment. Data are referred to sensitive cells and represent the mean \pm SEM of three experiments. (C and D) UGT1A6 and UGT1A4 copy number of sensitive and MTX resistant cells. (C) MCF7 and (D) MDA-MB. Data are referred to sensitive cells and represent the mean \pm SEM of five experiments. (E) UGT1A activity. The S9 fraction of MDA-MB and MCF7 cells, either sensitive or resistant, was incubated with [14 C]- α -naphthol and UGT1A activity was measured by HPLC. Data represent the mean \pm SEM of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

3.4. Inhibition of UGT1A6 expression and MTX sensitization

To study the role of UGT1A6-1 (Type 1) in MTX resistance in breast cancer cells, inhibition of its expression was carried out by siRNAs. Two different siRNAs against UGT1A6-1 were designed to ensure the specificity of the results. No increases in sensitivity to MTX were observed in MCF7-S or R and MDA-MB-S or R upon UGT1A6-1 siRNA transfection (data not shown). Then, we studied the influence of the other overexpressed UGTs in MTX resistance. As with UGT1A6, no differences in sensitivity to MTX were observed when inhibiting UGT1A1 or UGT1A3-5 in MCF7-S or R and MDA-MB-S or R (data not shown). The functionality of the inhibiting molecules against UGT1A6-1 and UGT1A1 or UGT1A3-5 was confirmed by the decrease in the mRNA levels of the specific UGT1A targets (data not shown). The lack of an increased sensitivity to MTX after down regulation of the overexpressed UGTs found in resistant cells suggests a redundant action among the different UGT isoforms, as a siRNA targeting the whole UGT1A family sensitized cells to MTX [23].

3.5. UGT1A6-1 overexpression and MTX resistance

The influence of UGT1A6-1 overexpression in MTX resistance was studied in sensitive breast cancer cells by the transfection of a

plasmid containing the UGT1A6-1 gene. Sensitive breast cancer cells incubated with 3×10^{-8} M MTX plus $1 \mu\text{g}$ of pCMV-UGT1A6-1 displayed a significant increase in cell survival referred to cells treated with MTX alone, of 20% in MCF7 (Fig. 3A) and 48% in MDA-MB cells (Fig. 3B). This rise in cell survival was specific of UGT1A6-1 as the empty vector did not cause any effect. The increase in UGT1A6-1 mRNA levels upon plasmid transfection was confirmed by RT-Real Time PCR (data not shown).

3.6. Effect of MTX on UGT1A mRNA levels

We studied whether MTX was able to induce UGT1A gene expression. MCF7-S and MDA-MB-S cells were incubated for 24 h with 3×10^{-8} M MTX, and then UGT1A mRNA levels were analysed by RT-Real Time-PCR. MCF7-S (Fig. 4A) and MDA-MB-S (Fig. 4B) showed a similar pattern of induction of the UGT1A family. In both cases, when measuring the mRNA levels of the UGT1A family as a pool (1A*), an increase was observed, of 2-fold in MCF7-S MTX treated cells and 3.8-fold in MDA-MB-S. However, when determining the mRNA levels of each specific member of the UGT1A family upon MTX incubation, we observed two patterns of expression, one for the UGT1A1-6 cluster for which induction was the predominant response, and another for the UGT1A7-10 cluster

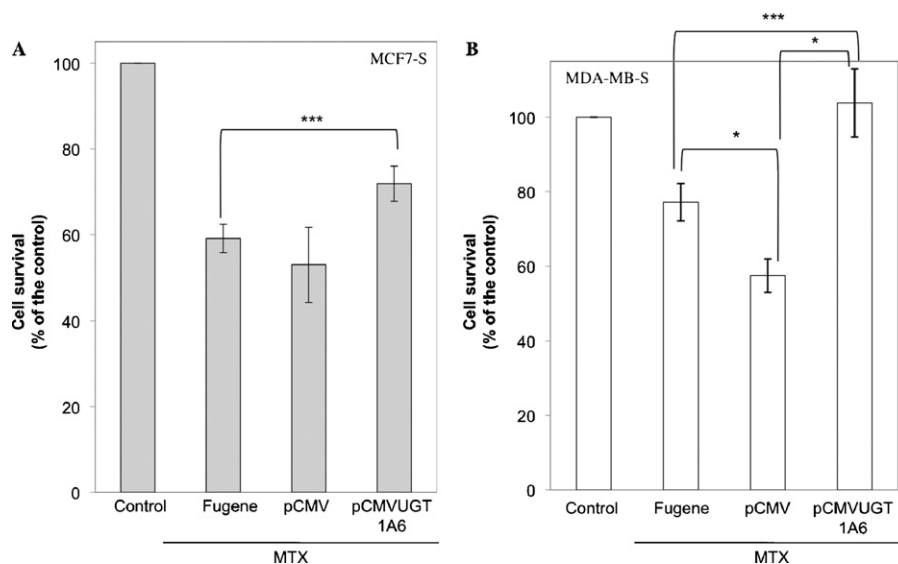


Fig. 3. Methotrexate cytotoxicity upon UGT1A6-1 plasmid transfection. 30,000 sensitive cells were incubated in –GHT medium. The following day, cells were transfected with the appropriated plasmid using Fugene. 48 h after transfection, cells were treated with 3×10^{-8} M MTX. The empty vector pCMV was used as a negative control. Data represent the fold change referred to cells not treated with MTX. MTT assays were performed a week after transfection. (A) MCF7-S cells. (B) MDA-MB-S cells. Data represent the mean \pm SEM of at least five experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

for which inhibition was prevalent. Both cell lines had in common the increase in the expression of UGT1A1, UGT1A4 and UGT1A6, and the decrease in the expression of UGT1A8, UGT1A9 and UGT1A10. In MCF7-S and MDA-MB-S cells treated with MTX, UGT1A6 was the family member that presented the highest rise in expression, 2.4-fold for MCF7-S and 5.7-fold for MDA-MB-S.

3.7. UGT1A activity upon MTX incubation

We analysed whether the induction that MTX exerted on UGT1A6 mRNA levels was translated into a higher glucuronidation activity. Since MDA-MB-S cells showed a greater response to MTX induction, they were selected for the enzymatic determination.

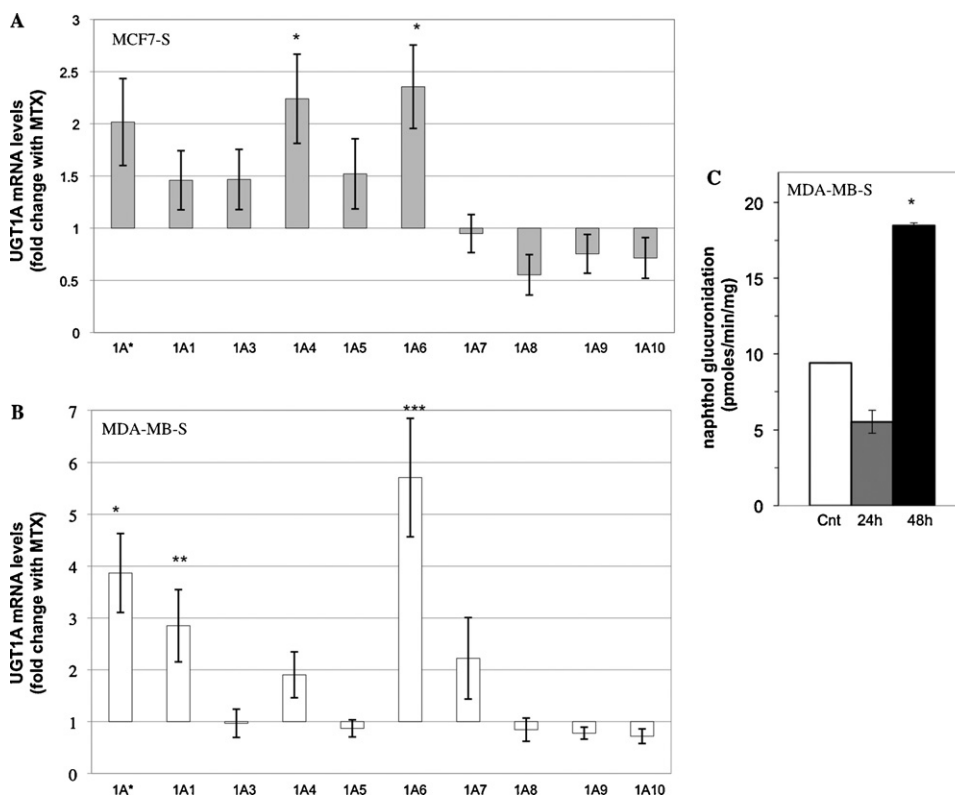


Fig. 4. UGT1A mRNA and activity after MTX incubation. (A and B) 500,000 sensitive cells were incubated for 24 h with 3×10^{-8} M MTX. Total mRNA was obtained and submitted to DNase treatment prior to RT-Real Time PCR. Data represent the fold change referred to cells non-treated with MTX. (A) MCF7-S cells. (B) MDA-MB-S cells. Data represent the mean \pm SEM of at least three experiments. (C) UGT1A activity. MDA-MB sensitive cells were incubated for 24 and 48 h with 3×10^{-8} M MTX. The microsomal fraction was obtained and UGT1A activity was analysed through [$1-^{14}$ C]- α -naphthol glucuronidation. Data represent the mean \pm SEM of two experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

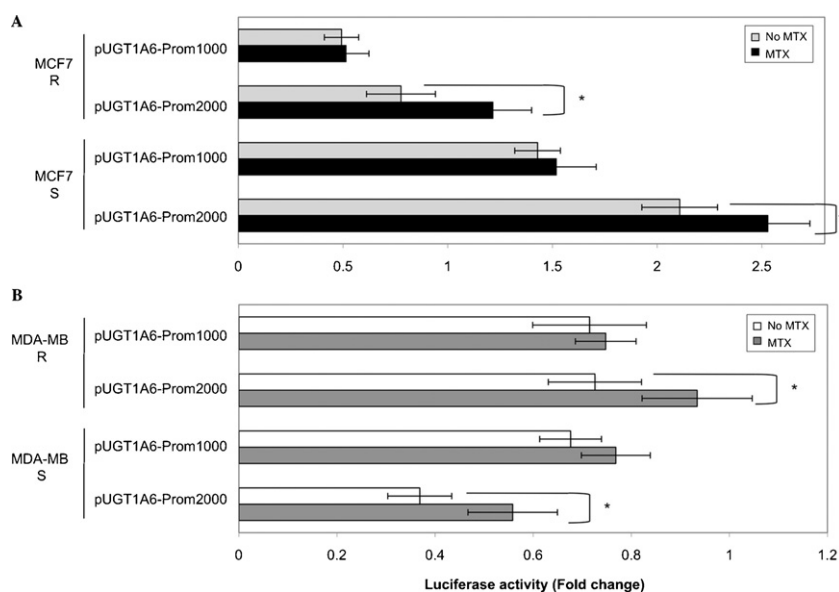


Fig. 5. Analysis of UGT1A6 promoter by luciferase activity. 200,000 cells were incubated in –GHT medium. The following day, cells were transfected with the appropriated plasmid using Fugene and incubated either in the presence or in the absence of MTX. Thirty hours latter dual luciferase assays were performed. The control was the empty vector, pGL4. Renilla was used to normalise the data. (A) MCF7 cells and (B) MDA-MB cells. Data represent the mean \pm SEM of at least three experiments. * $p < 0.05$.

Therefore, these cells were incubated in –GHT medium for different periods of time with 3×10^{-8} M MTX. As shown in Fig. 4C, a noticeable increase in the glucuronidation levels of [1- 14 C]- α -naphthol- was observed at 48 h, despite an initial decrease at 24 h.

3.8. Effect of MTX on UGT1A6 transcriptional activity

MTX induced UGT1A6 expression, so we proceeded to study if that induction was the result of a transcriptional activation. Two different luciferase reporter plasmids containing 1071 bp or 2001 bp of the UGT1A6 promoter were constructed. Cells were transfected with these plasmids and the Renilla plasmid to normalize the results. In both cell lines, MTX caused an increase in promoter activity but only from the 2001 bp fragment (Fig. 5A MCF7 and Fig. 5B MDA-MB). This increase in transcription activity was observed either in sensitive or resistant cells. The luciferase activity from the empty vector (pGL4) remained unchanged when incubated with MTX (data not shown).

3.9. Transcription factors binding to the UGT1A6 promoter

The luciferase assays indicated that the region responsible for MTX induction was located between the –1071 to –2001 bp of the UGT1A6 promoter region. Computational analysis using the Transfac database revealed the presence of binding sites for two transcription factors that could be involved in MTX induction, AhR/ARNT and ARNT, which are related to xenobiotics metabolism and oxidative stress. Nuclear extracts from MCF7 and MDA-MB sensitive and resistant to MTX were incubated with two radiolabelled probes derived from the UGT1A6 promoter containing the binding sites for either AhR/ARNT or ARNT. A similar behaviour was observed in both breast cancer cell lines with both probes (Figs. 6A and 7A). Sensitive cells showed three retardation bands using the AhR/ARNT as well as ARNT probes. When these cells were treated with 3×10^{-8} M MTX for 24 h, only the band with the lowest mobility could be observed in the gel shift with a intensity higher than in untreated cells. Resistant cells showed this same retardation pattern of a unique shifted band that did not change when these cells were depleted of MTX for 24 h. Supershift assays were performed to assess the specificity and identity of the

retardation bands. When MCF7-S nuclear extracts were incubated with an AhR antibody, the three retardation bands disappeared, indicating that the antibody blocked the formation of the AhR/ARNT-probe complex (Fig. 6B). MCF7-S nuclear extracts incubated with the ARNT antibody produced a super-shifted band due to the reduced mobility of the Ab-ARNT-probe complex, as well as the disappearance of the upper band of the three bands present in the gel-shift (Fig. 7B).

3.10. Influence of MTX in UGT1A metabolism of other drugs

Tamoxifen and the active metabolite of irinotecan, SN-38, are two drugs metabolized by UGT1A. The IC50 for SN-38 was 0.75 nM in MDA-MB cells and 0.75 μ M in MCF7 cells, the IC50 for TMX was 0.35 μ M in MCF7 cells, and the IC50 for MTX was 6×10^{-8} M in both cell lines. When MDA-MB-S or MCF7-S cells were incubated with increasing concentrations of SN-38, a noticeable cell death was observed (Figs. 8A and 9A). However, cells incubated with SN-38 together with 2×10^{-8} M MTX, showed a cell survival recovery of 22% with 0.01 μ M SN-38 in MDA-MB-S (Fig. 8A), reaching a 43% at 0.025 μ M SN-38 in MCF7-S (Fig. 9A), probably due to SN-38 increased glucuronidation upon MTX incubation. MDA-MB-R and MCF7-R cells did not present significant changes in cell survival, when incubated with SN-38 and MTX 1×10^{-6} M (Fig. 8B and Fig. 9B). This effect could be explained by the fact that methotrexate resistant cells show already high levels of UGT1A6 regardless of the presence of MTX. Tamoxifen was assayed in MCF7 cells only as the mechanism of action of this drug needs ER+ cells (Fig. 10). Similar to SN-38 behaviour, sensitive cells incubated with tamoxifen together with MTX had a higher cell survival than those incubated with tamoxifen alone, reaching a 36% of cell survival recovery when incubated with 1 μ M tamoxifen (Fig. 10A). Resistant cells did not show significant changes in cell survival due to the presence or absence of MTX (Fig. 10B). The vehicle of both drugs, DMSO, did not cause significant changes in cell survival.

4. Discussion

Drug resistance constitutes a drawback of cancer treatment. Microarray analysis of two different breast cancer cell lines resistant to methotrexate, MCF7-R and MDA-MB-R, pointed out UGT1A, as the

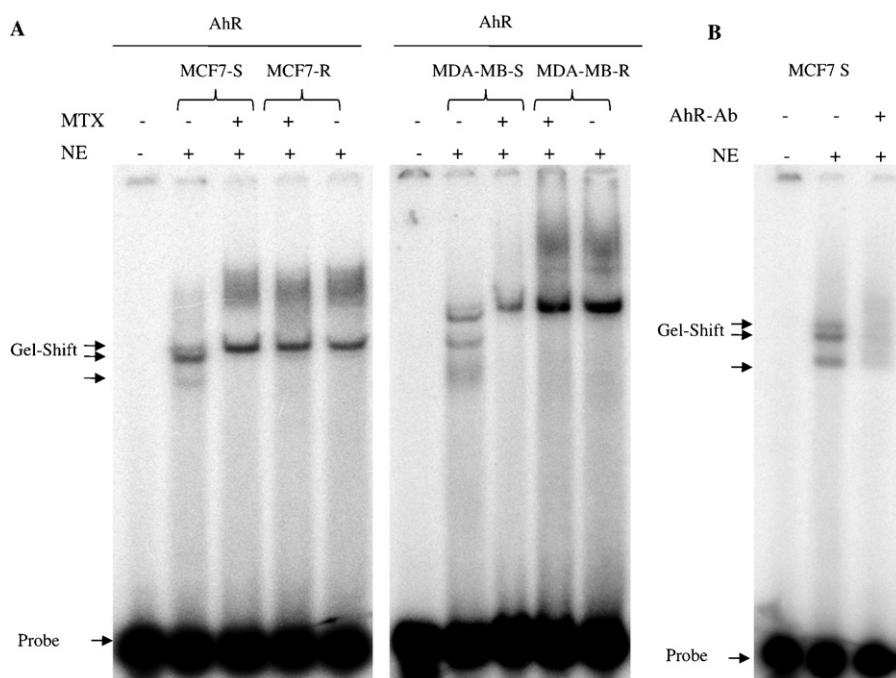


Fig. 6. Binding of AhR to UGT1A6 promoter. Cells were incubated with or without MTX for 24 h prior to nuclear extracts harvest. Nuclear extracts were incubated with a radiolabelled probe corresponding to UGT1A6 AhR/ARNT promoter sequence. (A) MCF7 sensitive and resistant and MDA-MB sensitive and resistant. (B) AhR supershift. Incubation of MCF7-S nuclear extracts with AhR antibody. Shifted and supershifted bands are indicated by arrows.

only gene family in common between them. Additionally, it is worth noting that ABCG2 MTX transporter was about 10-fold overexpressed in MCF7-R cells, although no significant changes in ABCG2 expression were observed in MDA-MB-R.

Among the different members of UGT1A family, the cluster formed by UGT1A1 through 6, and specifically UGT1A6, showed to be the main responsible for the rise of UGT1A expression in breast cancer resistant cells. UGT1A6 is a major UGT in humans that mediates glucuronidation [24] and is responsible for the metabolism of drugs, such as acetaminophen [25] and valproate [26]; carcinogens, such as benzo(a)pyrene; and endogenous substrates, including serotonin [27] and 5-hydroxytryptophol [28]. Glucur-

onidation is one of the main phase II clearance mechanisms for drugs, dietary natural and chemical products as well as environmental substances in humans. Glucuronidation increases water solubility of compounds, enabling their elimination of the body via urine or bile acids.

UGT1A family could somehow contribute to MTX metabolism to a certain degree, as it shares a phenolic structure common to other UGT1A substrates. This effect could be hypothesized from the increased survival observed in sensitive cells treated with MTX when UGT1A6 was overexpressed. However, no increase in sensitivity to MTX was observed when a siRNA against UGT1A6 was used. Different aODNs towards the remaining members of the

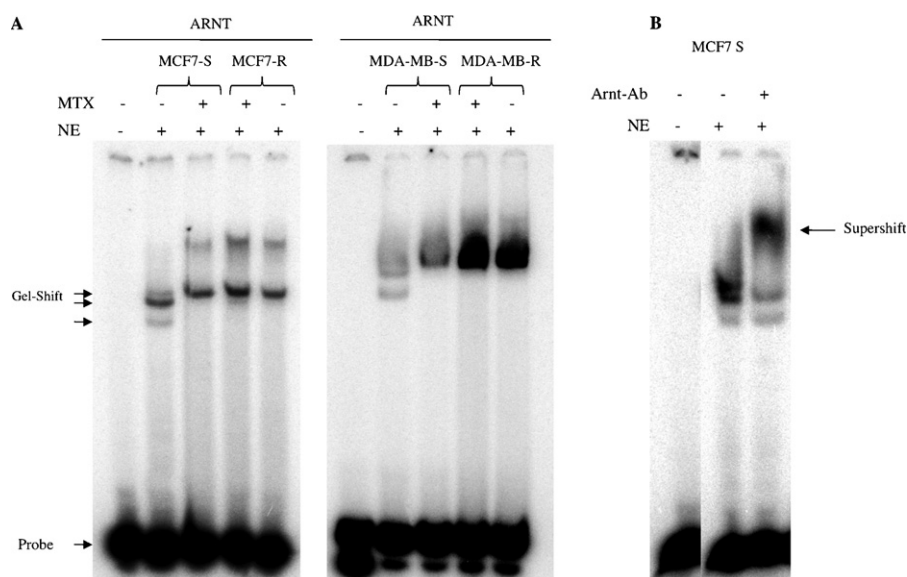


Fig. 7. Binding of ARNT to UGT1A6 promoter. Cells were incubated with or without MTX for 24 h prior to nuclear extracts preparation. Nuclear extracts were incubated with a radiolabelled probe corresponding to UGT1A6 ARNT promoter sequence. (A) MCF7 sensitive and resistant and MDA-MB sensitive and resistant. (B) ARNT supershift. Incubation of MCF7-S nuclear extracts with ARNT antibody. Shifted and supershifted bands are indicated by arrows.

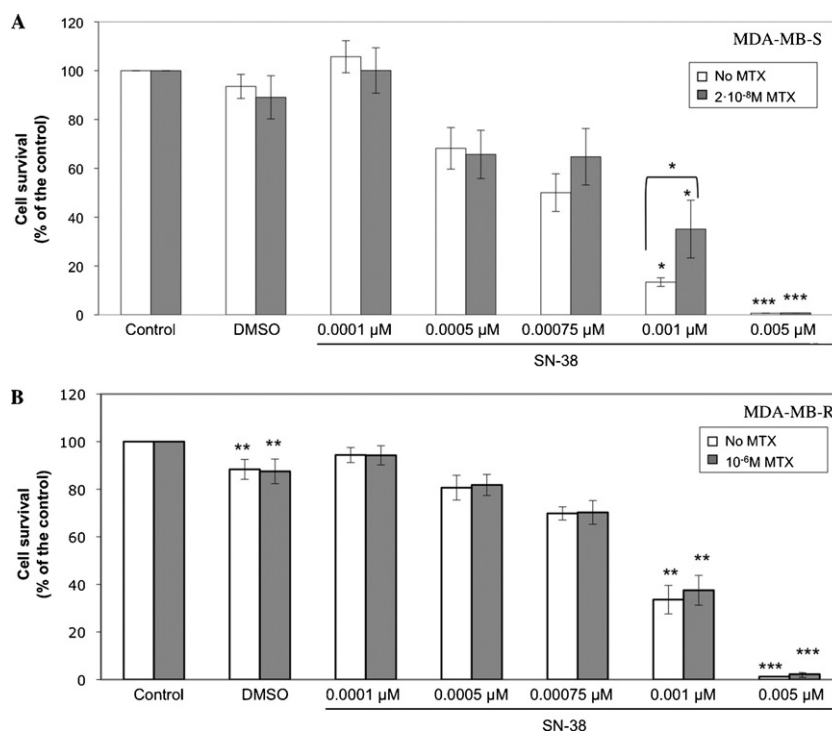


Fig. 8. SN-38 cytotoxicity in the presence of MTX in MDA-MB cells. 30,000 cells were incubated in –GHT medium either in the absence or in the presence of MTX. The following day, cells were incubated with the appropriated SN-38 concentration. The vehicle of SN-38, DMSO was tested alone at the concentrations used. MTT assays were performed a week after adding MTX. (A) MDA-MB-S cells and (B) MBA-MB-R cells. Data represent the mean \pm SEM of four experiments. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, or $^{***}p < 0.005$.

UGT1A1-6 cluster were also tested, to evaluate whether another family member was responsible for MTX metabolism, but increase in sensitivity was neither observed. The lack of sensitization towards MTX when UGT1A6 was downregulated could be explained by the redundant action of the different UGTs isoforms. In previous studies, when MTX-treated cells were transfected with a siRNA targeting the whole UGT1A family, an increase in cell sensitivity was observed, supporting the hypothesis of UGT1A redundancy [23]. On the other

hand, it is difficult to discriminate the contribution of a single UGT isoform in the metabolism of an UGT substrate. No isoform-specific substrates, UGT isoform-specific chemical inhibitors or inhibitory antibodies are available [29].

UGT1A overexpression in both breast cancer cell lines resistant to MTX was not due to gene amplification, but to an increase in UGT1A transcription that led to an increased UGT1A activity. UGT1A family is characterised by its induction by a wide range of compounds.

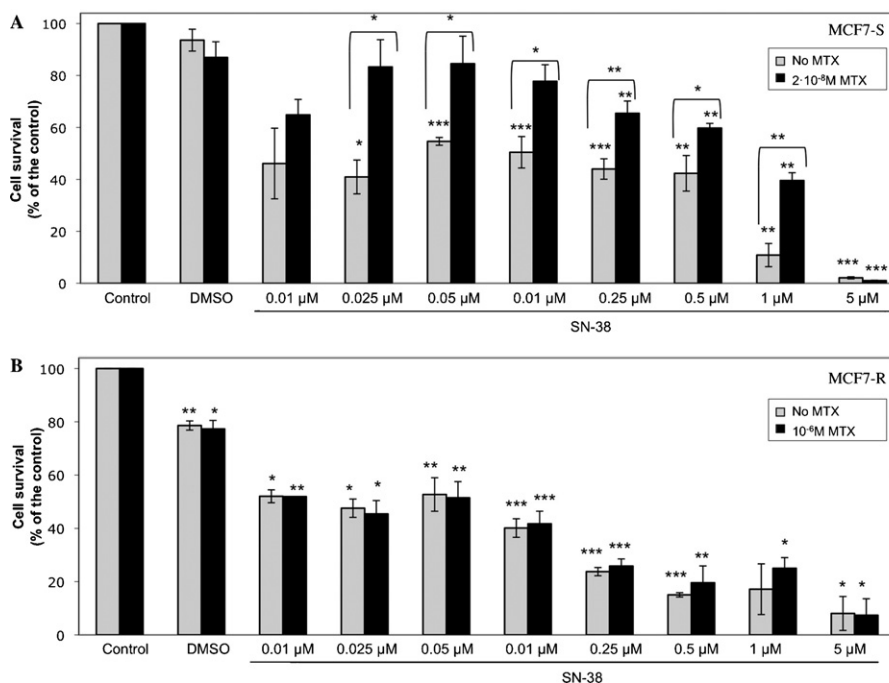


Fig. 9. SN-38 cytotoxicity in the presence of MTX in MCF7 cells. (A) MCF7-S cells and (B) MCF7-R cells. Data represent the mean \pm SEM of four experiments. Other conditions as in Fig. 8.

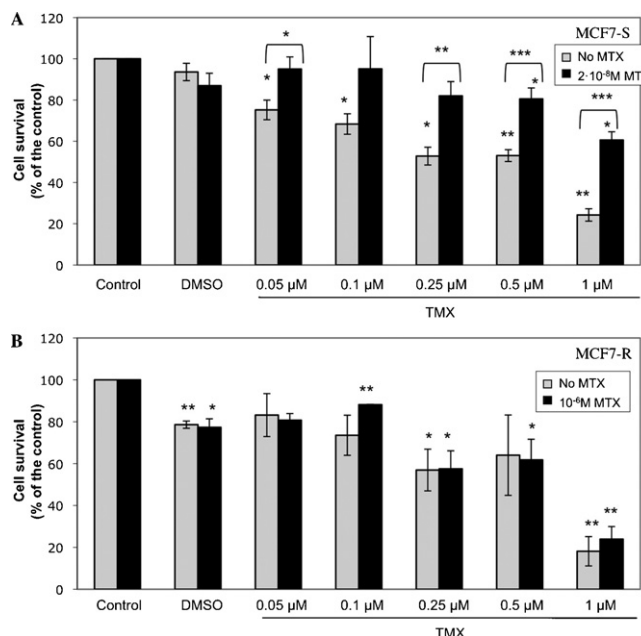


Fig. 10. Tamoxifen cytotoxicity in the presence of MTX in MCF7 cells. 30,000 cells were incubated in –GHT medium in the absence or in the presence of MTX. The following day, cells were incubated with the appropriated tamoxifen concentration. The vehicle of tamoxifen, DMSO was tested alone at the concentrations used. (A) MCF7-S cells and (B) MCF7-R cells. Data represent the mean \pm SEM of four experiments. Other conditions as in Fig. 8.

Among the chemicals that induce UGT1A6 expression we can find: flavonoids, sulforaphane [30], LPS [31], 3-methylcholanthrene (3-MC) [32,33], benzo[a]pyrene (B[a]P), dioxin [34], b-naphthoflavone (BNF) [35], oltipraz [36–38], and rifampicin [39]. MTX could be an UGT1A6 inducer according to our results of increased mRNA levels, luciferase activity and UGT1A enzymatic activity.

The different transcription factors involved in UGT1A induction include activator protein 1 (AP-1) [32], constitutive active receptor (CAR) [40], pregnane X receptor (PXR) [41], peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) [42], antioxidant response element (ARE) through Nrf2 [36,43] and aryl hydrocarbon receptor (AhR) [44]. AhR was described to provoke moderate UGT1A6 induction in humans and rodents [14,45–48]. This transcription factor is located in the cytoplasm and upon activation by ligand binding, it enters the nucleus and interacts with the AhR nuclear translocator protein (ARNT), forming the AhR/ARNT heterodimer that binds to a specific DNA sequence called xenobiotic response element (XRE, 5'-GCGTG-3') [49]. AhR/ARNT binding to XRE activates the expression of a battery of genes involved in drug and hormone metabolism, e.g., CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2, ALDH3, GSTA2, NAD(P)H:quinone reductase and UGT1A6 [50,51]. TCDD (dioxin) is one of the compounds that induce UGT1A6 via AhR binding to the XRE as it has been observed in primary hepatocyte cultures and in colon carcinoma Caco-2 cells [14]. Some AhR agonists cause coordinate induction of both phase-I CYPs and UGTs to attenuate the generation of mutagenic benzo[a]pyrene metabolites, facilitating detoxification of the carcinogen [52]. In addition, UGTs may be responsible for homeostatic control of AhR ligands, such as bilirubin [52]. AhR can also induce UGT1A6 expression through Nrf2 binding to the ARE element present in the UGT1A6 promoter [43], however no induction in response to MTX was observed in the luciferase assays for the first 1000 bp region, where the ARE site is located. Our luciferase and gel-shift results support the idea that MTX could be inducing UGT1A6 expression through AhR/ARNT heterodimers and ARNT itself. ARNT can also bind to other ligands like hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which

binds to a promoter sequence (5'-CACGT-3') different from XRE. It has been shown that down-regulation of HIF-1 α by siRNA sensitizes MCF7 cells to MTX [53]. Furthermore, up-regulation of the hypoxia pathway by HIF not only confers an aggressive phenotype but also contributes to resistance to radiotherapy and chemotherapy [54]. The potential mechanisms for HIF-mediated drug resistance include the interference with the apoptotic pathway [55], the upregulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein [56], and a poor drug delivery in functionally deficient vessels [54]. Thus, MTX could induce UGT1A6 through HIF, thus causing a phenotype more resistant to this drug. Another possibility would be that MTX, instead of directly activating AhR or ARNT, could bind to an ARNT inhibitor such as the short heterodimer partner (SHP) and SMRT, or activate ARNT through coactivators as CBP and ERAP140. SHP has been shown to inhibit a reporter activity induced by TCDD, an UGT1A6 substrate, in RL95-2 cells [51].

MTX induction of UGT1A6 may have important toxicological, pharmacological and physiological consequences, as it would decrease the bioavailability of many dietary constituents and drugs susceptible to glucuronidation, such as irinotecan and tamoxifen, which would become less active when administered simultaneously with MTX, as indicated by our results. UGTs have been reported to be responsible in part for the resistance to chemotherapeutic drugs such as daunorubicin [57] and mycophenolic acid [58], and as shown here they constitute an important element in MTX resistance in breast cancer cells. This type of cross-resistance between MTX and other chemotherapeutics has significant pharmacological repercussions and could represent a handicap to tumour treatment, since methotrexate is given in combination with other drugs such as tamoxifen to treat breast cancer. Additionally, any other drug susceptible to glucuronidation, such as paracetamol, given to a patient treated with MTX, would decrease its bioavailability and therapeutic effect.

In summary, we show that UGT1A6 is overexpressed in breast cancer cells resistant to methotrexate, and that this drug induces UGT1A6 mRNA and enzymatic activity, through a mechanism mediated by ARNT and AhR/ARNT. The pharmacological effect of this induction should be taken into account when combining methotrexate with other drugs susceptible to glucuronidation.

Acknowledgements

Work supported by grants SAF08-43 from "Plan Nacional de Investigación Científica" (Spain) and ISCIII-RETIC RD06/0020/0046. Our group holds the Quality mention from the "Generalitat de Catalunya" SGR09-118. M.C.A. is the recipient of a predoctoral fellowship from the "Generalitat de Catalunya" (FI).

References

- [1] Mayo C. [<http://www.mayoclinic.com>] 05/15/2010.
- [2] Chu E, Grem JL, Johnston PG, Allegra CJ. New concepts for the development and use of antifolates. *Stem Cells* 1996;14:41–6.
- [3] Gorlick R, Goker E, Trippett T, Steinherz P, Elisseyeff Y, Mazumdar M, 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.
- [4] Blakley RL, Cocco L. Dismutation of dihydrofolate by dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 1984;23:2377–83.
- [5] Nagar S, Rimmel RP. Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 2006;25:1659–72.
- [6] Burchell B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenom* 2003;3:37–52.
- [7] Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 1997;7:255–69.
- [8] Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, et al. Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* 2001;11:357–68.

- [9] Clarke DJ, Cassidy AJ, See CG, Povey S, Burchell B. Cloning of the human UGT1 gene complex in yeast artificial chromosomes: novel aspects of gene structure and subchromosomal mapping to 2q37. *Biochem Soc Trans* 1997;25:S562.
- [10] Nagar S, Blanchard RL. Pharmacogenetics of uridine diphosphoglucuronosyltransferase (UGT) 1A family members and its role in patient response to irinotecan. *Drug Metab Rev* 2006;38:393–409.
- [11] Burchell B, Brierley CH, Rance D. Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci* 1995;57:1819–31.
- [12] Ciotti M, Owens IS. Evidence for overlapping active sites for 17 alpha-ethynylestradiol and bilirubin in the human major bilirubin UDPglucuronosyltransferase. *Biochemistry* 1996;35:10119–24.
- [13] Auyeung DJ, Kessler FK, Ritter JK. An alternative promoter contributes to tissue- and inducer-specific expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6 gene. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;174:60–8.
- [14] Munzel PA, Lehmkoetter T, Bruck M, Ritter JK, Bock KW. Aryl hydrocarbon receptor-inducible or constitutive expression of human UDP glucuronosyltransferase UGT1A6. *Arch Biochem Biophys* 1998;350:72–8.
- [15] Bock KW, Kohle C. UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol* 2005;400:57–75.
- [16] Selga E, Noe V, Ciudad CJ. 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.
- [17] Chasin L. The dihydrofolate reductase locus. *Mol Cell Genet* 1985;449–88.
- [18] Omnibus GE. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. 05/15/2010.
- [19] 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.
- [20] Thibaut R, Schnell S, Porte C. Assessment of metabolic capabilities of PLHC-1 and RTL-W1 fish liver cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2009;25:611–22.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Selga E, Oleaga C, Ramirez S, de Almagro MC, Noe V, Ciudad CJ. Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate. *Genome Med* 2009;1:83.
- [24] Krishnaswamy S, Hao Q, Al-Rohaimi A, Hesse LM, von Moltke LL, Greenblatt DJ, et al. UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 pharmacogenetics: I. Identification of polymorphisms in the 5'-regulatory and exon 1 regions, and association with human liver UGT1A6 gene expression and glucuronidation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:1331–9.
- [25] Court MH. Acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase in ferrets: species and gender differences, and sequence analysis of ferret UGT1A6. *J Vet Pharmacol Ther* 2001;24:415–22.
- [26] Ethell BT, Anderson GD, Burchell B. The effect of valproic acid on drug and steroid glucuronidation by expressed human UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1441–9.
- [27] Krishnaswamy S, Duan SX, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. Validation of serotonin (5-hydroxytryptamine) as an in vitro substrate probe for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6. *Drug Metab Dispos* 2003;31:133–9.
- [28] Krishnaswamy S, Hao Q, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. Evaluation of 5-hydroxytryptophol and other endogenous serotonin (5-hydroxytryptamine) analogs as substrates for UDP-glucuronosyltransferase 1A6. *Drug Metab Dispos* 2004;32:862–9.
- [29] Liu X, Tam VH, Hu M. Disposition of flavonoids via enteric recycling: determination of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms responsible for the metabolism of flavonoids in intact Caco-2 TC7 cells using siRNA. *Mol Pharm* 2007;4:873–82.
- [30] Wang M, Li YQ, Zhong N, Chen J, Xu XQ, Yuan MB. Induction of uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase gene expression by sulforaphane and its mechanism: experimental study in human colon cancer cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005;85:819–24.
- [31] Heurtaux T, Benani A, Moulin D, Muller N, Netter P, Minn A. Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology* 2006;50:317–28.
- [32] Emi Y, Ikushiro S, Iyanagi T. Drug-responsive and tissue-specific alternative expression of multiple first exons in rat UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) gene complex. *J Biochem* 1995;117:392–9.
- [33] Grams B, Harms A, Braun S, Strassburg CP, Manns MP, Obermayer-Straub P. Distribution and inducibility by 3-methylcholanthrene of family 1 UDP-glucuronosyltransferases in the rat gastrointestinal tract. *Arch Biochem Biophys* 2000;377:255–65.
- [34] Munzel PA, Bookjans G, Mehner G, Lehmkoetter T, Bock KW. Tissue-specific 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible expression of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6. *Arch Biochem Biophys* 1996;335:205–10.
- [35] Yokota H, Ohgiya N, Ishihara G, Ohta K, Yuasa A. Purification and properties of UDP-glucuronosyltransferase from kidney microsomes of beta-naphthoflavone-treated rat. *J Biochem* 1989;106:248–52.
- [36] Buetler TM, Gallagher EP, Wang C, Stahl DL, Hayes JD, Eaton DL. Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BHA, ethoxiquin, and oltipraz. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;135:45–57.
- [37] Grove AD, Kessler FK, Metz RP, Ritter JK. Identification of a rat oltipraz-inducible UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A7) with activity towards benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol. *J Biol Chem* 1997;272:1621–7.
- [38] Kessler FK, Ritter JK. Induction of a rat liver benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol glucuronidating activity by oltipraz and beta-naphthoflavone. *Carcinogenesis* 1997;18:107–14.
- [39] van de Kerkhof EG, de Graaf IA, Ungell AL, Groothuis GM. Induction of metabolism and transport in human intestine: validation of precision-cut slices as a tool to study induction of drug metabolism in human intestine in vitro. *Drug Metab Dispos* 2008;36:604–13.
- [40] Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, et al. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology* 2001;33:1232–8.
- [41] Xie W, Yeuh MF, Radominska-Pandya A, Saini SP, Negishi Y, Bottroff BS, et al. Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4150–5.
- [42] Barbier O, Villeneuve L, Bocher V, Fontaine C, Torra IP, Duhem C, et al. The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma target gene. *J Biol Chem* 2003;278:13975–83.
- [43] Yeager RL, Reisman SA, Aleksunes LM, Klaassen CD. Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery". *Toxicol Sci* 2009;111:238–46.
- [44] Emi Y, Ikushiro S, Iyanagi T. Xenobiotic responsive element-mediated transcriptional activation in the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex. *J Biol Chem* 1996;271:3952–8.
- [45] Bock-Hennig BS, Kohle C, Nill K, Bock KW. Influence of t-butylhydroquinone and beta-naphthoflavone on formation and transport of 4-methylumbelliferone glucuronide in Caco-2/TC-7 cell monolayers. *Biochem Pharmacol* 2002;63:123–8.
- [46] Auyeung DJ, Kessler FK, Ritter JK. Mechanism of rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6 induction by oltipraz: evidence for a contribution of the Aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol Pharmacol* 2003;63:119–27.
- [47] Jemnitz K, Veres Z, Vereczkey L. Coordinate regulation of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 induction by 3-methylcholanthrene and multidrug resistance protein MRP2 expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2002;63:2137–44.
- [48] Soars MG, Petullo DM, Eckstein JA, Kasper SC, Wrighton SA. An assessment of udp-glucuronosyltransferase induction using primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2004;32:140–8.
- [49] Carver LA, LaPres JJ, Jain S, Dunham EE, Bradford CA. Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem* 1998;273:33580–7.
- [50] Kress S, Greenlee WF. Cell-specific regulation of human CYP1A1 and CYP1B1 genes. *Cancer Res* 1997;57:1264–9.
- [51] Klinge CM, Jernigan SC, Risinger JE, Lee JE, Tyulmenkov VV, Falkner KC, et al. Short heterodimer partner (SHP) orphan nuclear receptor inhibits the transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT). *Arch Biochem Biophys* 2001;390:64–70.
- [52] Bock KW, Bock-Hennig BS. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): from purification of Ah-receptor-inducible UGT1A6 to coordinate regulation of subsets of CYPs, UGTs, and ABC transporters by nuclear receptors. *Drug Metab Rev* 2009.
- [53] Li J, Shi M, Cao Y, Yuan W, Pang T, Li B, et al. Knockdown of hypoxia-inducible factor-1alpha in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:1341–51.
- [54] Generali D, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Wigfield S, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemioendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:4562–8.
- [55] Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, et al. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* 2004;24:2875–89.
- [56] Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J* 2003;17:503–5.
- [57] Gessner T, Vaughan LA, Beehler BC, Bartels CJ, Baker RM. Elevated pentose cycle and glucuronosyltransferase in daunorubicin-resistant P388 cells. *Cancer Res* 1990;50:3921–7.
- [58] Franklin TJ, Jacobs V, Jones G, Ple P, Bruneau P. Glucuronidation associated with intrinsic resistance to mycophenolic acid in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 1996;56:984–7.

4.2- Article II:

POLYPURINE HAIRPINS DIRECTED AGAINST THE TEMPLATE STRAND OF DNA KNOCK-DOWN THE EXPRESSION OF MAMMALIAN GENES

de Almagro, M.Cristina; Coma, Silvia; Noé, Véronique; Ciudad, Carlos J.

Journal of Biological Chemistry vol. 284, no. 17, pp. 11579–11589, 2009

En aquest treball es van dissenyar els hairpins de polipurines (PPRHs) com a molècules destinades a inhibir l'expressió gènica. Els PPRHs consisteixen en dos dominis de DNA d'homopurines, units entre ells per un pont de 5 timidines. La unió entre aquests dos dominis homopurina es fa mitjançant enllaços tipus Hoogsteen que creen una estructura de pinça. Un dels dominis homopurina, es podrà unir a una seqüència diana de polipirimidines per enllaços Watson-Crick, formant-se així un tríplex.

Es van dissenyar PPRHs contra el gen *dhfr*, que es va agafar com a model. Tot utilitzant una base de dades de recerca de dominis homopurina, es va identificar una regió homopirimidina en la cadena motlle de l'intró 3 del gen *dhfr*. Com a control negatiu es va dissenyar un PPRH que no fos capaç d'establir enllaços Hoogsteen però sí d'unir-se a la seqüència diana, Hp-NH, per estudiar la importància dels enllaços Hoogsteen en l'acció dels PPRHs. També es va dissenyar com a control negatiu Hp-WC, amb enllaços intramoleculars tipus Watson-Crick en comptes de tipus Hoogsteen, es tracta d'una pinça tancada que no es pot unir a la seqüència diana, i permet estudiar l'efecte que té en la cèl·lula la transfecció d'un PPRH. Un altre control negatiu era Hp-Sc, amb una seqüència aleatòria.

Primerament es va estudiar si els PPRHs eren capaços d'unir-se a la seva seqüència diana de polipirimidines, mitjançant assajos de retardació de la mobilitat electroforètica. Es va determinar que tant HpDI3-B com HpDI3-NH eren els únics hairpins capaços d'unir-se a la seqüència diana.

Es va testar l'activitat citotòxica d'aquests PPRHs dirigits contra el gen *dhfr* en cèl·lules de càncer de mama SKBR3, mantingudes en medi selectiu mancant dels productes

finals de l'activitat DHFR (glicina, hipoxantina i timidilat). Es va observar que a una concentració de 100 nM i una relació molar amb el liposoma catiònic DOTAP de 1:100, s'obtenia una mort cel·lular d'un 90%. Hp-NH també causava citotoxicitat però en menor mesura, ja que actua com un aODN amb una cua. Es va estudiar el temps mínim d'acció d'aquestes estructures i es va trobar que a les 24h ja eren molt actius.

Es va passar a l'estudi del mecanisme d'acció, a través de la mesura dels nivells de mRNA de la DHFR, observant-se una notable disminució quan les cèl·lules eren incubades amb HpdI3-B. Així mateix també disminuïa l'activitat DHFR.

Es va procedir a l'estudi de la seva estabilitat amb un PPRH fluorescent i citometria de flux, i es va observar una vida mitja llarga d'aproximadament uns 5 dies.

Un dels principals problemes que podrien tenir els PPRHs fora trobar regions diana exclusivament d'homopirimidines. Per això es va procedir a l'estudi de l'efecte que les interrupcions de purines en la seqüència diana de polipirimidines tindrien en l'activitat dels PPRHs. Es van dissenyar diferents PPRHs que contenien diferents nucleòtids en front de la interrupció, i es va observar que el nucleòtid que aconseguia una major activitat era una adenina.

Es va estudiar l'aplicabilitat terapèutica dels PPRHs dirigits contra el gen *dhfr*, transfectant-los en cèl·lules MCF7 de càncer de mama resistents a 10^{-6} M de metotrexat. En aquestes cèl·lules, en ser incubades amb HpdI3-B, disminuïa la supervivència, els nivells de mRNA de la DHFR i proteïna.

Es van dissenyar també Template-PPRHs contra altres gens d'importància terapèutica, com la *survivina* i la *telomerasa*. Ambdós PPRHs eren molt actius causant citotoxicitat, i aquesta era precedida d'una disminució en els nivells de mRNA dels respectius gens.

Un altre problema que totes les molècules destinades a inhibir l'expressió gènica tenen és l'especificitat. Es van fer anàlisis de BLAST, i també es van determinar els nivells de mRNA de gens no relacionats, i no s'observaren disminucions.

En sumari, els Template-PPRHs són un nou tipus de molècules per disminuir l'expressió gènica que poden ser dirigits contra gens amb importància terapèutica. Aquests poden ser considerats com alternativa a altres molècules destinades a inhibir l'expressió gènica.

Polypurine Hairpins Directed against the Template Strand of DNA Knock Down the Expression of Mammalian Genes*

Received for publication, February 11, 2009, and in revised form, March 3, 2009. Published, JBC Papers in Press, March 3, 2009, DOI 10.1074/jbc.M900981200

M. Cristina de Almagro¹, Silvia Coma², Véronique Noé, and Carlos J. Ciudad³

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

We analyzed whether polypurine hairpins (PPRHs) had the ability to knock down gene expression. These hairpins are formed by two antiparallel purine domains linked by a loop that allows the formation of Hoogsteen bonds between both domains and Watson-Crick bonds with the target polypyrimidine sequence, forming triplex structures. To set up the experimental conditions, the human *dhfr* gene was used as a model. The PPRHs were designed toward the template strand of DNA. The transfection of the human breast cancer cell line SKBR3 with these template hairpins against the *dhfr* gene produced higher than 90% of cell mortality. Template PPRHs produced a decrease in DHFR mRNA, protein, and its corresponding enzymatic activity. In addition, the activity of DHFR PPRHs was tested against breast cancer cells resistant to methotrexate, observing high cell mortality. Given the difficulty in finding long polypyrimidine stretches, we studied how to compensate for the presence of purine interruptions in the polypyrimidine target sequence. The stability of PPRH was measured, resulting in a surprisingly long half-life of about 5 days. Finally, to test the generality of usage, template PPRHs were employed against two important genes involved in cell proliferation, *telomerase* and *survivin*, producing 80 and 95% of cell death, respectively. Taken together our results show the ability of antiparallel purine hairpins to bind the template strand of double strand DNA and to decrease gene transcription. Thus, PPRHs can be considered as a new type of molecules to modulate gene expression.

Repression of gene expression serves as a powerful therapeutic tool to inhibit the synthesis of proteins involved in pathological processes. Among the different molecules that can repress gene expression, triplex forming oligonucleotides (TFOs)⁴ have shown promising results in inhibiting gene tran-

scription (1–3). Triplex DNA is formed when a third DNA strand binds into the major groove of a double helix via Hoogsteen hydrogen bonding. The ability of nucleic acids to form triple helices was discovered in 1957 by Felsenfeld and Rich (4) and since then there have been numerous improvements in the field.

TFOs bind in a sequence-specific manner, but they present stability and binding affinity issues. To address these aspects, circular oligonucleotides (ODN) (5), hairpins, and more recently TFOs with locked nucleic acids (6, 7) were developed. Hairpins consist of two DNA strands linked by a loop (8–12), and can be either parallels or antiparallels. Antiparallel hairpins are more promising in the biomedical field, because triplex forms regardless of pH, whereas in most cases, parallel hairpins require an acidic pH (13–16). According to the rules of Hoogsteen bonds, antiparallel hairpins bind to polypyrimidine stretches in the DNA target sequence, whereas parallel hairpins bind to polypurine stretches.

The intramolecular linkage of the hairpin is formed by reverse Hoogsteen bonds, and the union with the target sequence is mediated by Watson-Crick, d(G#G·C) and d(A#A·T). Accordingly, PPRHs (polypurine reverse Hoogsteen) are formed by two antiparallel homopurine domains linked by a five-thymidine loop (11, 17). One of the homopurine strands binds with antiparallel orientation (by Watson-Crick) to the polypyrimidine target sequence forming a triplex. Although it might be thought as difficult to find polypyrimidine stretches, triplex-forming oligonucleotide target sequences are more common in the human genome than predicted by random models, and they can be found mainly in regulatory regions, opening interesting possibilities for the use of triplexes in the control of gene expression (18, 19).

We previously reported the ability of PPRHs to effectively bind dsDNA (17) displacing the fourth strand away from the newly formed triplex. Here we describe the design and utilization of template PPRHs that bind to dsDNA as a new tool to decrease gene expression. This approach is different to that exerted by TFOs interfering with gene transcription (20–22). As a model, we used as targets polypyrimidine sequences in the third intron of the dihydrofolate reductase (*dhfr*) gene, whose product is involved in the *de novo* synthesis of purines and TMP. We also evaluated the therapeutic ability of PPRHs targeting the *telomerase* and *survivin* genes. The cytotoxic activity of PPRHs when targeted at these essential genes was tested using human breast cancer cells. We also targeted the *dhfr* gene with PPRHs in cells resistant to methotrexate chemotherapy.

* The work was supported by Grants SAF05-0247 and SAF08-43 from "Plan Nacional de Investigación Científica" (Spain) and ISCIII-RETIC RD06/0020/0046. Our research group holds the Quality mention from the "Generalitat de Catalunya."

¹ Recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI).

² Present address: Dept. of Surgery, Children's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34934034455; Fax: 34934024520; E-mail: cciudad@ub.edu.

⁴ The abbreviations used are: TFO, triplex forming oligonucleotide; PPRHs, polypurine reverse Hoogsteen hairpins; *dhfr*, dihydrofolate reductase; *tert*, telomerase; *birc5*, *survivin*; *aprt*, adenine phosphoribosyltransferase; aODN, antisense oligodeoxynucleotide; DOTAP, *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate; dsDNA, double-stranded DNA; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; RT, reverse transcriptase; siRNA, small interfering RNA; nt, nucleotide(s).

PPRHs, A New Tool to Knock Down Gene Expression

The success of the latter might open a new way to fight against cancer.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

PPRHs Design and Usage

The PPRHs used in this study were made up of two antiparallel polypurine domains, bound by intramolecular reverse Hoogsteen bonds, and linked by a pentathymidine loop. The Triplex-Forming Oligonucleotide Target Sequence Search software, (Anderson Cancer Center; www.spi.mdanderson.org/tfo), was used to find the polypyrimidine stretches in the target sequence. BLAST analyses were performed to check for the specificity of all these sequences. Non-modified oligodeoxynucleotides were synthesized by Sigma Genosys (0.05 μmol scale). Purity was checked by gel electrophoresis. All concentrations were expressed in strand molarity. PPRHs were dissolved in sterile RNase-free TE buffer (1 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 8.0) and stored at -20°C until use.

Binding Analysis

Preparation of Polypurine/Polypyrimidine Duplexes—The duplexes to be targeted by the hairpins were formed by mixing 25 μg of each single-stranded polypurine and polypyrimidine oligodeoxynucleotides in 150 mM NaCl. After incubation at 90°C for 5 min, solutions were allowed to cool down slowly to room temperature. Duplexes were purified in a non-denaturing 20% polyacrylamide gel and quantified by their absorbance at 260 nm at 25°C .

Oligodeoxynucleotide Labeling—One hundred ng of single or double-stranded oligodeoxynucleotide was 5'-end labeled with [γ - ^{32}P]ATP by T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) in a 10- μl reaction mixture, according to the manufacturer's protocol. After incubation at 37°C for 1 h, 90 μl of TE buffer (1 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 8.0) was added to the reaction mixture, which was subsequently filtered through a Sephadex G-50 spin column (GE Healthcare) to eliminate the excess [γ - ^{32}P]ATP.

Electrophoretic Mobility Shift Assay—Triplex formation was analyzed by incubating radiolabeled single or double-stranded DNA targets (2 nM strand concentration; 20,000 cpm) in the presence or absence of unlabeled PPRHs (250 nM strand concentration) in a buffer containing 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl and 50 mM HEPES, pH 7.2. Binding reactions (20 μl) were incubated 45 min at 37°C before the electrophoresis. Electrophoresis was performed on a non-denaturing 12% polyacrylamide gel containing 10 mM MgCl_2 , 5% glycerol, and 50 mM HEPES, pH 7.2. Gels were run for 3–4 h at 190 V at 4°C , dried, and analyzed on a Storm 840 PhosphorImager (GE Healthcare). Quantification was performed using the ImageQuant 5.2 software (GE Healthcare).

Cell Culture

SKBR3 breast cancer cells were grown in Ham's F-12 medium containing 7% fetal bovine serum (Invitrogen), and incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. MCF7-R are breast cancer cells resistant to 10^{-6} M methotrexate, generated in our laboratory, bearing amplification of the

dhfr locus. This cell line was grown in Ham's F-12 medium lacking the final products of DHFR activity: glycine, hypoxanthine, and thymidine ($-$ GHT medium (23)) containing 7% of dialyzed fetal bovine serum (Invitrogen). Cells were detached with 0.05% trypsin (Sigma).

Transfection

SKBR3 or MCF7-R cells were plated in 35-mm plates. PPRHs were mixed with *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP, Roche) at the appropriate oligonucleotide-DOTAP molar ratio (1:10–1:100) for 15 min at room temperature before lipofecting the cells.

MTT Assay

SKBR3 or MCF7-R cells (10,000) were plated in 35-mm plates. MTT assays using PPRHs against *dhfr* were performed in $-$ GHT medium. After 7 days, 500 μg of MTT (Sigma) and 5.6 mg of succinate (Sigma) were added and allowed to react for 3 h at 37°C before the addition of the solubilization reagent (0.57% acetic acid and 10% SDS in dimethyl sulfoxide). Cell viability was measured at 570 nm in a WPA S2100 Diode Array Spectrophotometer.

mRNA Analysis

72 h after PPRH transfection, total RNA from 30,000 SKBR3 or MCF7-R cells, was extracted using the UltraspecTM RNA Kit (Biotech), according to the manufacturer's specifications. The amount of RNA was determined by measuring its absorbance (260 nm) at 25°C in a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer.

cDNA was synthesized in a 20- μl reaction mixture containing 0.2–0.5 μg of total RNA, 125 ng of random hexamers (Roche), 10 mM dithiothreitol, 20 units of RNasin (Promega), 0.5 mM dNTPs (AppliChem), 4 μl of $5\times$ reverse transcriptase buffer, and 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (RT) (Invitrogen). The reaction mixture was incubated at 37°C for 1 h. Three μl of the cDNA mixture was used for PCR amplification by real time.

Real Time-PCR—The reaction was performed using the ABI-Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). For *dhfr*, *ugt1a10*, and *s100A4* (the two latter were used when checking for PPRH specificity), the reaction was carried out in a final volume of 20 μl , containing $1\times$ TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems), $1\times$ TaqMan probe (Applied Biosystems), 3 μl of cDNA and H_2O . For telomerase (*tert*) and survivin (*birc5*), a SYBR Green PCR was performed in a final volume of 20 μl , containing $1\times$ SYBR Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems), 0.25 μM of reverse and forward primers (Ecogen), 3 μl of cDNA and H_2O . Either for the TaqMan or the SYBR Green reactions, the adenosylphosphoribosyl transferase (*APRT*) mRNA was used to normalize the results. The primer sequences were: *Tert*-Fw, 5'-AGGAGCTGACGTGGAAGATG-3', *Tert*-Rv 5'-GCTCGACGACGTACACACTC-3'; *Surv*-Fw, 5'-AGCCAGATGACGACCCCATAG-3', *Surv*-Rv, 5'-CACAGGAAGGCTGGTGGCAC-3'; *Aprt*-Fw, 5'-GCAGCTGGTTGAGCAGCGGAT-3', *Aprt*-Rv, 5'-AGAGTGGGGCCTGGCAGCTTC-3'. PCR cycling conditions were 2

TABLE 1

Sequence of the PPRHs used in this study and their target sequences

Bold letters indicate mismatches between the target sequence and the PPRH and underlined letters indicate the extra sequences that do not follow Watson-Crick or Hoogsteen rules.

Name	Sequence
<i>dhfr</i> target 1 template	Target sequence intron 3, reverse strand: 5'-(CATTCTCTGATTG) CCTCCTCCCTCTCCCTCCTC-3'
Hpd13-B	5'-GGAGGAGGGAGAGGGAGGAG-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-3'
Hpd13-T	5'-GGAGGAGGGAGAGGGAGGAG-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG CAATCAAGAGAATG -3'
Hpd13-BT	5'- <u>AGAGAGAAAAA</u> AGGAGGAGGGAGGGAGGAG-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG AAAAAAGAGAA -3'
Hpd13-WC	5'-CCTCCTCCTCTCCCTCCTC-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-3'
Hpd13-NH	5'-AAGAAGAAAGAGAAAGA-(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-3'
Hpd13-Sc	5'-GAGAGGAGGAGGGAGGGAGA-(T) ₅ -AGAGGGAGGGAGGAGGAGAG-3'
Hpd13-C	5'-GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-(T) ₅ -GGAGGAGGGAGAGGGAGGAG-3'
Hpd13-BF	5'- <u>FGGAGGAGGGAGGGAGGGAGG</u> -(T) ₅ -GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG-3'
<i>dhfr</i> target 2 template	Target sequence intron 3, reverse strand: 5'-AA (CTCC ACT CCCCCTTCCCCC) AA-3'
Hpd13-misTA	5'-GGGGGAAGGGGGG AGCAGG AG-(T) ₅ -GAGG AG AGGGGGGAAGGGGGG-3'
Hpd13-misTG	5'-GGGGGAAGGGGGG AGGGAG -(T) ₅ -GAGG GG AGGGGGGAAGGGGGG-3'
Hpd13-misTT	5'-GGGGGAAGGGGGG ACTGG AG-(T) ₅ -GAGG TG AGGGGGGAAGGGGGG-3'
<i>dhfr</i> target 3 template	Target sequence intron 3, reverse strand: 5'-TT (CCT G TTTCTCTCCCCCTTCT) TG-3'
Hpd13-misCA	5'-GAAGAGGGGAGAGAA AAAGG -(T) ₅ -G GA AAAGAGAGGGGGAGAA G -3'
Tert template	Target sequence intron 8, reverse strand: 5'-CCTCCT GC TTCTCCCTCC CT TCCTT GT CCT-3'
Hpt18-B	5'-GGAGGA AGGA AGGAGGG AGA AGGAA AGGA -(T) ₅ -AG GA AAAGGAAGAGGGAGGAAG GA AGGAGG-3'
Hpt18-WC	5'-CCTCCT TC CTTCTCC CT CTCTCT TT TCCT-(T) ₅ -AG GA AAAGGAAGAGGGAGGAAG GA AGGAGG-3'
Hpt18-Sc	5'-AAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGG-(T) ₅ -G GA AGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA A -3'
<i>birc5</i> template	Target sequence exon 3, reverse strand: 5'-CT GC CTTCTCTCCCTC ACT TCT CA CT-3'
HpsE3-B	5'-GA AGGA AAGAGGGAG AGA AGAG AGGA -(T) ₅ -AG GA AGAA GA AGGGAGGAAGAA GA AG GA -3'
<i>birc5</i> promoter	Target sequence promoter, reverse strand: 5'-CCCTCC CA CCCGCC CA TTCTTT-3'
HpsPr-B	5'-GGGAGGG AGGGG AGGGG AA AGAAA-(T) ₅ -AAAGAA AGGGG AGGGG AGGG AGGGG-3'
HpsPr-Sc	5'-AAGAGAAAAGAGAAAGAAAGAGAGGG-(T) ₅ -GGGAGAGAAAGAAAGAGAAAAGAGAA-3'
HpsPr-WC	5'-CCCTCC CT CCCTC CT CCCTT CT TT-(T) ₅ -AAAGAA AGGGG AGGGG AGGG AGGGG-3'

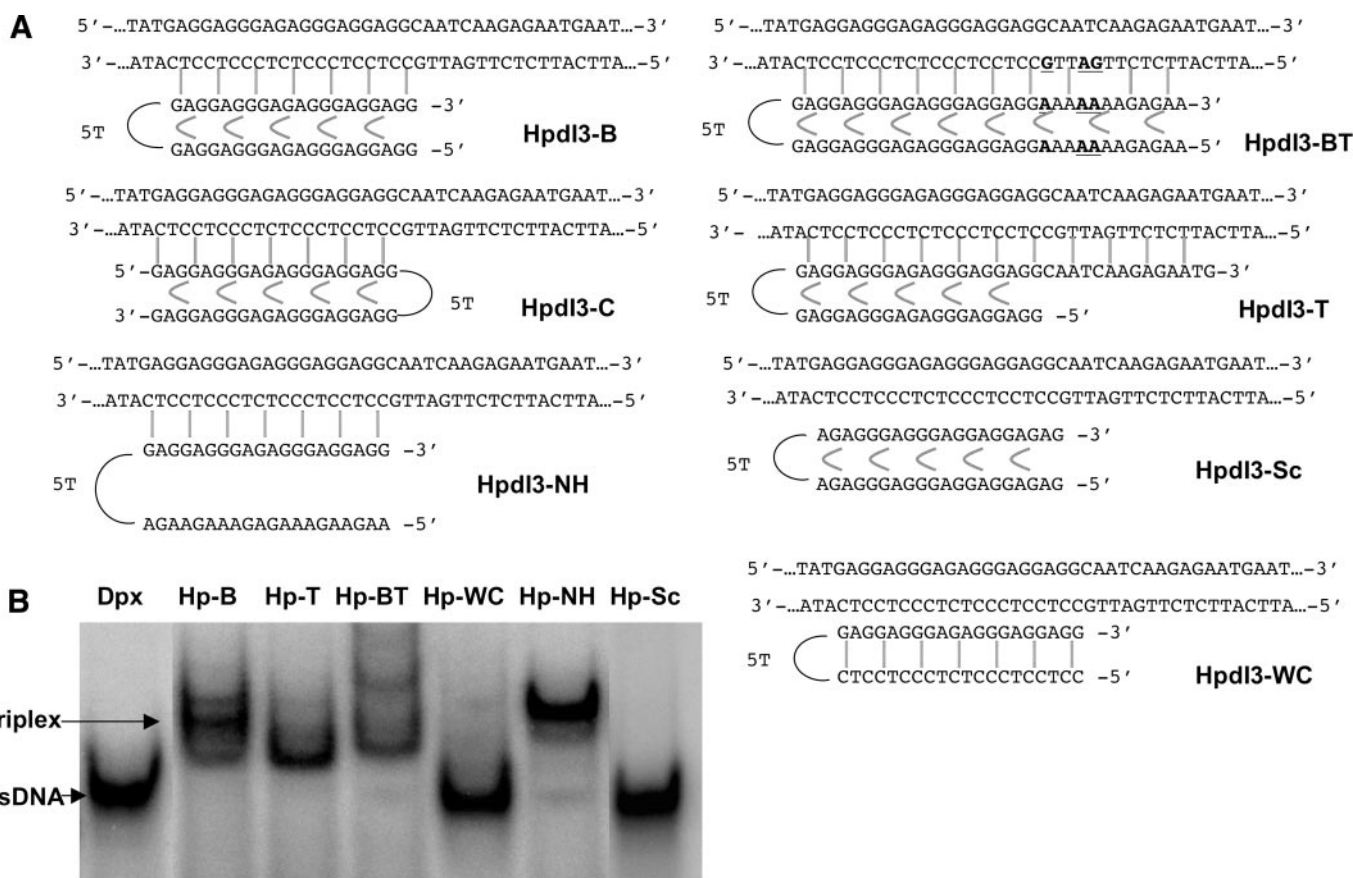


FIGURE 1. Binding of PPRHs to polyurine/polypyrimidine target sequence-1 in the *dhfr* gene. A, schematic representation of the binding of the PPRHs to the dsDNA *dhfr* target-1 in intron 3 of the *dhfr* gene. B, binding of the different PPRHs to 20,000 cpm of [³²P]-*dhfr* target-1. Dpx, duplex free target; Hp-B, hairpin Hpd13-B (blunted); Hp-T, hairpin Hpd13-T (tailed); Hp-BT, hairpin Hpd13-BT (tailed and blunted); Hp-WC, hairpin Hpd13-WC (Watson-Crick); Hp-NH, Hpd13-NH (no Hoogsteen) and Hp-Sc (scrambled). Arrows indicate the bands corresponding to the duplex or triplex in the image obtained by PhosphorImaging.

min at 50 °C, 10 min denaturation at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The mRNA amount of the target gene, normalized to APRT, was given by the $\Delta\Delta C_T$

method, where C_T is the threshold cycle indicating the fractional cycle number at which the amount of amplified mRNA reached threshold.

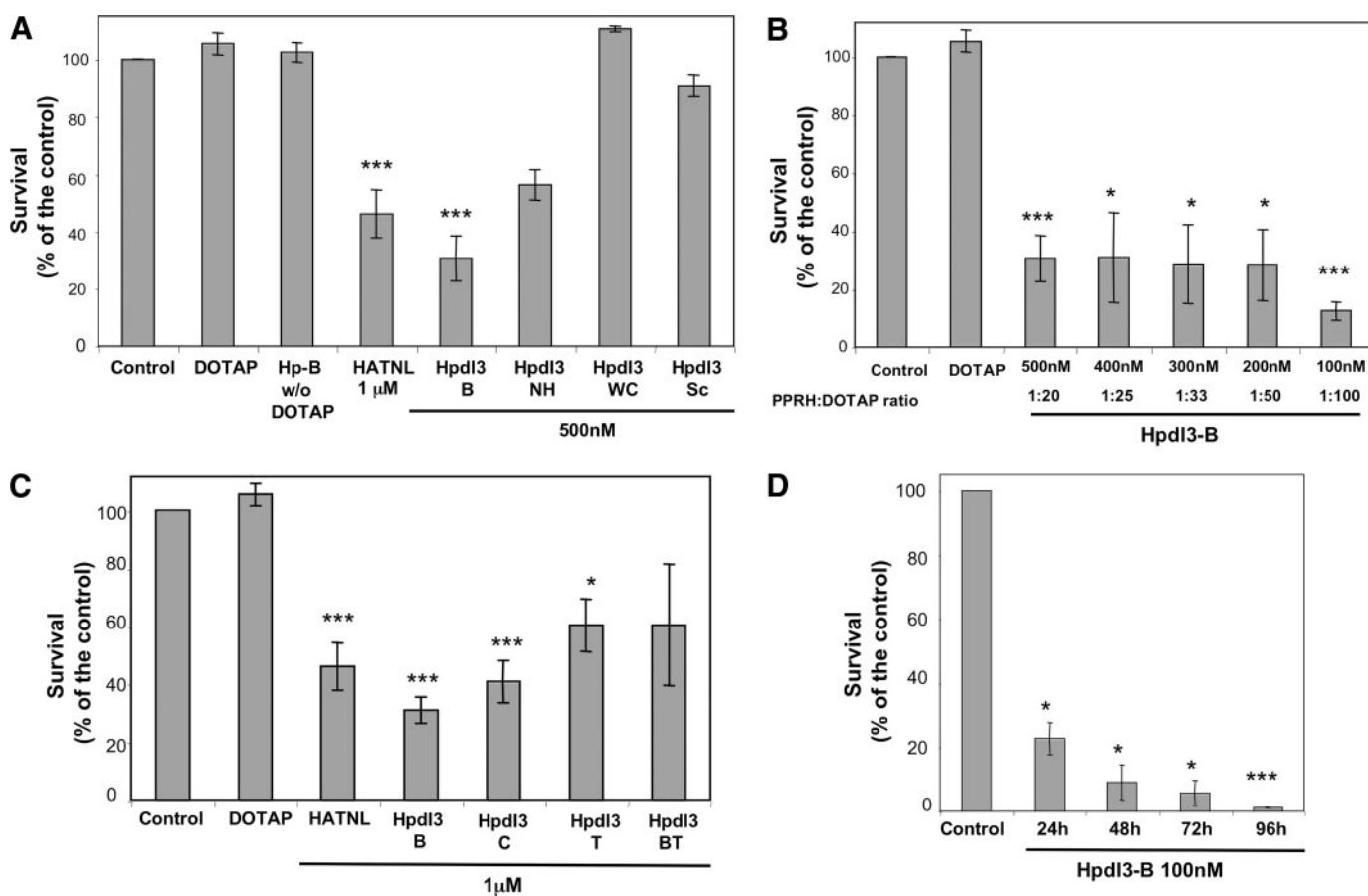


FIGURE 2. Cytotoxicity caused by template-PPRHs designed against *dhfr* target-1. A, comparison of the cytotoxic effect of HpdI3-B with that of the negative controls HpdI3-WC and HpdI3-Sc, and the no Hoogsteen variant at a concentration of 500 nM transfected with 10 μ M DOTAP. The effect of the antisense HATNL-24 at 1 μ M was also tested. B, study of the best PPRH:DOTAP molar ratio to attain maximum cytotoxicity. Hairpin HpdI3-B was incubated at varying concentrations in combination with a fixed concentration of 10 μ M DOTAP. C, different template structures related to HpdI3-B were tested: HpdI3-C (contrary), HpdI3-T (tailed), HpdI3-BT (tailed and blunted), all at a concentration of 1 μ M transfected with 10 μ M DOTAP. D, determination of the optimal time for PPRH action. The medium of the cell was changed at the indicated times after transfection of 100 nM HpdI3-B with 10 μ M DOTAP. For all conditions, 10,000 SKBR3 cells were plated in F-12-GHT medium and 1 week after treatment an MTT assay was performed. Data represent the mean \pm S.E. of at least four experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$.

Western Analysis

MCF7-R cells were used to detect DHFR protein. 30,000 MCF7-R were plated in 35-mm plates and treated with PPRHs. 72 h after transfection, total protein extracts were obtained after scraping the cells in lysis buffer (50 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, supplemented with Protease Inhibitor Mixture by Sigma). The extracts were maintained at 4 °C for 1 h with vortexing every 15 min. Cell debris was removed by centrifugation (10,000 \times g for 10 min). Protein concentrations were determined by the Bio-Rad protein assay (based on the Bradford method, using bovine serum albumin as a standard (Sigma)).

Total protein cell extracts (35 μ g) were electrophoresed on SDS-12% polyacrylamide gels, and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon P, Millipore) using a semidry electroblotter. The membranes were probed with antibodies against DHFR (Davids Biotechnologie) and tubulin (Calbiochem) to normalize the results. Signals were detected by secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:2500 dilution) (GE Healthcare) and enhanced chemiluminescence, as recommended by the manufacturer (GE Healthcare). Quantification was performed using ImageQuant 5.2 (GE Healthcare).

DHFR Activity Assay

72 h after PPRH transfection, DHFR activity was determined by incorporation of radioactive deoxyuridine to cellular DNA (24), with the following modifications: 10,000 SKBR3 cells were plated in 35-mm plates with 1 ml of -T medium (Ham's F-12 medium lacking thymidine). Twenty-four hours before collecting the cells, 2 μ Ci of 6-[³H]deoxyuridine were added. The cells were then rinsed twice in 2 ml of phosphate-buffered saline and lysed in 100 μ l of 0.1% SDS. The lysate was collected on Whatman 31ET papers (2.5 \times 2.5 cm), which were immediately placed onto ice-cold 66% ethanol containing 250 mM NaCl, to precipitate DNA. After 3 washes in the same solution, the papers were dried and tritium was counted using liquid scintillation mixture (Cytoscint, MP).

Flow Cytometry

The uptake of a fluorescein-labeled PPRH was monitored by flow cytometry on a Beckman Coulter Epics XL cytometer. 100,000 SKBR3 cells were plated in 35-mm dishes with Ham's F-12 medium and transfected with HpdI3-B fluoresceinated in the 5' end (HpdI3-BF, Sigma). Cells were collected in 500 μ l of ice-cold Ham's F-12 medium, centrifuged at 1,000 \times g at 4 °C

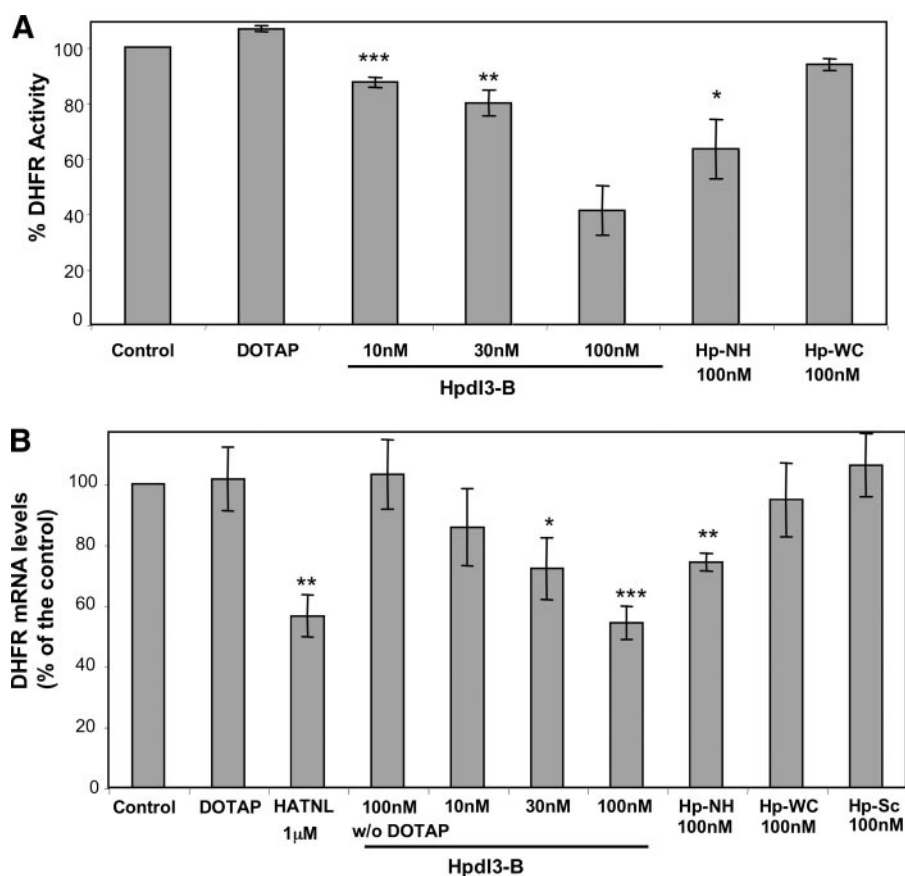


FIGURE 3. **DHFR activity and mRNA levels upon incubation of SKBR3 cells with template-PPRHs.** *A*, dose response of the effect of hairpin HpdI3-B on DHFR activity. 10,000 SKBR3 cells were incubated in Ham's F-12 medium lacking thymidine either with 10 μ M DOTAP alone or with HpdI3-B at the indicated concentrations. HpdI3-NH and HpdI3-WC were also used at 100 nM. Two days after transfection, 6-[3 H]deoxyuridine was added for 24 h to determine DHFR activity by its incorporation into DNA. Data represent the mean \pm S.E. of three experiments. *B*, dose response of the effect of hairpin HpdI3-B on DHFR mRNA levels. 30,000 SKBR3 cells were incubated either with 10 μ M DOTAP alone or HpdI3-B at the indicated concentrations. Negative controls, Hp-WC and Hp-Sc as well as Hp-NH were used at 100 nM. For comparative purposes the effect of aODN HATNL-24 was also tested at 1 μ M. Three days after transfection, DHFR mRNA levels were determined by RT-real time-PCR using APRT mRNA to normalize the results. Data represent the mean \pm S.E. of five experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$.

for 5 min, and washed twice in phosphate-buffered saline. The pellet was finally resuspended in 500 μ l of phosphate-buffered saline. Propidium iodide (10 μ g/ml, Sigma) was added and cells were kept on ice until the cytometric analysis. The percentage of fluorescein-positive cells after subtraction of the IP-positive fraction (dead cells) was used to express the cellular uptake of the PPRH.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm S.E. Statistical analysis was performed using Student's *t* test using SPSS 13.0 software for Mac OS X. Results were considered significant if $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), or $p < 0.005$ (***)

RESULTS

Design of PPRHs—We searched for polypyrimidine stretches within the human dihydrofolate reductase (*dhfr*), telomerase (*tert*), and survivin (*birc5*) genes, with a length of at least 20 or more bases to avoid PPRH unspecificity. Three polypyrimidine stretches were selected in the template strand of the *dhfr* gene

(Table 1). All sequences were located within intron 3. *Dhfr* target-1 had no purine interruptions in the polypyrimidine stretch, whereas *dhfr* target-2 and -3 contained one purine interruption each, A and G, respectively. Template-PPRH Hp-B (blunted) was designed to bind the polypyrimidine reverse strand of the double helical DNA target by Watson-Crick base pairing. Additionally, PPRHs with the Watson-Crick domain extended with a tail (Hp-T), with both domains extended (Hp-BT, blunted and tailed) or with the loop on the contrary side (Hp-C) of the hairpin structure, were used. As negative control PPRHs, oligonucleotides bearing either: scrambled sequences (Hp-Sc) or intramolecular Watson-Crick bonds instead of Hoogsteen bonds (Hp-WC) were used. The effect of structures without the ability to form intramolecular reverse Hoogsteen bonds (No Hoogsteen, Hp-NH) but maintaining the target-binding domain was also explored. An antisense oligonucleotide (HATNL-24, 5'-gat-GcAGtttAGcGAaccAAccaT-3'), bearing the phosphothioate modification (at the 3' of the bases indicated in lowercase) directed against the translational start of the *dhfr* gene, was used to test the responsiveness of cells when DHFR mRNA was targeted (25). The selected tem-

plate-PPRH against the *telomerase* gene was located in intron 8, and contained three purine interruptions. Regarding *survivin*, template-PPRHs were targeted toward exon 3 and the promoter region, and both contained three purine interruptions. To check for the specificity of all these sequences BLAST analyses were performed. The PPRHs sequences are listed in Table 1 and their structures and targets are depicted in Figs. 1A, 6, A and B, 7A, and 8A.

Binding of PPRHs to Polypurine/Polypyrimidine dsDNA—The ability of PPRHs to bind their target sequence was tested by gel-shift assays. In Fig. 1B, the bindings of template-PPRHs to a duplex DNA containing the *dhfr* target 1 sequence are shown. We can observe a retardation of the duplex incubated with the three template-PPRHs (HpdI3-B, HpdI3-T, and HpdI3-BT) as compared with the probe alone. The negative controls HpdI3-WC and HpdI3-Sc did not cause any shift in mobility, indicating a lack of union between the PPRH and the duplex, whereas HpdI3-NH is responsible for a mobility retardation similar to that experimented by HpdI3-B. Binding specificity was tested by the addition of 2 μ g of tRNA to the incubation

PPRHs, A New Tool to Knock Down Gene Expression

reaction. Although template-PPRH can bind to ssDNA (data not shown), this molecular species cannot be found in the cellular context.

Cytotoxicity of *dhfr* PPRHs—We analyzed the effect of PPRHs on SKBR3 survival (Fig. 2A). Template-PPRH HpdI3-B was lipofected with DOTAP, provoking 70% of cytotoxicity after 1 week of incubation, whereas the aODN HATNL-24, used for comparative purposes, produced 50% of cell death. DOTAP alone, at the concentration used to transfect PPRHs, HpdI3-B without DOTAP and the negative controls HpdI3-WC and HpdI3-Sc did not affect cell survival. HpdI3-NH showed a 43% cytotoxicity acting just as antisense. Increasing PPRH:DOTAP ratios in combination with decreasing HpdI3-B concentrations ranging from 500 to 100 nM with 10 μ M DOTAP were tested to study the optimal PPRH:DOTAP relation (Fig. 2B). The best results were obtained with 100 nM HpdI3-B, 1:100 PPRH:DOTAP molar ratio, producing 87% cell mortality.

Modifications in the PPRH structure were also studied (Fig. 2C). HpdI3-C is equivalent to HpdI3-B but with the loop on the other side. This change of orientation did not cause an increment in activity. HpdI3-T (tailed in the Watson-Crick domain) and HpdI3-BT (tailed and blunted) bear a single or double strand elongated sequence, respectively (see Table 1). Both produced less cytotoxicity than HpdI3-B.

The time needed for HpdI3-B to develop its cytotoxic action was also studied. After treatment, PPRHs and liposome were removed by changing the medium at time intervals of 24 h for 4 days. Incubation of cells with HpdI3-B for 24 h already provoked high cell mortality, achieving 99% cytotoxicity when the cells were incubated with HpdI3-B for 96 h (Fig. 2D).

Effects of PPRHs on DHFR Activity—The remaining DHFR activity in SKBR3 cells after 72 h of treatment with PPRHs was measured by the [3 H]deoxyuridine assay. As shown in Fig. 3A, template-PPRH HpdI3-B was able to decrease DHFR activity in a dose-dependent manner, causing a drop in activity of about 60% at the concentration of 100 nM, using a 1:100 PPRH:DOTAP molar ratio. Transfection with DOTAP or with the negative control HpdI3-WC did not affect significantly DHFR activity, whereas HpdI3-NH caused a 47% decrease in activity.

Effects of PPRHs on DHFR mRNA Levels—DHFR mRNA levels were determined by RT-real time-PCR 72 h after incubation with different PPRHs. HpdI3-B provoked a dose-dependent reduction in DHFR mRNA levels, reaching almost a 50% decrease upon cells lipofection with a concentration of 100 nM (Fig. 3B). Both HATNL-24 (aODN) and HpdI3-NH (No Hoogsteen) were also able to decrease DHFR mRNA. DOTAP alone and the negative control HpdI3-WC (Watson-Crick) and HpdI3-Sc (Scrambled) did not produce a reduction in DHFR mRNA.

Effects of PPRHs on Methotrexate-resistant Cells—The possible therapeutic action of PPRHs against *dhfr* was tested in breast cancer cells resistant to 10^{-6} M methotrexate. MCF7-R cells showed a 70% cell mortality after transfection with template-HpdI3-B, 100 nM 1:100 PPRH:DOTAP molar ratio, whereas no significant cytotoxicity was observed with the antisense oligonucleotide HATNL-24 (Fig. 4A). HpdI3-NH also produced a noticeable decrease in cell survival (52%). In this

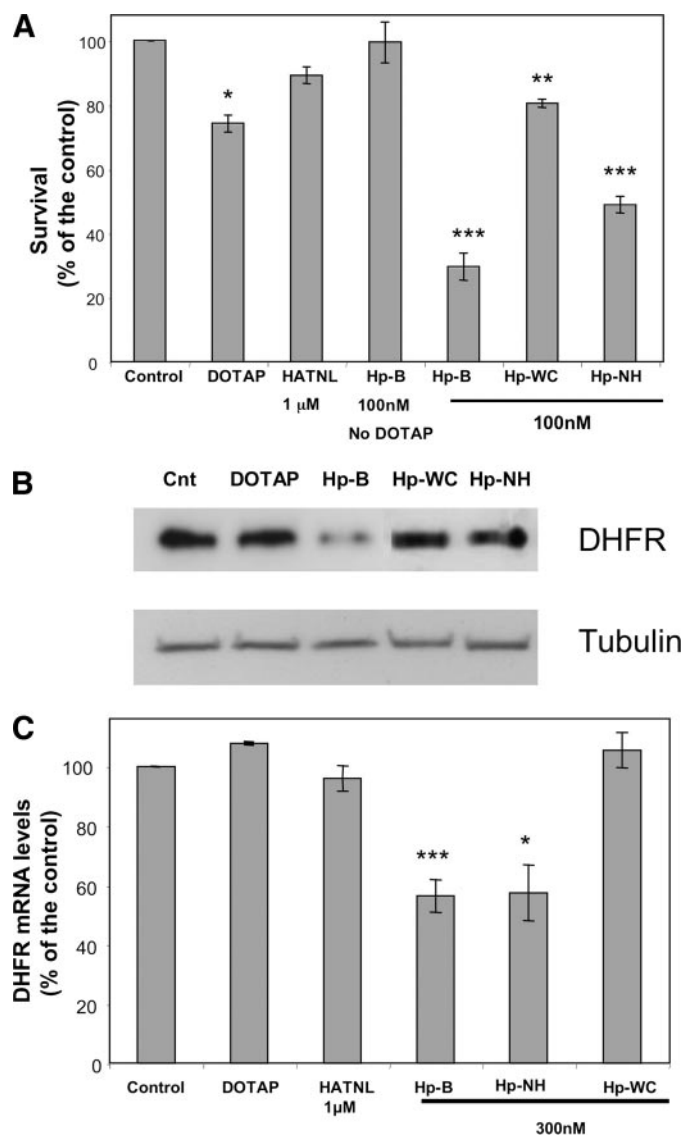


FIGURE 4. Effects of template-PPRHs directed against the *dhfr* gene in MCF7 cells resistant to 10^{-6} M methotrexate. A, cytotoxicity. 10,000 MCF7-R cells were plated in DHFR selective medium ($-$ GHT). Cells were incubated with hairpins HpdI3-B, HpdI3-NH, or HpdI3-WC at the indicated concentrations and 10 μ M DOTAP. A week after treatment an MTT assay was performed. Data represent the mean \pm S.E. of at least four experiments. B, DHFR protein levels. 30,000 MCF7-R cells were incubated with DOTAP alone (30 μ M), or in combination with 300 nM of the indicated PPRHs. Three days after transfection, DHFR protein levels were determined by Western blot using tubulin to normalize the results. A representative image of DHFR and tubulin levels after PPRH treatment is shown. C, DHFR mRNA levels. 30,000 MCF7-R cells were incubated with 30 μ M DOTAP alone, aODN HATNL-24, and the indicated PPRHs. Three days after transfection, DHFR mRNA levels were determined by RT-real time-PCR using the signal corresponding to APRT mRNA to normalize the results. Data represent the mean \pm S.E. of at least four experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$.

case, DOTAP alone and the negative control HpdI3-WC provoked a certain degree of cytotoxicity. For comparison purposes, when using a siRNA against DHFR (siRNA-DHFR: 5'-AAUGAGCUCCUUGUGGAGGTT-3') at 100 nM, the cytotoxic effect was only 30%.

DHFR protein levels in MCF7-R cells were analyzed by Western blot 72 h after transfection with different PPRHs. Fig. 4B is a representative blot of DHFR protein levels after PPRH treatment. As shown in Fig. 4B, a clear decrease in DHFR protein

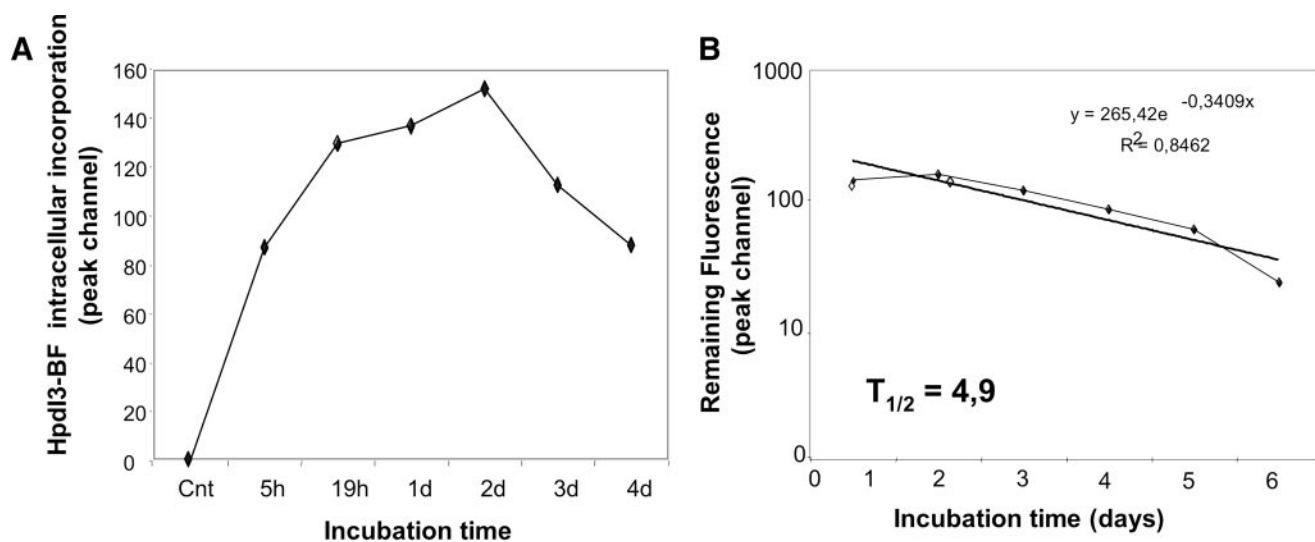


FIGURE 5. **Uptake and degradation of HpdI3-BF.** 100,000 SKBR3 cells were plated in Ham's F-12 medium and incubated with 500 nM HpdI3-BF and 10 μ M DOTAP. **A**, cells were harvested at different times and intracellular fluorescence was determined by flow cytometry. **B**, 24 h after transfection the medium was renewed to eliminate the remaining HpdI3-BF. Cells were harvested at different times and intracellular fluorescence was determined by flow cytometry. HpdI3-BF half-life was obtained after calculating the curve fit. Data represent the mean of three experiments.

levels (48%) was observed when cells were treated with template-HpdI3-B, 300 nM, whereas HpdI3-NH just caused a 30% decrease. In contrast, when treating cells with either DOTAP alone or the template negative control Hp-WC, no significant decrease in the protein levels was observed.

DHFR mRNA levels in MCF7-R cells were determined 72 h after PPRH transfection and analyzed by RT-real time-PCR. Template-PPRHs HpdI3-B and HpdI3-NH produced a significant drop of DHFR mRNA (56% of the control) (Fig. 4C), whereas DOTAP alone, aODN HATNL-24, and the negative control HpdI3-WC did not cause significant changes in DHFR mRNA levels.

PPRH Uptake and Stability—To analyze the intracellular amount of PPRHs after transfection, the fluorescence levels of cells transfected with a fluorescent PPRH was analyzed by flow cytometry at different times after transfection. The mean fluorescence rose gradually to reach its maximum value at 48 h. From that point the mean fluorescence started to decrease (Fig. 5A).

The half-life of fluorescent PPRH was determined by performing a wash out assay after 24 h of transfection. A slow decrease in fluorescence in cells during the first 5 days was observed, followed by a marked drop between the fifth and the sixth day. The half-life was about 5 days (Fig. 5B).

Effects of PPRHs on Targets Containing Purine Interruptions—In the case of purine interruptions in the target sequence, we explored the best nucleotide to be used in the template-PPRH to compensate for the presence of the interruption. PPRHs with the same sequence except for the nucleotide matching the purine interruption were tested (Fig. 6, A and B). Two different target sequences in the *dhfr* reverse DNA strand containing purine interruptions were found, one containing an A (target-2) and the other a G (target-3). For the reverse DNA target sequence that contained an A, three template-PPRHs were designed: HpdI3-MisTA (containing an A in front of the A of the reverse strand), HpdI3-MisTG (containing a G in front of the A of the target strand), and HpdI3-MisTT (containing a T in

front of the A of the reverse strand). All PPRHs bound to ssDNA-Rev, which confirmed the ability of PPRHs to form triple helices with polypyrimidine ssDNA. As expected, no binding was observed between PPRHs and the polypurine single strand DNA-For (Fig. 6, A and B). The differences in triplex formation among these PPRHs and their dsDNA target sequence were quantified by measuring the amount of triplex formed. HpdI3-MisTT had the weakest binding affinity to dsDNA (28% binding compared with the probe alone), whereas HpdI3-MisTA and HpdI3-MisTG had similar affinity (37 and 42%, respectively to dsDNA) (Fig. 6A).

Regarding the *dhfr* reverse DNA target sequence containing a G, we used the template-PPRH HpdI3-MisCA (containing an A in front of the G of the target strand) because previous studies in our group revealed that it produced the most stable binding. The binding affinity of HpdI3-MisCA with its corresponding duplex target sequence (*dhfr*-target-3) was 72% (Fig. 6B), in agreement with previous results obtained in our laboratory (17) that pointed out that adenine was the best option for a guanine interruption.

The cytotoxic effect of PPRHs targeting sequences bearing one-base interruption was analyzed in SKBR3 cells. The selection of the PPRHs HpdI3-MisTA, HpdI3-MisTG, and HpdI3-MisCA was made according to the results obtained in the binding assays (Fig. 6, A and B). As we can observe in Fig. 6C, HpdI3-MisTA had a higher cytotoxicity than HpdI3-MisTG, and similar to that caused by HpdI3-MisCA. However, all the PPRHs containing an interruption showed lower cell mortality than HpdI3-B, without interruptions in the target strand.

Effects of Telomerase PPRHs—PPRHs targeting the *telomerase* gene were designed following the same strategy as with the *dhfr* gene (Fig. 7A). HptI8-B was directed to a 30-nt polypurine/polypyrimidine stretch in the intron 8 and bore 3-purine interruptions. The cytotoxicity caused by a 100 nM HptI8-B, 1:100 PPRH:DOTAP molar ratio, on SKBR3 cells was 90% (Fig. 7B). No cell mortality was observed when cells were transfected with

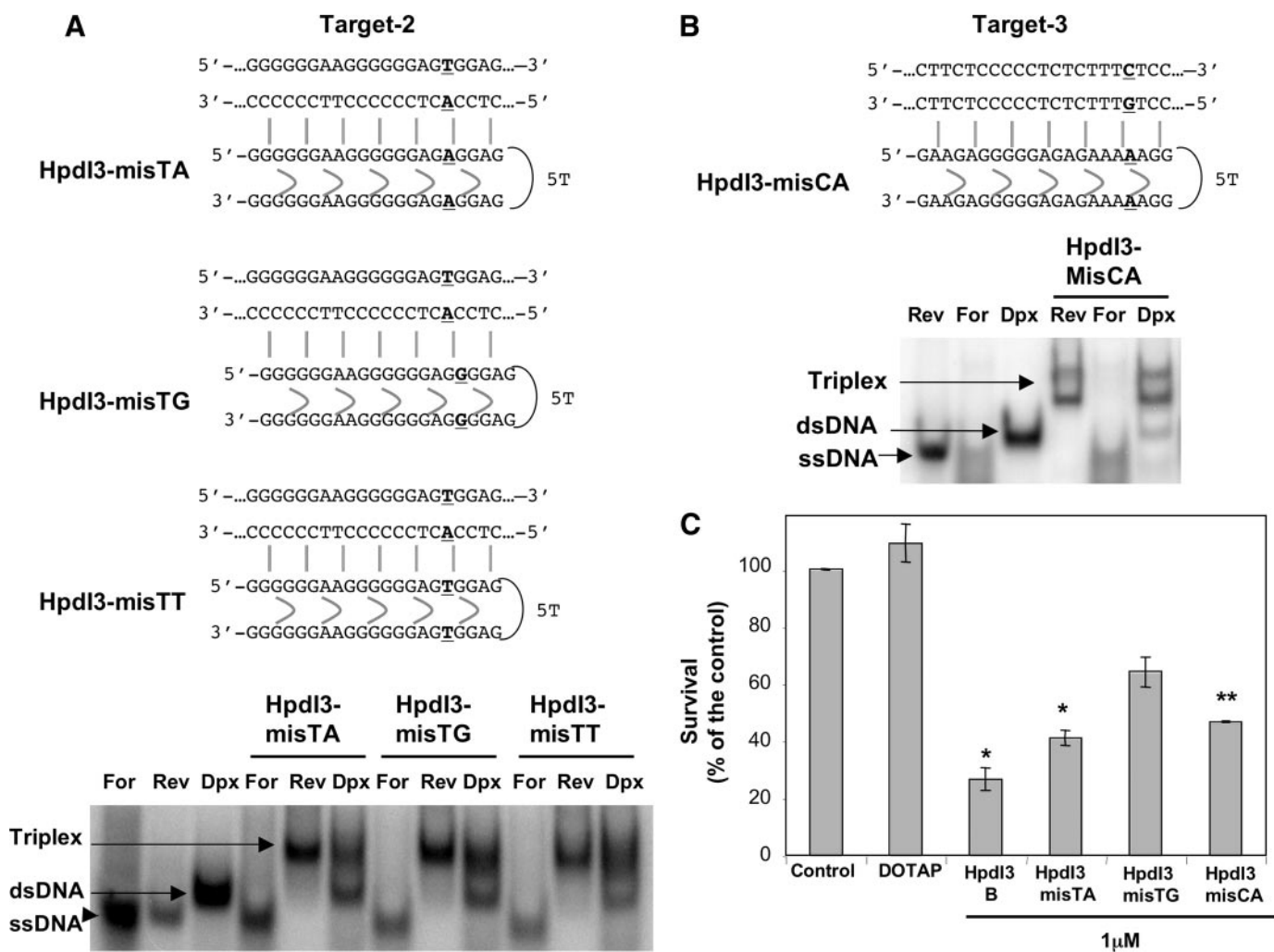


FIGURE 6. **Binding and associated cytotoxicity of PPRHs to target sequences 2 and 3 containing purine interruptions in the *dhfr* gene.** A, schematic representation of the binding of the PPRHs HpdI3-misTA, -misTG and -misTT to the dsDNA *dhfr* target-2 bearing one adenine in the polypyrimidine stretch, and B, binding of HpdI3-misCA to *dhfr* target-3 bearing one guanine in the polypyrimidine sequence. Both DNA targets are located in intron 3 of the *dhfr* gene. A, binding of PPRHs HpdI3-misTA, -misTG, and -misTT; and B, of HpdI3-misCA to 20,000 cpm of [³²P]-*dhfr* target-2 and [³²P]-*dhfr* target-3, respectively, either as a duplex (Dpx) or ssDNA species. For indicates the polypurine strand of the duplex, whereas Rev represent the polypyrimidine strand. C, cytotoxicity caused by the incubation of 10,000 SKBR3 cells in DHFR selective medium (-GHT) upon transfection with the indicated PPRHs and 10 μ M DOTAP. A week after treatment an MTT assay was performed. ssDNA, single-stranded DNA. Data represent the mean \pm S.E. of at least four experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

DOTAP alone or with the negative controls (HptI8-WC and HptI8-Sc).

Telomerase mRNA levels were analyzed by RT-real time-PCR, observing a noticeable decrease in its expression when SKBR3 cells were treated with 100 nM HptI8-B (Fig. 7C). The negative controls HptI8-WC and HptI8-Sc did not cause a significant change in telomerase mRNA levels.

Effects of Survivin PPRHs—The antiapoptotic *survivin* gene was the target of two PPRHs, one directed toward exon 3, HpsE3-B, and the second toward the promoter region, HpsPr-B (Fig. 8A). HpsE3-B was directed to a 29-nt polypurine/polypyrimidine stretch in the exon 3 and bore 3-purine interruptions, and HpsPr-B was directed to a 26-nt polypurine/polypyrimidine stretch in the promoter region and contained 3-purine interruptions. HpsPr-B at a 1 μ M 1:10 PPRH:DOTAP molar ratio caused 96% of cytotoxicity, whereas HpsE3-B at 1 μ M 1:10 DOTAP produced 27% of cell mortality (Fig. 8B). The negative controls for HpsPr-WC and HpsPr-Sc presented almost no

cytotoxicity. PPRHs toward survivin were more active at Hp:DOTAP ratios of 1:10 instead of 1:100 (data not shown).

Survivin mRNA levels decreased when SKBR3 cells were treated with 1 μ M HpsPr-B (Fig. 8C). The negative control HpsPr-WC caused a slight mRNA decrease, whereas HpsPr-Sc did not produce a significant change in survivin mRNA levels.

PPRH Specificity—The specificity of the designed PPRH was checked both by BLAST analysis and using negative controls (Hp-WC and Hp-Sc). Additionally, we also tested whether PPRHs unspecifically decreased mRNA levels of unrelated genes by RT-real time-PCR: *dhfr*, *telomerase*, *survivin* (when they were not their target), *ugt1a10* and *s100a4*. As observed in Table 2, PPRHs did not produce a significant mRNA decrease of non-targeted genes.

DISCUSSION

We previously described the ability of PPRHs to bind double-stranded DNA forming triplex molecules (17). Two strands

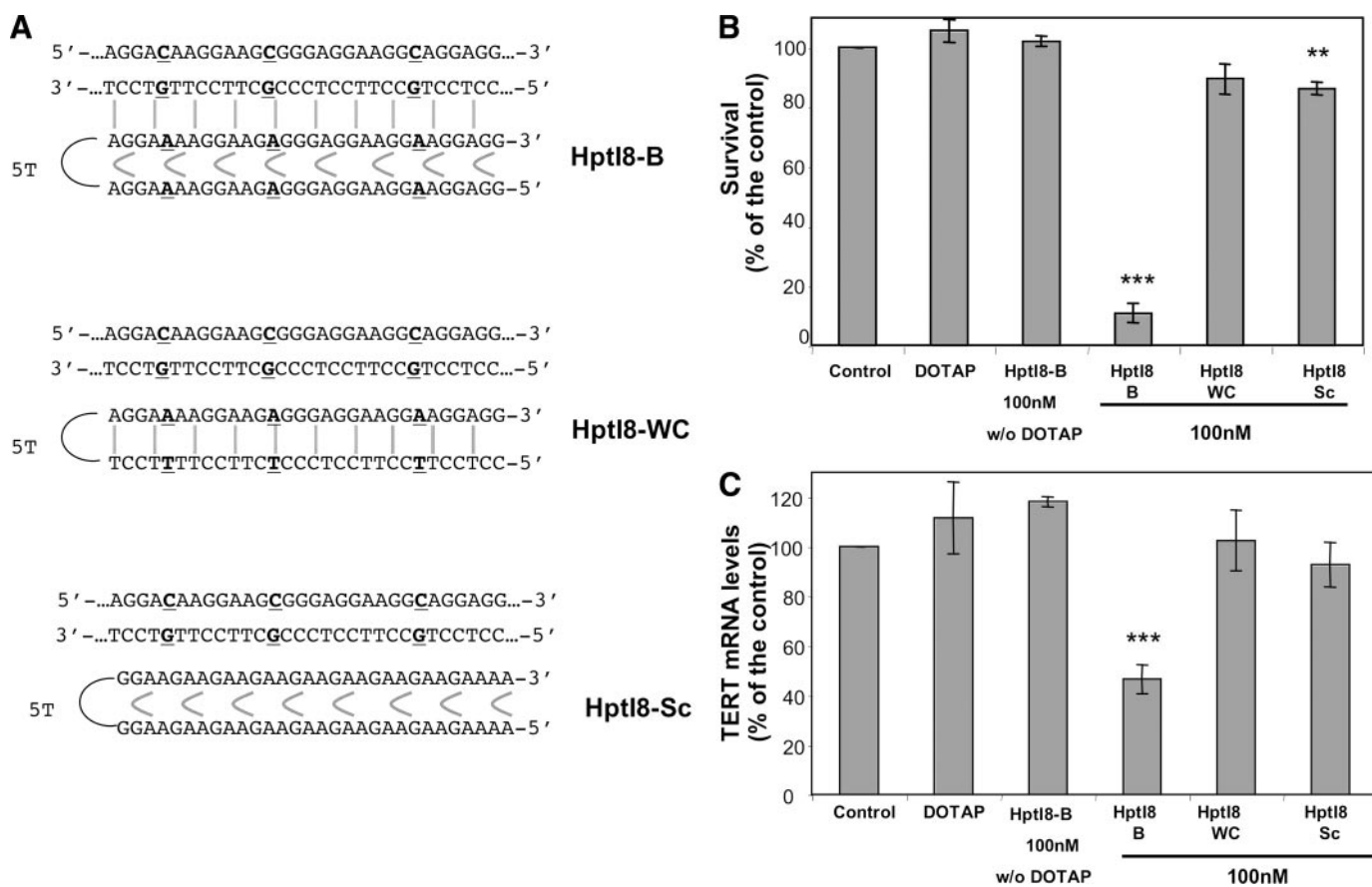


FIGURE 7. **Effect of template-PPRHs against the telomerase gene.** A, schematic representation of the PPRHs used to target intron 8 in the *telomerase* gene. B, cytotoxicity. 10,000 SKBR3 cells were plated in Ham's F-12 medium. Cells were incubated with 10 μ M DOTAP alone, HptI8-B without DOTAP, HptI8-B, HptI8-WC, and HptI8-Sc. A week after treatment an MTT assay was performed. C, telomerase mRNA levels. 30,000 SKBR3 cells were incubated with 10 μ M DOTAP alone, HptI8-B, HptI8-WC, or HptI8-Sc. Three days after transfection, telomerase mRNA levels were determined by RT-real time-PCR using APRT mRNA to normalize the results. Data represent the mean \pm S.E. of at least four experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$.

come from the hairpin, linked by intramolecular Hoogsteen bonds, and the third one from the dsDNA, which binds to the hairpin by Watson-Crick bonds. In the present study we tested whether polypurine reverse Hoogsteen hairpins had an effect on gene expression. Thus, we developed different PPRHs that bind to the template DNA strand and incubated them with mammalian cells to analyze the effect on the different stages of gene expression and cytotoxicity.

As a model to test the efficacy of template-PPRHs on decreasing gene expression, we used the *dhfr* gene. Optimal *dhfr* polypyrimidine stretches, the target sequences of PPRHs, were found in introns. This is not surprising because these stretches are found predominantly in introns, promoters, and with less probability in exons. However, these polypyrimidine stretches are found in the genome with higher frequency than predicted by the random assembly of the four bases; for this reason they are thought to have a regulatory activity on genes (18, 19). Almost all genes contain this type of sequences, implying that PPRHs could be used to target a great number of genes.

We found that the most active PPRH, in binding and cytotoxicity, had a blunted hairpin structure (HpdI3-B). The PPRH with an extended fragment of the Watson-Crick binding domain lacking Hoogsteen unions (tailed, HpdI3-T) was less active. This may be explained by the fact that intramolecular

Hoogsteen bonds in the whole hairpin stabilize triplex unions (16). It was also found that a longer PPRH (32 nt, HpdI3-BT), although theoretically more sequence specific, had less activity.

HpdI3-NH reveals the effect of Hoogsteen bonds in PPRH activity, this hairpin has the ability to bind to the polypyrimidine target sequence but it cannot make Hoogsteen bonds. This no Hoogsteen hairpin is active in a lower degree than PPRHs, as it resembles an aODN with a hanging tail. Therefore, the binding of a double strand target by triplex formation with PPRHs is more stable than that produced by oligonucleotides through Watson-Crick bonds (17).

The frequency of finding polypyrimidine regions lacking purine interruptions is low; for this reason we studied the ways to minimize the instability that these interruptions produce during triplex formation. We found that adenine was the best base to place in the PPRH sequence to pair with a purine interruption in the polypyrimidine target sequence. These results are in agreement with previous studies made with guanine interruptions, in which an adenine was also the best nucleotide to stabilize triplex formation (17).

Next, we analyzed the effects of PPRHs on mRNA and protein levels, enzymatic activity, and the resultant cytotoxicity. Our results show that PPRHs against the *dhfr* gene decrease DHFR mRNA levels, and as a consequence, induce a decrease in DHFR protein levels and enzymatic activity.

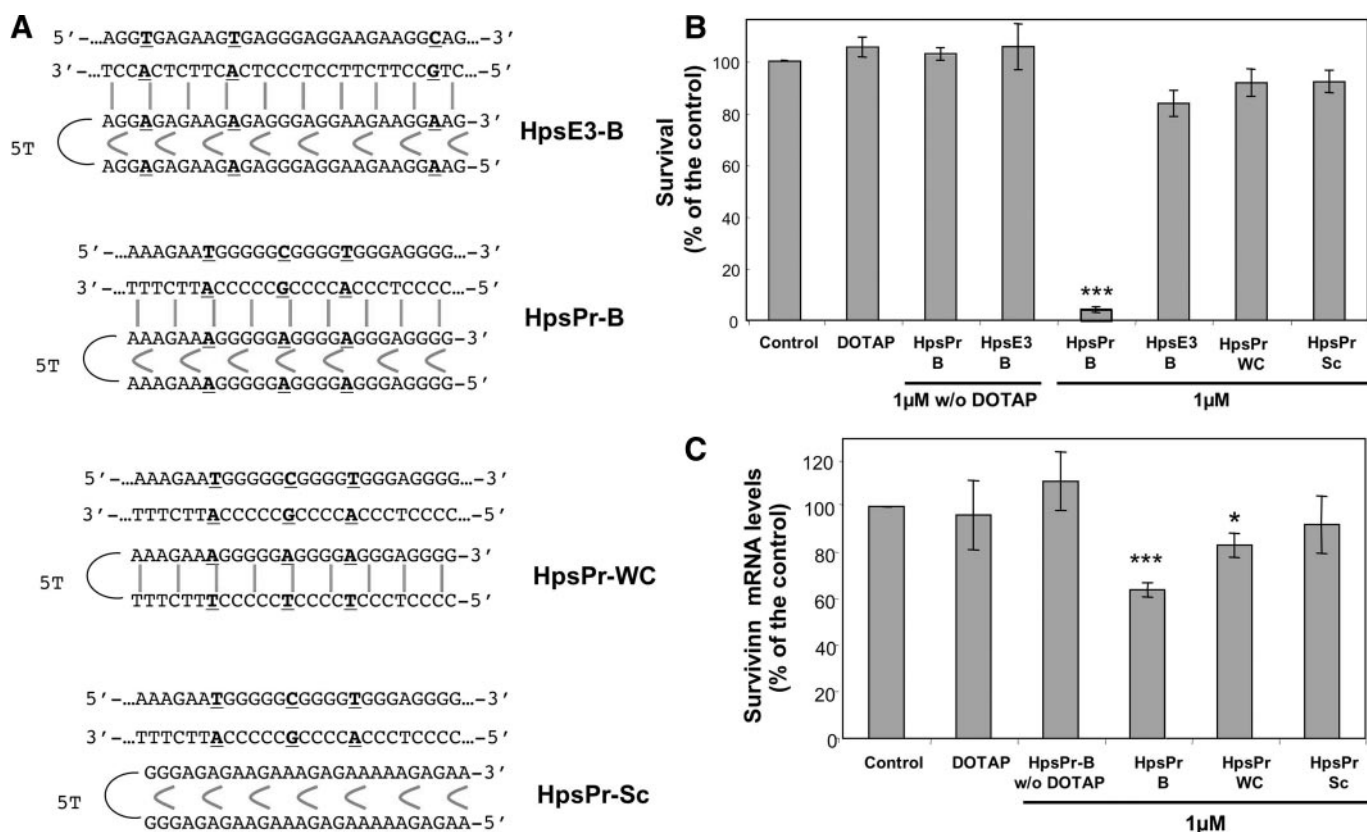


FIGURE 8. Effect of template-PPRHs against the *survivin* gene. A, schematic representation of the PPRHs used to target exon 3 and the promoter of the *survivin* gene. B, cytotoxicity. 10,000 SKBR3 cells were plated in Ham's F-12 medium. Cells were incubated with either 10 μM DOTAP alone, or HpsPr-B and HpsEx3-B without DOTAP, HpsPr-B, HpsEx3-B, HpsPr-WC, or HpsPr-Sc. A week after treatment a MTT assay was performed. C, survivin mRNA levels. 30,000 SKBR3 cells were incubated with either 10 μM DOTAP alone, HpsPr-B, HpsPr-WC, or HpsPr-Sc. Three days after transfection, survivin mRNA levels were determined by RT-real time-PCR using APRT mRNA to normalize the results. Data represent the mean ± S.E. of at least four experiments. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.005$.

TABLE 2

PPRH specificity

SKBR3 cells were transfected with the PPRHs listed in Table 1 and a RT-real time-PCR was performed to study the mRNA levels of unrelated genes different to the target sequences. Data represent the mean ± S.E. of at least four experiments.

	<i>dhfr</i>	<i>Telomerase</i>	<i>Survivin</i>	<i>UGT1A10</i>	<i>S100A4</i>
Control	100	100	100	100	100
HpdI3-B		142.6 ± 11.5	115 ± 7.9	157 ± 11.7	99.3 ± 21.9
HptI8-B	94 ± 19.3		111.1 ± 19.6	169.4 ± 5.3	84.1 ± 1.9
HpsPr-B	78.6 ± 5	108.2 ± 28.7		128.7 ± 19.6	101.8 ± 3.2

These results are consistent with the mechanism of action of the PPRHs. They bind to polypyrimidine stretches present into the DNA and, as a consequence they interfere with transcription, as revealed by the mRNA decrease. Therefore, template-PPRHs would share with TFOs an equivalent mechanism of action. Although the greatest inhibition of DNA transcription by triplexes is found when the target duplex is in the gene promoter (18), the inhibition of DNA transcription by triplexes can occur by means of the inhibition of mRNA elongation (26, 27) as it would be the case when the target sequence is intronic.

PPRHs display a series of advantages: (i) they work at concentrations of 100 nM (similar to that used for siRNAs). (ii) They are very active in producing final cytotoxicity, more than aODNs (HATNL-24), siRNAs (siRNA-DHFR), and PPRH structures lacking Hoogsteen bonds (HpdI3-NH). (iii) PPRHs present a remarkable increase in stability (half-life of 4.9 days

compared with the 2 days for modified aODNs) (28, 29), without the need for modified nucleotides. (iv) PPRHs are easy to synthesize and inexpensive, as they are very stable non-modified single-stranded DNA oligonucleotides, with no special handling requirements in contrast to siRNAs.

The specificity of PPRHs for their target sequences was monitored by the use of negative controls (Hp-WC and Hp-Sc), BLAST analysis, and the study of mRNA decrease of unrelated genes when cells were transfected with the different PPRHs. Hp-WC is a negative control because despite having the target binding sequence, its intramolecular complementary strand makes Watson-Crick bonds instead of Hoogsteen bonds, producing a closed hairpin structure unable to form triplex with the target sequence. Hp-WC also represents a control of the cell response to transfection of a dsDNA oligonucleotide. As the results show, no effect is derived upon transfection of dsDNA ranging between 20 and 30 nt, unlike dsRNA longer than 25 nt (30–33). Hp-Sc, an oligonucleotide bearing scrambled sequences, also demonstrates PPRHs specificity of action.

We also proved that PPRHs are not only active toward the *dhfr* gene, but also against other genes containing polypyrimidine-rich regions. *telomerase* gene has an intronic polypyrimidine sequence that contains three purine interruptions. The PPRH against *telomerase* showed a noticeable cytotoxicity after replacing these interruptions with three adenines. Using PPRHs against *survivin*, we tested their effect on other

regions, either in the exonic sequence or the promoter. The regulatory activity of polypyrimidine tracts would be reinforced by the result that exon-PPRH scarcely caused cell cytotoxicity, whereas PPRH toward the promoter showed a remarkable cell death.

In addition, we present the efficacy of PPRHs directed toward *dhfr* in breast cancer cells that have developed resistance to the chemotherapeutic drug methotrexate. This compound is a competitive inhibitor that blocks folic acid binding to DHFR (34, 35). MCF7-R cells able to survive at methotrexate concentrations of 10^{-6} M died when transfected with PPRHs that knocked down the *dhfr* gene. This approach to target genes responsible for resistance to chemotherapy, or to use PPRHs that target crucial genes involved in cancer processes, as *telomerase* and *survivin*, turns PPRHs into potential gene therapy tools.

In summary, we describe the use of PPRHs in cultured cells and their biological effect. PPRHs cause a decrease in mRNA levels that lead to a cytotoxic effect when essential genes in cell growth are targeted. PPRHs could represent a new tool to inhibit gene expression in cancer therapy.

REFERENCES

- Chan, P. P., and Glazer, P. M. (1997) *J. Mol. Med.* **75**, 267–282
- Giovannangeli, C., and Hâelâne, C. (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7**, 413–421
- Casey, B. P., and Glazer, P. M. (2001) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **67**, 163–192
- Felsenfeld, G., and Rich, A. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 457–468
- Ryan, K., and Kool, E. T. (1998) *Chem. Biol.* **5**, 59–67
- Sorensen, J. J., Nielsen, J. T., and Petersen, M. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, 6078–6085
- Brunet, E., Corgnali, M., Perrouault, L., Roig, V., Asseline, U., Sorensen, M. D., Babu, B. R., Wengel, J., and Giovannangeli, C. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, 4223–4234
- Giovannangeli, C., Montenay-Garestier, T., Rougee, M., Chassignol, M., Thoung, N. T., and Helene, C. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7775–7777
- Kandimalla, E. R., Agrawal, S., Venkataraman, S., and Sasisekharan, V. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6416–6417
- Aviñó, A., Morales, J. C., Frieden, M., de la Torre, B. G., Garcáia, R. G., Cubero, E., Luque, F. J., Orozco, M., Azoráin, F., and Eritja, R. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 1761–1763
- Aviñó, A., Frieden, M., Morales, J. C., Garcáia de la Torre, B., Gèuimil Garcáia, R., Azoráin, F., Gelpái, J. L., Orozco, M., Gonzáalez, C., and Eritja, R. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, 2609–2619
- Cubero, E., Aviñão, A., de la Torre, B. G., Frieden, M., Eritja, R., Luque, F. J., Gonzáalez, C., and Orozco, M. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3133–3142
- Vasquez, K. M., Wensel, T. G., Hogan, M. E., and Wilson, J. H. (1995) *Biochemistry* **34**, 7243–7251
- Faucon, B., Mergny, J. L., and Helene, C. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 3181–3188
- Mills, M., Arimondo, P. B., Lacroix, L., Garestier, T., Klump, H., and Mergny, J. L. (2002) *Biochemistry* **41**, 357–366
- Aviñó, A., Cubero, E., Gonzáalez, C., Eritja, R., and Orozco, M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16127–16138
- Coma, S., Noe, V., Eritja, R., and Ciudad, C. J. (2005) *Oligonucleotides* **15**, 269–283
- Goñi, J. R., de la Cruz, X., and Orozco, M. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, 354–360
- Goñi, J. R., Vaquerizas, J. M., Dopazo, J., and Orozco, M. (2006) *BMC Genomics* **7**, 63
- Postel, E. H., Flint, S. J., Kessler, D. J., and Hogan, M. E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8227–8231
- Kim, H. G., Reddoch, J. F., Mayfield, C., Ebbinghaus, S., Vigneswaran, N., Thomas, S., Jones, D. E., Jr., and Miller, D. M. (1998) *Biochemistry* **37**, 2299–2304
- Hewett, P. W., Daft, E. L., Laughton, C. A., Ahmad, S., Ahmed, A., and Murray, J. C. (2006) *Mol. Med.* **12**, 8–16
- Chasin, L. (1985) *Mol. Cell Genet.* 449–488
- Ciudad, C. J., Urlaub, G., and Chasin, L. A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16274–16282
- Rodriguez, M., Noe, V., Alemany, C., Miralles, A., Bemí, V., Caragol, I., and Ciudad, C. J. (1999) *Int. J. Cancer* **81**, 785–792
- Young, S. L., Krawczyk, S. H., Matteucci, M. D., and Toole, J. J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10023–10026
- Faria, M., Wood, C. D., Perrouault, L., Nelson, J. S., Winter, A., White, M. R., Helene, C., and Giovannangeli, C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3862–3867
- Campbell, J. M., Bacon, T. A., and Wickstrom, E. (1990) *J. Biochem. Biophys. Methods* **20**, 259–267
- Peyman, A., Helsenberg, M., Kretzschmar, G., Mag, M., Rytte, A., and Uhlmann, E. (1997) *Antiviral Res.* **33**, 135–139
- Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C., and Mathews, M. B. (1992) *Mol. Cell Biol.* **12**, 5238–5248
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., and Williams, B. R. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 834–839
- Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., and Weissman, D. (2004) *J. Immunol.* **172**, 6545–6549
- Reynolds, A., Anderson, E. M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J., Marshall, W. S., and Khvorova, A. (2006) *RNA (Cold Spring Harbor)* **12**, 988–993
- Cronstein, B. N. (1996) *Arthritis Rheum.* **39**, 1951–1960
- McGuire, J. J. (2003) *Curr. Pharm. Des.* **9**, 2593–2613

4.3- Article III:

CODING POLYPURINE HAIRPINS CAUSE TARGET-INDUCED CELL DEATH IN BREAST CANCER CELLS

M.Cristina de Almagro, Núria Mencia, Véronique Noé and Carlos J. Ciudad

Human gene therapy, October 2010

Al treball anterior es van dissenyar els Template-PPRHs, dirigits contra la cadena motlle del DNA, en aquest treball hem dissenyat un nou tipus de PPRHs, els Coding-PPRHs, dirigits contra la cadena codificant del DNA i per tant contra el mRNA.

Es va utilitzar el gen *dhfr* com a model, i es va trobar una seqüència de polipirimidines a l'intró 3. Primerament es va estudiar si els Coding-PPRHs eren capaços d'unir-se a la seqüència diana. Es van incubar els PPRHs amb la seqüència diana en forma de ssDNA i dsDNA, així com ssRNA. En tots el casos, HpdI3-A-TA era capaç d'unir-se.

Es va testar l'activitat citotòxica de HpdI3-A-TA en cèl·lules de càncer de mama SKBR3, en medi selectiu mancant dels productes finals de la DHFR. Es va observar que a una concentració de 100 nM i una relació molar amb el liposoma catiònic DOTAP de 1:100, s'obtenia una mort cel·lular d'un 90%, i aquesta activitat citotòxica es començava a desenvolupar a les 3-6 h de la transfecció.

Es va estudiar el mecanisme d'acció dels Coding-PPRHs, per això es va analitzar l'activitat DHFR després de transfectar HpdI3-A-TA, i es va poder apreciar una disminució en aquesta. Es va procedir a l'estudi dels nivells de mRNA i sorprenentment quasi no es produïa disminució. Com que HpdI3-A-TA anava dirigit contra l'intró 3 es van analitzar els nivells de pre-mRNA i mRNA a partir dels exons annexes a l'intró 3. Quan incubàvem les cèl·lules amb HpdI3-A-TA i quantificàvem els nivells de pre-mRNA s'observaven uns valors d'un 200%, mentre que si determinàvem el mRNA una vegada empalmat l'intró 3, es produïa una disminució en l'expressió DHFR semblant a l'observada amb els Template-PPRHs. Aquesta pujada en els nivells de pre-mRNA seguida d'una baixada en els nivells de mRNA ens va fer pensar en una alteració en el procés d'empalmament de l'RNA.

Es van generar dos sondes corresponents a un minigen *dhfr* de h mster, que contenien només l'intró 1, DCHIP i DCHIP-Hp, incloent aquesta darrera la seq ncia d'unió del HpdI3-A-TA en l'intró 1 del minigen. Aquestes dues sondes es van sotmetre a transcripció i empalmament *in vitro*. Quan es procedia a l'empalmament *in vitro* amb la sonda DCHIP-Hp en presència de HpdI3-A-TA, s'observava una disminució de la quantitat de producte empalmat.

El factor d'empalmament U2AF65 és una proteïna que s'uneix a les seq ncies polipirimidíniques dels introns per tal de reclutar la maquinària d'empalmament. Es va estudiar si els Coding-PPRHs en unir-se a la seva diana estaven impedit la unió d'U2AF65, mitjançant assajos de gel-shift. En aquests assajos es va poder observar que la seq ncia diana dels PPRHs en presència d'extractes nuclears patia retardació de la mobilitat electroforètica, i quan s'incubava amb PPRHs aquesta unió de la seq ncia diana a alguna proteïna disminuï de forma dosi dependent. Per verificar que es tractava d'U2AF65 es van fer assajos de super-shift, en que es va identificar a U2AF65 com a responsable de la retardació.

Per tal d'estudiar l'especificitat d'aquestes molècules, es van fer an lisis de BLAST, determinacions dels nivells de mRNA de gens no relacionats, i es van transfectar de forma estable en cèl·lules de h mster *dhfr*⁻, les sondes DCHIP i DCHIP-Hp. Només les cèl·lules transfectades amb DCHIP-Hp, en ser incubades amb HpdI3-A-TA presentaven mort cel·lular, ja que eren les úniques que contenien la diana d'unió del PPRH.

Aix  mateix, es va investigar l'aplicabilitat dels Coding-PPRHs dirigits contra el gen *dhfr* en ser transfectats en cèl·lules MCF7 de càncer de mama resistents a 10⁻⁶M de MTX. Aquestes cèl·lules en ésser incubades amb HpdI3-A-TA presentaven disminució en la supervivència, així com en els nivells de mRNA i la quantitat de proteïna DHFR.

En sumari, els Coding-PPRHs representen una nova aplicació dels PPRHs, ja que amplia el seu radi d'acció a la trobada de cadenes de polipirimidines en la cadena codificant del DNA. Així mateix, presenten un mecanisme d'acció diferent als Template-PPRHs. Tant els Template, com els Coding-PPRHs són una nova estratègia a l'hora de disminuir selectivament l'expressió gènica.

CODING POLYPURINE HAIRPINS CAUSE TARGET-INDUCED CELL DEATH IN BREAST CANCER CELLS

M.Cristina de Almagro, Núria Mencia, Véronique Noé and Carlos J. Ciudad

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

Address correspondence to: Ciudad, Carlos J. Department of Biochemistry and Molecular
Biology, School of Pharmacy, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. Phone:
+34934034455. Fax: +34934024520; e-mail: cciudad@ub.edu

Running title: Coding-PPRHs decrease gene expression

ABSTRACT

Polypurine Reverse-Hoogsteen hairpins, PPRHs, are dsDNA molecules formed by two polypurine stretches linked by a pentathymidine loop, with intramolecular Reverse-Hoogsteen bonds that allow a hairpin structure. PPRHs bind to polypyrimidine targets by Watson-Crick bonds maintaining simultaneously a hairpin structure due to intramolecular Hoogsteen bonds. Previously, we described the ability of Template-PPRHs to decrease mRNA levels since these PPRHs target the template DNA strand interfering with the transcription process. Now, we designed Coding-PPRHs, a new type of PPRHs that directly target the pre-mRNA. The dihydrofolate reductase gene, *dhfr*, was selected as a target in breast cancer therapy. These PPRHs caused a high degree of cytotoxicity and a decrease in DHFR mRNA and protein levels, but by a different mechanism of action than Template-PPRH. Coding-PPRHs interfere with the splicing process by competing with U2AF65 for binding to the polypyrimidine target sequence, leading to a lower amount of mature mRNA. These new PPRHs showed high specificity as no off-target effects were found. The application of these molecules as therapeutic tools was tested in breast cancer cells resistant to methotrexate obtaining a noticeable cytotoxicity even though the *dhfr locus* was amplified. Coding-PPRHs can be considered as new molecules to decrease gene expression at the mRNA level, and an alternative to other antisense molecules.

INTRODUCTION

Nowadays, there exist a series of molecules developed to decrease gene expression, mainly antisense oligonucleotides (aODNs), siRNAs and TFOs. However, each of these molecules presents disadvantages such as lack of stability or specificity. Here, we describe the development of a new type of PPRHs, Coding-PPRHs, to decrease gene expression.

Hoogsteen bonds are hydrogen bonds between nucleic acids, with a different binding code than Watson-Crick bonds. The main benefit of this kind of linkage is to allow the formation of triplex structures, in which one DNA strand can simultaneously form Watson-Crick bonds with one strand, and Hoogsteen bonds with the other (Praseuth et al. 1999). The only requirement for the usage of Hoogsteen structures is the presence of polypyrimidine/polypurine stretches, as this type of binding can only happen when these sequences are present. There are two major groups of Hoogsteen geometries: parallel and antiparallel. Parallel triplexes follow the $d(T\#A\bullet T)$ and $d(C\#G\bullet C)$ code in which the Watson-Crick polypurine strand is in the same orientation than the Hoogsteen polypyrimidine strand; whereas antiparallel triplexes need the formation of the triads $d(A\#A\bullet T)$ and $d(G\#G\bullet C)$, and the orientation between the Watson-Crick polypurine strand and the Hoogsteen polypurine strand is antiparallel. The main benefit of using antiparallel Hoogsteen bonds is that they can be formed at physiological pH, unlike parallel Hoogsteen bonds.

Hoogsteen bonds play an important role in the mechanism of action of TFOs and circular oligonucleotides, which have been used with great success, but have found some stability and specificity problems (Casey and Glazer 2001; Chan 1997; Giovannangeli and Heléne 1997; Ryan and Kool 1998). As an attempt to solve these problems, a molecule that binds to its

target sequence by Watson-Crick bonds instead of by Hoogsteen bonds has been designed. Polypurine Reverse-Hoogsteen hairpins (PPRH) are non-modified DNA molecules formed by two polypurine stretches linked by a five-thymidine loop (Aviñó et al. 2002; Coma et al. 2005). The hairpin structure is maintained by intramolecular Reverse-Hoogsteen bonds between the two polypurine stretches, which are in antiparallel orientation. These molecules bind to their polypyrimidine target sequence by Watson-Crick bonds, thus forming a triplex structure.

In a previous study, we described a type of PPRHs that had the ability to bind to a target sequence located in the template DNA strand, Template-PPRHs (de Almagro et al. 2009). The formation of the triplex between these PPRHs and their dsDNA target sequence interfered with the transcription process, thus producing an mRNA decrease. *In vitro* binding studies revealed that Template-PPRHs were able to bind to their dsDNA polypyrimidine target sequence in a sequence specific manner. These PPRHs showed a remarkable stability, almost 5 days, without containing modified nucleotides. In comparison with other molecules that decrease mRNA levels, Template-PPRHs showed greater activity than aODNs and similar to that produced by siRNA. The difficulty to design PPRHs resides in finding pure polypyrimidine stretches, but this problem was minimized placing adenines in front of purine interruptions.

In this study, a new type of PPRHs has been developed, Coding-PPRHs. These PPRHs directly target the pre-mRNA and the coding strand, thus allowing the application of the PPRH technology to genes whose polypyrimidine sequences are located in the coding DNA strand. We studied the activity of PPRHs targeting mRNA and their mechanism of action. It was analyzed the Coding-PPRHs binding ability, and their effects on mRNA, protein,

enzymatic activity, and cell viability, using the *dhfr* gene as a model. Dihydrofolate reductase is involved in the synthesis of glycine, hypoxanthine and thymidilate, thus its inhibition blocks DNA synthesis and cell growth. The therapeutic application of these PPRHs in breast cancer cells resistant to methotrexate was also studied.

MATERIALS AND METHODS

PPRHs design and usage. The PPRHs used in this study were made up of two antiparallel polypurine domains, bound by intramolecular reverse-Hoogsteen bonds, and linked by a pentathymidine loop. The Triplex-Forming Oligonucleotide Target Sequence Search software, (Anderson Cancer Center, <http://spi.mdanderson.org/tfo/>), was used to find the polypyrimidine stretches in the target sequence. BLAST analyses were performed to check for the specificity of all these sequences. PPRHs were synthesized as non-modified oligodeoxynucleotides by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) (0.05 μ mol scale). All concentrations were expressed in strand molarity. PPRHs were dissolved in sterile RNase-free TE buffer (1 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 8.0) and stored at -20°C until use.

Preparation of polypurine/ polypyrimidine duplexes. The duplexes to be targeted by the hairpins were formed by mixing 25 μ g of each single-stranded polypurine and polypyrimidine oligodeoxynucleotides with 150 mM NaCl and incubated at 90°C for 5 minutes as described in (de Almagro et al. 2009).

Oligodeoxynucleotide labelling. One hundred ng of single or double-stranded oligodeoxynucleotides or RNA was 5'-end-labeled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ as described in (de Almagro et al. 2009).

DNA-PPRH and RNA-PPRH binding analysis. Triplex formation was analyzed by incubating radiolabeled single or double-stranded DNA or RNA targets (2 nM strand concentration; 20,000 cpm) in the presence or absence of unlabeled PPRHs (250 nM strand concentration) in a buffer containing 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl and 50 mM HEPES, pH

7.2. Binding reactions (20 μ l) were incubated for 45 minutes at 37°C before electrophoresis, which was performed on a non-denaturing 12% polyacrylamide gel containing 10 mM MgCl₂, 5% glycerol and 50 mM HEPES, pH 7.2. Gels were run for 3-4 h at 190V at 4°C, dried and analyzed on a Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics). Quantification was performed using the ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics). Binding specificity was tested by the addition of 2 μ g of tRNA to the binding reaction.

Plasmid construction. The Chinese hamster *dhfr* minigene construct pDCHIP has been described previously (Ciudad et al. 1988). It contains the six exons of the gene, intron-1, about 900 bp of the 5' flank, and the first of the two major polyadenylation sites in exon-6. Plasmid pDCHIP-Hp was constructed by cloning the Coding-PPRH target sequence (Fig. 1b or Table 1), present in the intron-3 of the human *dhfr* gene, into the unique PstI site in intron-1 of pDCHIP. This 31 nt sequence contained a NotI site close to its 5' end, to select the plasmids containing the insert. The number of inserts cloned was measured by PCR product size, and a plasmid containing just one insert was selected.

Cell culture. SKBR3 breast cancer cells were grown in Ham's F-12 medium containing 7% fetal bovine serum (GIBCO Invitrogen, Barcelona, Spain), and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. MCF7-R breast cancer cells resistant to 10⁻⁶M methotrexate (MTX) were previously generated in our laboratory (Selga et al. 2009) and bear amplification of the *dhfr* locus. This cell line was grown in Ham's F-12 medium lacking the final products of DHFR activity: glycine, hypoxanthine and thymidine, (-GHT medium, (Chasin 1985)) containing 7% of dialyzed fetal bovine serum (GIBCO, Invitrogen, Barcelona, Spain). pDCHIP and pDCHIP-Hp plasmids were stably transfected into *dhfr*⁻ DG44 CHO cells to obtain the DCHM1 and DCHM1-Hp cell lines, respectively. Briefly, 500,000 *dhfr*⁻ DG44

cells were transfected with 1 µg of plasmids pDCHIP, pDCHIP-Hp, or with unspecific calf DNA. Five hours after the calcium phosphate transfection the medium was changed, and 24 hours later the selective medium -GHT was added. Transfectants were selected for survival in -GHT medium. These cell lines were used for specificity studies.

Transfection. SKBR3, MCF7-R, DCHM1 and DCHM1-Hp cells were plated in 35-mm dishes. PPRHs were mixed with N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP, Roche, Mannheim, Germany) at the appropriate oligonucleotide-DOTAP molar ratio (1:10-1:100) for 15 min at RT before lipofecting the cells.

MTT assay. SKBR3, MCF7-R, DCHM1 and DCHM1-Hp cells (10,000) were plated in 35-mm dishes in -GHT medium. After 7 days, 500 µg of MTT and 5.6 mg of succinate (both from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) were added to the culture medium and allowed to react for 3 hours at 37°C before the addition of the solubilisation reagent (0.57% acetic acid and 10% SDS in DMSO). Cell viability was measured at 570 nm in a WPA S2100 Diode Array Spectrophotometer.

mRNA analysis. 72 hours after PPRH transfection, total RNA from 30,000 SKBR3 or MCF7-R cells was extracted using the UltraspecTM RNA (Bioteck, Houston, Tx) following manufacturer's specifications. RT and Real Time-PCR were performed as described in de Almagro et al. 2009.

The primer sequences for Sybr were: Dhfr-Ex3 Fw 5'-GAAGACCTGGTTCTCCATTCC-3', Dhfr-Int3 Rv 5'-GCAGCTTCATCAATAGCTCCT-3', Dhfr-Ex5 Rv 5'-GGCAGAAGTTTATATTTCTCCAAA-3', Dhfr-Ex4 Rv 5'-TGCCACCAACTATCCAGACC-3', Tert-Fw 5'-AGGAGCTGACGTGGAAGATG-3', Tert-Rv 5'-GCTCGACGACGTACACACTC-3', Surv-Fw 5'-AGCCAGATGACGACCCCATAG-3', Sur-Rv 5'-

CACAGGAAGGCTGGTGGCAC-3', Aprt-Fw 5'-GCAGCTGGTTGAGCAGCGGAT-3', Aprt-Rv 5'-AGAGTGGGGCCTGGCAGCTTC-3'. S100A4, DHFR, UGT1A10 and APRT mRNA Taqman probes were used (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). A 5% polyacrilamide gel was used to analyze the size of the PCR products.

Western analysis. MCF7-R cells were used to detect DHFR protein. 30,000 MCF7-R were plated in 35-mm dishes and treated with PPRHs. 72 hours after transfection, total protein extracts were obtained and Western blot analysis to detect the levels of DHFR protein were performed as described in de Almagro et al. 2009.

DHFR activity assay. 72 hours after PPRH transfection, DHFR activity was determined by incorporation of titrated deoxyuridine to cellular DNA (Ciudad et al. 1988) with modifications (Noe et al. 1998).

In vitro transcription. Linear DNA templates for *in vitro* transcription assays were generated by PCR using pDCHIP and pDCHIP-Hp as templates and the following primers T7Dex1 (5'-TAATACGACTCACTATAGCCAACTGGGGGAAGCA-3') and Dex3U1Tail (5'-ATACTTACCCTGCGATTCTTCTCAGGAATGGAG-3'). PCR products were purified in a 5 % polyacrilamide gel.

The *in vitro* transcription reactions were performed with the RiboScribe T7 Probe Synthesis Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). Reactions contained 0.5 µg template DNA, 1X Transcription Buffer, 0.5 mM each ATP, CTP, and GTP, 15 µM unlabeled UTP, and 30 µCi of [α -³²P]-UTP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer, Madrid, Spain), 10 mM DTT, 40 units of RNase inhibitor (Promega Biotech Ibérica, Spain) and 750 µM of Cap analogue, in a final volume of 20 µl. The reaction was incubated for 3 hours at 37°C and then stopped by the

addition of formamide loading buffer (80% [v/v] formamide, 20% [v/v] TBE 5X, bromophenol blue, and xylene cyanol). The samples were heated at 85-95°C for 5 min, placed on ice and resolved in 7 M urea, 5% polyacrylamide gels using TBE as electrophoresis buffer. The electrophoresis was carried out at 350V and 55°C. Following electrophoresis, gels were subjected to autoradiography and the transcription products were gel-extracted, precipitated with ethanol and resuspended in DEPC-water.

In vitro splicing. PPRHs were incubated for 45 min at 37°C with DCHIP or DCHIP-Hp transcripts (20,000 cpm or 1 µg) in the presence of 4 units of RNase inhibitor (Promega Biotech Ibérica, Spain) and 5.8 mM Mg(AcO)₂. After PPRH binding, splicing reaction was started by adding: 1 mM ATP, 5 mM Creatinin-Phosphate, 0.5 mM DTT, 80 mM KAcO and HeLa Nuclear Extract specific for splicing (CilBiotech, Mons, Belgium), to the reaction mixture, in a final volume of 25 µL. The splicing reaction was carried out at 30°C for 2 hours. The reaction was stopped by the addition of 100 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS, 150 mM NaCl, 300 mM NaAcO (AppliChem, Ecogen, Barcelona, Spain). Nucleic acids were extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), and precipitated from the aqueous phase by adding 1 volume of isopropanol (AppliChem, Ecogen, Barcelona, Spain). The pellets were then dissolved in formamide loading buffer and heated for 5 min at 85-95°C, before electrophoresis in 7 M urea, 5% polyacrylamide gels at 55°C and 350V. The gels were dried and analyzed on a Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics). Quantification of the transcripts was performed using the ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics). Results were normalized by the signal of the whole lane after background correction.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). A single-stranded DNA probe corresponding to HpdI3-A-TA target sequence 5'-TACTTCATTTTTCACCCCTCTCCCCCAATG-3', was end-labeled

with T4 polynucleotide Kinase (New England Biolabs) and [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer, Madrid, Spain), and used in the gel shift assays. A DNA probe was used since U2AF65 is able to bind either ssDNA or ssRNA polypyrimidine sequences as reported by (Singh et al. 2000). One μ g of HeLa Nuclear Extract specific for splicing (CilBiotech, Mons, Belgium) was used. In competition experiments, the different PPRHs used were added to the reaction mixture in excess to the radiolabeled probe ranging from 10 to 200 fold. DNA binding assays were performed as described (Noe et al. 2001) and were analyzed on a Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics). tRNA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was used as a non-specific competitor in a 1:1 non-specific/specific ratio. In the supershift assays, 1 μ g of rabbit polyclonal antibody U2AF65 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) was added to the reaction mixture in combination with 0.5 μ g or 1 μ g of Nuclear Extract, and incubated OVN at 4°C.

Statistical analysis. Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Student's t-test using SPSS 13.0 software for Mac OS X. Results were considered significant if $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), or $p < 0.005$ (***)).

RESULTS

Design of Coding-PPRHs. We searched for polypyrimidine stretches in the coding DNA strand of the human dihydrofolate reductase (*dhfr*) gene. One polypyrimidine stretch was found in intron-3, which contained a purine interruption (Fig. 1a and b). Two PPRHs were designed against this polypyrimidine target, one with an adenine matching the adenine interruption (HpdI3-A-TA) of the target sequence, and another with a guanine (HpdI3-A-TG), since we had determined that placing either a T or C in the PPRH sequence was less effective (de Almagro et al. 2009). To study the importance of the hairpin structure and Hoogsteen bonds on PPRH activity, we used a polypurine structure that had the same target sequence as HpdI3-A-TA, but without the ability to form a hairpin structure due to its lack of intramolecular Hoogsteen bonds (HpdI3-A-NH). This PPRH would act as an aODN with a hanging tail. As negative controls we used a PPRH with a scrambled sequence (HpdI3-Sc) and a PPRH with intramolecular Watson-Crick bonds instead of Hoogsteen bonds, thus displaying a structure neither able to form triplexes nor to bind DNA (HpdI3-A-WC). To test cell responsiveness, HATNL-24, a phosphorothioate antisense oligonucleotide targeting *dhfr* translational start (5'-gatGcAGtttAGcGAAccAaccaT-3', where letters in lowercase indicate phosphorothioate bonds) (Rodriguez et al. 1999) and the *dhfr* Template-PPRH HpdI3-B directed against intron-3 of the *dhfr* template DNA strand (de Almagro et al. 2009) were used. Blast analyses were performed to assess PPRH specificity. The PPRHs sequences are listed in Table 1 and their structures are depicted in Fig. 1b.

Binding of Coding-PPRHs to ssDNA, dsDNA and RNA. The ability of Coding-PPRHs to bind to their target sequence was studied by electrophoretic mobility shift assays. Three probes were used, the For sequence, containing the polypyrimidine ssDNA target; the Duplex

probe, which corresponds to the polypyrimidine/polypurine dsDNA target sequence, and the RNA probe corresponding to the polypyrimidine target sequence. Fig. 1b shows the different PPRHs sequences and their corresponding binding structures. In Fig. 1c and 1d, the mobility of the For, the Duplex and the RNA probes can be observed. The mobility shift due to PPRH binding to ssDNA (For) indicated that HpDI3-A-TA and HpDI3-A-NH (No Hoogsteen) were able to bind to its target sequence. However, only HpDI3-A-TA was able to bind to its dsDNA target sequence (Duplex) and to form a triplex. To assure that PPRHs were also able to bind to its corresponding RNA target sequence, they were incubated in presence of the radiolabeled RNA probe (Fig. 1d). HpDI3-A-TA and HpDI3-A-NH bound to its RNA target sequence, whereas HpDI3-A-WC was unable to bind to it. Binding specificity was tested by the addition of 2 μ g of tRNA to the binding reactions. It is interesting to note that ssDNA probe incubated with HpDI3-A-WC suffered a shift in mobility corresponding to a duplex structure. If that shift were due to the formation of a duplex with the polypurine sequence of the Hp-A-WC after displacement of the polypyrimidine strand, it would form a structure similar to that of Hp-A-NH, which produced higher retardation in mobility. However, when testing Hp-A-WC with its real target, ssRNA, no retardation was observed.

Coding-PPRH cytotoxicity. We tested the cytotoxic effect of HpDI3-A-TA and HpDI3-A-TG in SKBR3 breast cancer cells. In Fig. 2a, it is shown that HpDI3-A-TA produced a 67% of cytotoxicity, whereas the cell death caused by HpDI3-A-TG was 55%; thus HpDI3-A-TA was selected for the following assays. The specificity of HpDI3-A-TA was studied using a series of different controls, which did not cause a significant change in cell viability (Fig. 2b). On the other hand, HATNL-24 (at its optimal conditions, 1:10 aODN:DOTAP molar ratio) and HpDI3-A-NH caused a significant drop of cell survival, as they acted as aODNs. Additionally, an HpDI3-A-TA dose response was performed (Fig. 2c). The highest

cytotoxicity was 86% at 100 nM HpdI3-A-TA using 1:100 PPRH:DOTAP molar ratio (10 μ M DOTAP), similar to that produced by the Template-PPRH HpdI3-B. The minimum time that HpdI3-A-TA needed to cause cell death was analyzed by removing the PPRH at different time intervals (Fig. 2d). At 48h, almost the maximum activity was achieved.

Effects of Coding-PPRHs on DHFR activity. The 6-[3 H]-deoxyuridine assay was used to determine DHFR activity in SKBR3 cells incubated with Coding-PPRHs (against DHFR mRNA) for 72h. HpdI3-A-TA 100 nM DOTAP 10 μ M (1:100 ratio), showed the greatest inhibition of DHFR activity (60%, Fig. 3a), in agreement with the cytotoxicity results. Lower PPRH:DOTAP molar ratios caused less DHFR inhibition, despite the increase in PPRH concentration. HpdI3-A-NH also inhibited DHFR activity but in a lesser extent than HpdI3-A-TA 100 nM, whereas DOTAP 10 μ M alone or HpdI3-A-WC did not provoke any decrease in DHFR activity.

Effects of Coding-PPRHs on DHFR mRNA levels. SKBR3 cells were incubated with Coding-PPRHs for 72 hours. Surprisingly, HpdI3-A-TA (100 nM) produced only a decrease of 20% in DHFR mRNA levels, whereas a reduction close to 50% was caused by the aODN HATNL-24 and the *dhfr* Template-PPRH HpdI3-B (Fig. 3b). HpdI3-A-NH also caused a very slight decrease in DHFR mRNA levels (17%). The different controls did not produce a drop in DHFR mRNA levels.

Effects of Coding-PPRHs on DHFR pre-mRNA levels. Taking into account that the PPRH target sequence was included in intron-3, we decided to study if there was any change in the pre-mRNA levels. Three different species were analyzed by RT-Real Time PCR, Exon3-Intron3 corresponding to pre-mRNA levels, Exon3-Exon4, corresponding to the splicing of

intron-3, and Exon3-Exon5, to explore exon-4 skipping (Fig. 3c). As shown in Fig. 3d, when SKBR3 cells were incubated for 72h with HpdI3-A-TA, an increase of more than 200% was observed in the pre-mRNA levels, whereas the amount of the Exon3-Exon4 and Exon3-Exon5 products were reduced by 22% and 42%, respectively. The relative abundance of each RNA species was 3.8% for pre-mRNA, 50% for Exon3-Exon4 and 46.2% for Exon3-Exon5. The negative control HpdI3-WC did not provoke a significant drop in DHFR mRNA levels. No loss of exon-4 was observed (data not shown).

Effects of Coding-PPRHs on DHFR pre-mRNA splicing. The increase in the pre-mRNA DHFR levels, followed by a decrease of the spliced form suggested a possible alteration in the splicing process of intron-3 in the presence of Coding-PPRHs. To study this possibility, we generated the plasmids pDCHIP and pDCHIP-Hp. The insertion of the human *dhfr* HpdI3-A-TA target sequence in the intron sequence present in pDCHIP to generate pDCHIP-Hp, did not affect the splicing of intron-1 and the functionality of the DHFR protein (data not shown), as DCHM1 and DCHM1-Hp cells grew normally in -GHT medium. No other HpdI3-A-TA target sequence was found in the CHO *dhfr* gene.

Next, we proceeded to perform *in vitro* splicing experiments with probes generated by *in vitro* transcription from pDCHIP and pDCHIP-Hp plasmids. Representative images of the different species after DHFR pre-mRNA splicing from the DCHIP and DCHIP-Hp probes are shown in Figs. 4a and c. The upper band corresponded to the pre-mRNA probe; the second band to the spliced product, and the lower corresponded to free exon-1. Figs. 4a and c also include the effect of Coding-PPRHs on the *in vitro* splicing reaction from the DCHIP or DCHIP-Hp probes, respectively. No decrease in splicing was observed when DCHIP was incubated with Coding-PPRHs (Fig. 4b). In contrast, when the DCHIP-Hp probe was incubated with HpdI3-A-TA, the decrease in splicing was dose dependent, reaching a 51%

decrease at 400 nM (Fig. 4d). HpdI3-A-NH also caused a decrease in splicing (29%) but to a lesser degree than HpdI3-A-TA. The negative controls HpdI3-A-WC and HpdI3-Sc did not affect splicing.

Effects of Coding-PPRHs on U2AF65 binding. The effects of PPRHs on protein binding to HpdI3-A-TA target sequence were studied by EMSA assays. A radiolabeled probe corresponding to the HpdI3-A-TA target sequence in *dhfr* intron-3 was incubated with HeLa Nuclear Extracts specific for splicing, as shown in Fig. 5a. A DNA probe was used since U2AF65 is able to bind to either ssDNA or ssRNA polypyrimidine sequences (Singh et al. 2000). A shifted band was observed due to protein binding to the probe (gel shift). When HpdI3-A-TA was added as competitor, a dose dependent decrease in the gel-shift band was observed, as well as the appearance of a lower band due to the binding of the PPRH to the probe, and an upper band due to PPRH-probe-protein binding. The upper band seemed to be mainly due to albumin binding (data not shown). To test the involvement of U2AF65, an important splicing factor that recognizes intronic polypyrimidine sequences and recruits the splicing machinery, in the molecular mechanism of Coding-PPRHs splicing blockage, a super-shift assay using U2AF65 antibody was performed (Fig. 5b). When using 1 μ g of NE in the presence of U2AF65 antibody, a super-shifted band and a decrease of 40% in the intensity of the shifted band was observed, whereas with 0.5 μ g of NE a major decrease of 88% in the gel-shift was observed, although the super-shifted band was not visually detectable.

Specificity. The specificity of HpdI3-A-TA was assessed by BLAST analysis, by determining the mRNA levels of unrelated genes and by cell survival analysis after its transfection in cells lacking the HpdI3-A-TA target sequence. The mRNA levels of

Telomerase, Survivin, UGT1A10 and *S100A4* genes did not change significantly in SKBR3 cells incubated for 72h with HpdI3-A-TA, as shown in Table 2.

DCHM1 or DCHM1-Hp cells were incubated with Coding-PPRHs in DHFR selective medium -GHT. Interestingly, after one week of incubation, (Fig. 6b) only DCHM1-Hp (cells containing the HpdI3-A-TA target sequence) suffered a decrease in cell survival of 40% when treated with HpdI3-A-TA, and of 21% when incubated with HpdI3-A-NH. Negative controls HpdI3-A-WC and HpdI3-Sc provoked a relative cell death, which was not statistically significant, in both transfected cell lines.

Effects of Coding-PPRHs on methotrexate resistant cells. The effectiveness of Coding-PPRHs in breast cancer MCF7 cells resistant to 10^{-6} M of the chemotherapeutic drug methotrexate was tested. These cells have the *dhfr locus* amplified (gene copy number 58) and overexpress DHFR mRNA (mRNA fold change 33) (Selga et al. 2009). HpdI3-A-TA presented a higher cytotoxicity than HpdI3-A-TG and HpdI3-A-NH (58%, 30% and 45%, respectively) in these cells (Fig. 7a). The aODN HATNL-24 (at its optimal conditions, 1:10 aODN:DOTAP molar ratio) scarcely showed any effect. DOTAP 10 μ M and HpdI3-Sc caused a certain degree of cell death, unlike HpdI3-A-TA without DOTAP and HpdI3-A-WC. Template HpdI3-B showed a greater effect than HpdI3-A-TA (71%). As previously noted in SKBR3 cells, MCF7-R cells did not present a large DHFR mRNA decrease after HpdI3-A-TA transfection (Fig. 7b). However, at the protein level, a 40% decrease in DHFR was observed upon incubation of MCF7-R cells with HpdI3-A-TA (Fig. 7c). HpdI3-B (Template-PPRH) and HpdI3-A-NH also caused a decrease in DHFR protein levels, whereas DOTAP and HpdI3-A-WC did not cause a significant effect.

DISCUSSION

The ability to selectively modulate the activity of genes is a long-standing goal in molecular medicine (Jain et al. 2008). Template-PPRHs were previously described in our laboratory (de Almagro et al. 2009) as molecules targeting the template DNA strand, thus provoking a decrease in gene transcription. In the present study we developed a new usage for PPRHs as Coding-PPRHs that target pre-mRNA. RNA targeting has recently emerged as a potential alternative to more conventional approaches in gene therapy (Madsen et al. 2008; Wood et al. 2007). Antisense oligonucleotides that bind to pre-mRNA and sterically alter RNA processing have been successfully used in cell culture to demonstrate the utility of this approach (Bruno et al. 2004; Du et al. 2007; Gebiski et al. 2003; Suwanmanee et al. 2002). Moreover, we can also find molecules that target mRNA and provoke its degradation, like siRNAs.

Template-PPRHs were designed to bind the template DNA strand. However, targeting a PPRH towards an mRNA sequence implies that it is also directed towards the DNA coding strand. Thus, Coding-PPRHs could theoretically bind to both mRNA and DNA. As it is shown in the binding assays, HpdI3-A-TA is able to bind both single and double stranded sequences, although it preferably binds to the single stranded. Pre-mRNA accumulation followed by a decrease of the spliced forms of RNA suggests that the predominant PPRH mechanism of action is related to splicing interference. The possibility of a slight decrease in transcription due the binding of the PPRH to the coding strand cannot be ruled out.

Coding-PPRHs against the human *dhfr* gene showed a noticeable activity in decreasing DHFR expression. At the suitable PPRH:DOTAP molar ratio (1:100), 100nM HpdI3-A-TA

caused more than a 90% of cell death, similar to that caused by Template HpdI3-B (targeting the template DNA strand). HpdI3-A-TA was more active than the aODN HATNL-24, when used at their optimal conditions. The time of action of Coding-PPRHs was very fast since 48 hours were enough to exert their action.

The treatment of the cells with HpdI3-A-TA resulted in a decrease of both DHFR protein and enzymatic activity, but interestingly, when determining DHFR mRNA levels, there was only a small decrease, lower than expected. Since the mRNA analysis method to measure DHFR mRNA was based on exon-1 detection, changes in mRNA levels around intron 3 may have been overlooked. When DHFR hnRNA levels were measured after HpdI3-A-TA transfection a surprising increase was observed, in contrast with the decrease in the species that had spliced intron-3. These results suggested that HpdI3-A-TA could provoke interference in the splicing process, as it caused an accumulation of pre-mRNA, followed by an mRNA decrease after splicing. The small decrease observed at first instance when measuring DHFR mRNA levels using the exon-1 probe could be explained considering that it corresponded to the pool of all the DHFR pre-mRNA and mRNA species present in the cell at that moment, thus the mean between the increase of the pre-mRNA levels and the decrease of the spliced forms. Despite the noticeable pre-mRNA rise, there is a resulting slight decrease of the DHFR mRNA pool value; this could be due to the presence of higher levels of mature mRNAs than of pre-mRNAs because of their longer half-life (relative abundance of pre-mRNA was 3.8% and 96.2% mature mRNA). Since Coding-PPRHs interfered with splicing, it raised the possibility for exon-4 skipping, but no loss of this exon was observed. The involvement of splicing in the mechanism of action of Coding-PPRHs was studied by *in vitro* splicing reactions. Indeed, when an intron containing a Coding-PPRH target sequence was incubated with HpdI3-A-TA, a noticeable decrease of 50% in the spliced form was observed.

The target sequence of Coding-PPRHs consists of a polypyrimidine stretch, and it is well known the importance of polypyrimidine stretches in intron splicing. Regions of 15–30 contiguous purine or pyrimidine tracts are greatly overrepresented in all eukaryotic species, ranging from yeast to human (Behe 1995; Bucher and Yagil 1991) and are preferably found in promoters and introns, and with less frequency in exons. The polypyrimidine tract is one of the important *cis*-acting sequence elements directing intron removal in pre-mRNA splicing, but it is not the only polypyrimidine stretch that plays an important role in splicing. Substitutions, as well as progressive deletions in the 3'-splice site polypyrimidine tract, were found to inhibit spliceosome formation and splicing (Coolidge et al. 1997; Maschhoff and Padgett 1992). Despite the important role of the polypyrimidine tract in splicing, there appears to be great flexibility in the specific sequence of a given tract including the introduction of purines (Coolidge et al. 1997).

In mammals, U2 Auxiliary Factor (U2AF) binds to the polypyrimidine tract (Zamore et al. 1992) and regulation of splicing is given by having multiple proteins compete for binding to that pyrimidine tract, particularly sex-lethal protein and PTB (Polypyrimidine Tract Binding protein) (Lin and Patton 1995; Singh et al. 1995; Valcarcel et al. 1993). U2AF recognizes consensus 3'-splice site sequences in the pre-mRNA and coordinates the initial states of spliceosome assembly. Mammalian pyrimidine tracts vary in length and sequence composition, which are frequently interrupted with purines (Senapathy et al. 1990; Sickmier et al. 2006). U2AF is formed by two subunits, U2AF65 that binds to the polypyrimidine target sequence, and U2AF35 that interacts with other proteins to form the spliceosome. Since formation of the U2AF complex commits the pre-mRNA to be spliced (Michaud and Reed 1991), U2AF/pre-mRNA interactions present a key target for regulation. Coding-

PPRHs could act as an additional competitor for U2AF binding sites or just constitute a steric blockage for splicing, avoiding spliceosome formation. According to our results, Coding-PPRHs would preferably prevent U2AF rather than PTB binding to their target sequences, as PTB is involved in alternative splicing (Cote et al. 2001; Izquierdo et al. 2005; Le Guiner et al. 2001; Shen et al. 2004; Stern et al. 2009), and no modification of the exon pattern was observed.

There have been previous studies reporting the use of oligonucleotides to regulate splicing of specific genes with successful results. In those approaches, aODNs were implemented to interfere with translation and pre-mRNA splicing, changing levels of alternatively spliced genes, or skipping an exon in order to restore a disrupted reading frame (Aartsma-Rus and van Ommen 2007; Marshall et al. 2007). Antisense RNAs have also been studied. HeLa or K562 cells that stably expressed thalassemic genes, when treated with U7 and U1 small nuclear RNAs modified to contain sequences antisense to the aberrant splice sites, restored correct splicing and correct expression of β -globin (Vacek et al. 2003).

One of the major problems of all molecules targeting nucleic acid sequences is the specificity of recognition of their target sequence. To assess Coding-PPRH specificity, aside from Blast analysis, different negative controls (Hp-Sc and Hp-A-WC) and changes in mRNA levels of unrelated genes, were studied. Moreover, incubation of HpdI3-A-TA in a cell line without the target sequence (DG44 plus pDCHIP) did not show any change in cell viability. On the other hand, cells containing the PPRH target sequence inserted in intron-1 (DG44 plus pDCHIP-Hp), suffered a decrease in cell survival upon Coding-PPRH incubation.

Possible therapeutic applications of Coding-PPRHs were tested incubating HpdI3-A-TA with MCF7 methotrexate resistant cells. These cells that survived 10^{-6} M methotrexate, died when incubated with HpdI3-A-TA. These results could have an important repercussion as drug resistance caused by gene overexpression could be overcome using PPRHs.

Coding-PPRHs extend the application of PPRHs, as the use of Template-PPRHs was limited to the presence of polypyrimidine sequences in the template DNA strand. Coding-PPRHs allow the use of this technology to genes where the polypyrimidine sequence is located in the coding DNA strand. Both types of PPRHs show very similar activity.

In previous studies we compared Template-PPRHs action with that of a siRNA directed towards the *dhfr* gene (de Almagro et al. 2009). Using the same concentration in both cases (100nM) HpdI3-B achieved the same cytotoxicity as the siRNA, but with the advantages of: i) remarkable stability (half-life of 5 days compared to the 2 days for modified aODNs); ii) easier handling since they are DNA molecules instead of RNA, and iii) easy to synthesize and inexpensive. For these reasons, PPRHs represent an alternative to the use of siRNAs.

Coding-PPRH showed a noticeable ability to specifically decrease gene expression. Thus, they could have potential applications for diseases coursing with deregulated gene expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants [SAF08-43] from “Plan Nacional de Investigación Científica” (Spain) and ISCIII-RETIC [RD06/0020/0046]. Our group holds the Quality mention from the “Generalitat de Catalunya” SGR09-118. M.C.A. is the recipient of a predoctoral fellowship from the “Generalitat de Catalunya” (FI), and N.M is holds an APIF fellowship from UB.

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

- AARTSMA-RUS A, VAN OMMEN GJ. (2007). Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *Rna* 13,1609-24.
- AVIÑÓ A, FRIEDEN M, MORALES JC, GARCÍA DE LA TORRE B, GÈUIMIL GARCÍA R, AZORÍN F, GELPÍ JL, OROZCO M, GONZÁLEZ C, ERITJA R. (2002). Properties of triple helices formed by parallel-stranded hairpins containing 8-aminopurines. *Nucleic Acids Res* 30(12),2609-19.
- BEHE MJ. (1995). An overabundance of long oligopurine tracts occurs in the genome of simple and complex eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 23,689-95.
- BRUNO IG, JIN W, COTE GJ. (2004). Correction of aberrant FGFR1 alternative RNA splicing through targeting of intronic regulatory elements. *Hum Mol Genet* 13,2409-20.
- BUCHER P, YAGIL G. (1991). Occurrence of oligopurine.oligopyrimidine tracts in eukaryotic and prokaryotic genes. *DNA Seq* 1,157-72.
- CASEY BP, GLAZER PM. (2001). Gene targeting via triple-helix formation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 67.
- CHAN PPAG, P.M. (1997). Triplex DNA: Fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy. *J. Mol. Med.* 75,267-282.
- CHASIN L. (1985). The dihydrofolate reductase locus. *Molecular cell genetics*,449-488.
- CIUDAD CJ, URLAUB G, CHASIN LA. (1988). Deletion analysis of the Chinese hamster dihydrofolate reductase gene promoter. *J Biol Chem* 263,16274-82.
- COMA S, NOE V, ERITJA R, CIUDAD CJ. (2005). Strand displacement of double-stranded DNA by triplex-forming antiparallel purine-hairpins. *Oligonucleotides* 15,269-83.
- COOLIDGE CJ, SEELY RJ, PATTON JG. (1997). Functional analysis of the polypyrimidine tract in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* 25,888-96.
- COTE J, DUPUIS S, WU JY. (2001). Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion. *J Biol Chem* 276,8535-43.
- DE ALMAGRO MC, COMA S, NOE V, CIUDAD CJ. (2009). Polypurine hairpins directed against the template strand of DNA knock down the expression of mammalian genes. *J Biol Chem* 284,11579-89.
- DU L, POLLARD JM, GATTI RA. (2007). Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104,6007-12.
- GEBSKI BL, MANN CJ, FLETCHER S, WILTON SD. (2003). Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle. *Hum Mol Genet* 12,1801-11.
- GIOVANNANGELI C, HELÉNE C. (1997). Progress in developments of triplex-based strategies. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(4),413-21.
- IZQUIERDO JM, MAJOS N, BONNAL S, MARTINEZ C, CASTELO R, GUIGO R, BILBAO D, VALCARCEL J. (2005). Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* 19,475-84.
- JAIN A, WANG G, VASQUEZ KM. (2008). DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie* 90,1117-30.
- LE GUINER C, PLET A, GALIANA D, GESNEL MC, DEL GATTO-KONCZAK F, BREATHNACH R. (2001). Polypyrimidine tract-binding protein represses splicing of

- a fibroblast growth factor receptor-2 gene alternative exon through exon sequences. *J Biol Chem* 276,43677-87.
- LIN CH, PATTON JG. (1995). Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *Rna* 1,234-45.
- MADSEN EC, MORCOS PA, MENDELSON BA, GITLIN JD. (2008). In vivo correction of a Menkes disease model using antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105,3909-14.
- MARSHALL NB, ODA SK, LONDON CA, MOULTON HM, IVERSEN PL, KERKVLIIET NI, MOURICH DV. (2007). Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing. *J Immunol Methods* 325,114-26.
- MASCHHOFF KL, PADGETT RA. (1992). Phosphorothioate substitution identifies phosphate groups important for pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* 20,1949-57.
- MICHAUD S, REED R. (1991). An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes Dev* 5,2534-46.
- NOE V, ALEMANY C, CHASIN LA, CIUDAD CJ. (1998). Retinoblastoma protein associates with SP1 and activates the hamster dihydrofolate reductase promoter. *Oncogene* 16,1931-8.
- NOE V, ALEMANY C, NICOLAS M, CIUDAD CJ. (2001). 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* 268,3163-73.
- PRASEUTH D, GUIEYSSE AL, HELENE C. (1999). Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1489,181-206.
- RODRIGUEZ M, NOE V, ALEMANY C, MIRALLES A, BEMI V, CARAGOL I, CIUDAD CJ. (1999). Effects of anti-sense oligonucleotides directed toward dihydrofolate reductase RNA in mammalian cultured cells. *Int J Cancer* 81,785-92.
- RYAN K, KOOL ET. (1998). Triplex-directed self-assembly of an artificial sliding clamp on duplex DNA. *Chem Biol* 5,59-67.
- SELGA E, OLEAGA C, RAMIREZ S, DE ALMAGRO MC, NOE V, CIUDAD CJ. (2009). Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate. *Genome Med* 1,83.
- SENAPATHY P, SHAPIRO MB, HARRIS NL. (1990). Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* 183,252-78.
- SHEN H, KAN JL, GHIGNA C, BIAMONTI G, GREEN MR. (2004). A single polypyrimidine tract binding protein (PTB) binding site mediates splicing inhibition at mouse IgM exons M1 and M2. *Rna* 10,787-94.
- SICKMIER EA, FRATO KE, SHEN H, PARANAWITHANA SR, GREEN MR, KIELKOPF CL. (2006). Structural basis for polypyrimidine tract recognition by the essential pre-mRNA splicing factor U2AF65. *Mol Cell* 23,49-59.
- SINGH R, BANERJEE H, GREEN MR. (2000). Differential recognition of the polypyrimidine-tract by the general splicing factor U2AF65 and the splicing repressor sex-lethal. *Rna* 6,901-11.
- SINGH R, VALCARCEL J, GREEN MR. (1995). Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science* 268,1173-6.
- STERN MZ, GUPTA SK, SALMON-DIVON M, HAHAM T, BARDA O, LEVI S, WACHTEL C, NILSEN TW, MICHAELI S. (2009). Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism. *Rna* 15,648-65.

- SUWANMANEE T, SIERAKOWSKA H, FUCHAROEN S, KOLE R. (2002). Repair of a splicing defect in erythroid cells from patients with beta-thalassemia/HbE disorder. *Mol Ther* 6,718-26.
- VACEK M, SAZANI P, KOLE R. (2003). Antisense-mediated redirection of mRNA splicing. *Cell Mol Life Sci* 60,825-33.
- VALCARCEL J, SINGH R, ZAMORE PD, GREEN MR. (1993). The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA. *Nature* 362,171-5.
- WOOD M, YIN H, MCCLOREY G. (2007). Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet* 3,e109.
- ZAMORE PD, PATTON JG, GREEN MR. (1992). Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. *Nature* 355,609-14.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Coding-PPRH binding to its target sequence in the *dhfr* gene. (a) Scheme of the *dhfr* gene and the PPRH target location. (b) Schematic representation of PPRHs binding to their polypyrimidine ssDNA target within *dhfr* intron 3. The sequences in parenthesis are not PPRH target sequences. Curved lines refer to Hoogsteen bonds, whereas straight lines correspond to Watson-Crick bonds. (c) Binding of Coding-PPRHs to [³²P]-dsDNA polypyrimidine/polypurine (Duplex) or to [³²P]-ssDNA (For). The mobility of the probes alone (For and Duplex) is shown in the two first lanes on the left. The following lanes represent the bindings using HpdI3-A-TA (A-TA), HpdI3-A-WC (A-WC) and HpdI3-A-NH (A-NH) either with the ssDNA (For) and dsDNA (Duplex) probes. (d) Binding of Coding-PPRHs to [³²P]-ssRNA. The mobility of the probe alone is shown in the first lane on the left. The following lanes correspond to the binding using either HpdI3-A-TA (A-TA), HpdI3-A-NH (A-NH) or HpdI3-A-WC (A-WC). Arrows indicate the bands corresponding to the different species (ssDNA, dsDNA, RNA or triplex).

Figure 2. Cytotoxicity caused by Coding-PPRHs. (a) The suitable nucleotide to place when a purine interruption is found in the target sequence. Two PPRHs, one with an adenine (HpdI3-A-TA) and another with a guanine (HpdI3-A-TG) were tested for cell survival in SKBR3 breast cancer cells. The effects of DOTAP 10μM alone and that of aODN HATNL-24 are also shown. (b) Comparison of the cytotoxic effect caused by HpdI3-A-TA with that produced by HpdI3-A-NH, or by the negative controls HpdI3-A-WC and HpdI3-Sc. Additional controls were: DOTAP 10μM alone, HpdI3-A-TA without DOTAP and aODN HATNL-24. (c) Study of the optimal PPRH:DOTAP molar

ratio to attain maximum cytotoxicity. HpdI3-A-TA was incubated at varying concentrations in combination with a fixed concentration of 10 μ M DOTAP. For comparative purposes HpdI3-B was used. (d) Minimum time needed for PPRH action. After transfection of 100 nM HpdI3-A-TA with 10 μ M DOTAP, culture medium was changed at the indicated times. For all conditions, 10,000 SKBR3 cells were plated in DHFR selective medium (-GHT) for a week, after which the MTT assay was performed. Data represent the mean \pm SEM of at least four experiments (a, b, c) or at least three experiments (d). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

Figure 3. DHFR activity and mRNA levels in SKBR3 cells treated with Coding-PPRHs.

(a) Dose response of the effect of Coding-PPRHs on DHFR activity. 10,000 SKBR3 cells were incubated in Ham's F-12 medium lacking thymidine with DOTAP alone (10 μ M) and increasing concentrations of HpdI3-A-TA. HpdI3-A-NH and HpdI3-A-WC were used at 100 nM. Two days after transfection, 6-[³H]-deoxyuridine was added for 24h and its incorporation into DNA was quantified to determine DHFR activity. Data represent the mean \pm SEM of three experiments. (b) Dose response of the effect of Coding-PPRHs on DHFR mRNA levels. 30,000 SKBR3 cells were incubated with HpdI3-A-TA at the indicated concentrations plus 10 μ M DOTAP. For comparative purposes the effect of the aODN HATNL-24 and Template HpdI3-B were also tested. HpdI3-A-NH and negative controls HpdI3-A-WC and HpdI3-Sc, as well as DOTAP 10 μ M and HpdI3-A-TA without DOTAP were used. Three days after transfection, DHFR mRNA levels were determined by RT-Real Time-PCR using APRT to normalize the results. Data represent the mean \pm SEM of at least ten experiments. (c) Schematic representation of the primers used to measure *dhfr* pre-mRNA and mRNA levels as well

as the sizes of the possible species obtained with each pair. (d) Pre-mRNA and mRNA levels. 30,000 SKBR3 cells were incubated with HpdI3-A-TA or HpdI3-A-WC 100 nM plus 10 μ M DOTAP. For each incubation condition, three different fragments were analysed: Exon3-Intron3 (plain bars), Exon3-Exon4 (dotted bars), and Exon3-Exon5 (striped bars). In all conditions, three days after transfection, DHFR RNA levels were determined by RT-Real Time-PCR using APRT mRNA levels to normalize the results. Data represent the mean \pm SEM of at least five experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

Figure 4. Effect of Coding-PPRHs on *in vitro* splicing. (a) and (c) Representative images of the splicing products obtained from *in vitro* splicing reactions using the DCHIP and DCHIP-Hp RNA probes, respectively, incubated with the different hairpin molecules. Arrows indicate the sizes of the different products. The first lane in each figure corresponds to the unspliced probes in the absence of HeLa nuclear extract (NE). The second lane shows the spliced species after incubation with HeLa nuclear extracts. In the following lanes the effect on splicing of HpdI3-A-TA, HpdI3-A-NH and the negative controls HpdI3-A-WC and HpdI3-Sc is shown. (b) and (d) Quantitation of the spliced products formed after incubation of DCHIP and DCHIP-Hp probes with the indicated Coding-PPRHs. The results were normalized using the signal of the whole lane as reference. Background correction was performed. Data represent the mean \pm SEM of at least three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

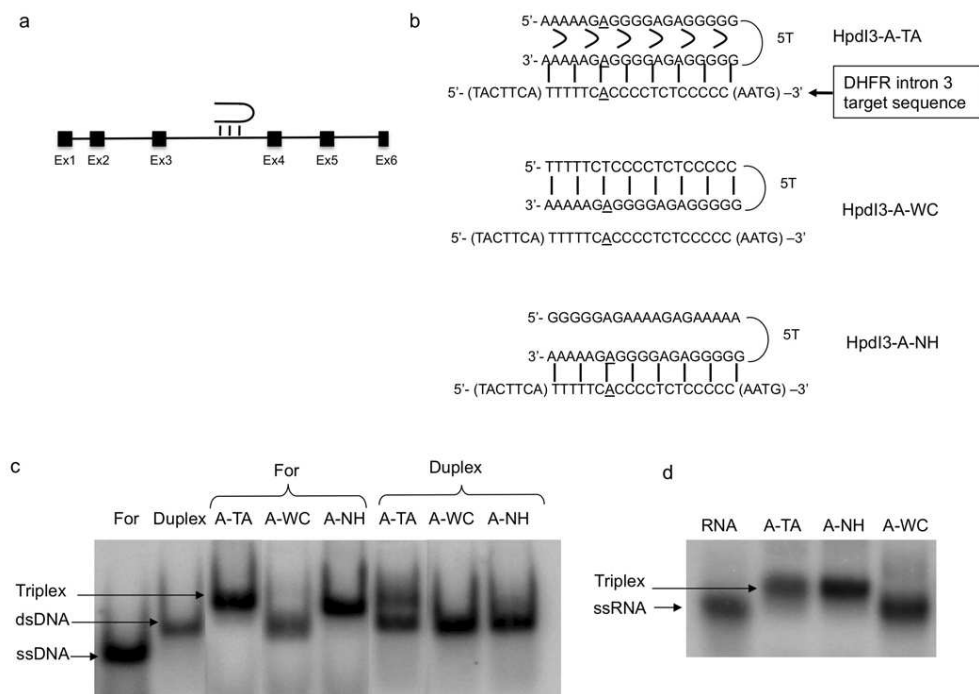
Figure 5. U2AF65 binding; PPRH competition. A radiolabeled probe corresponding to the HpdI3-A-TA target sequence in *dhfr* intron-3 was incubated with 1 μ g of HeLa

Nuclear Extract (NE) and tRNA as unspecific competitor The first lane in each figure corresponds to the probe in the absence of NE. (a) Gel-shift assay. Binding of HpdI3-A-TA target sequence to NE (second lane) and competition with HpdI3-A-TA at different fold excess (3rd-6th lanes). HpdI3-A-NH, HpdI3-A-WC and HpdI3-Sc were used at 200-fold excess. (b) Super-shift assay. U2AF65 antibody was incubated with different NE amounts, 1 μ g or 0.5 μ g. The second and forth lanes show the gel-shift caused after incubation with NE, and the third and fifth lanes represents the binding pattern after incubation with the antibody. Bands are indicated by arrows.

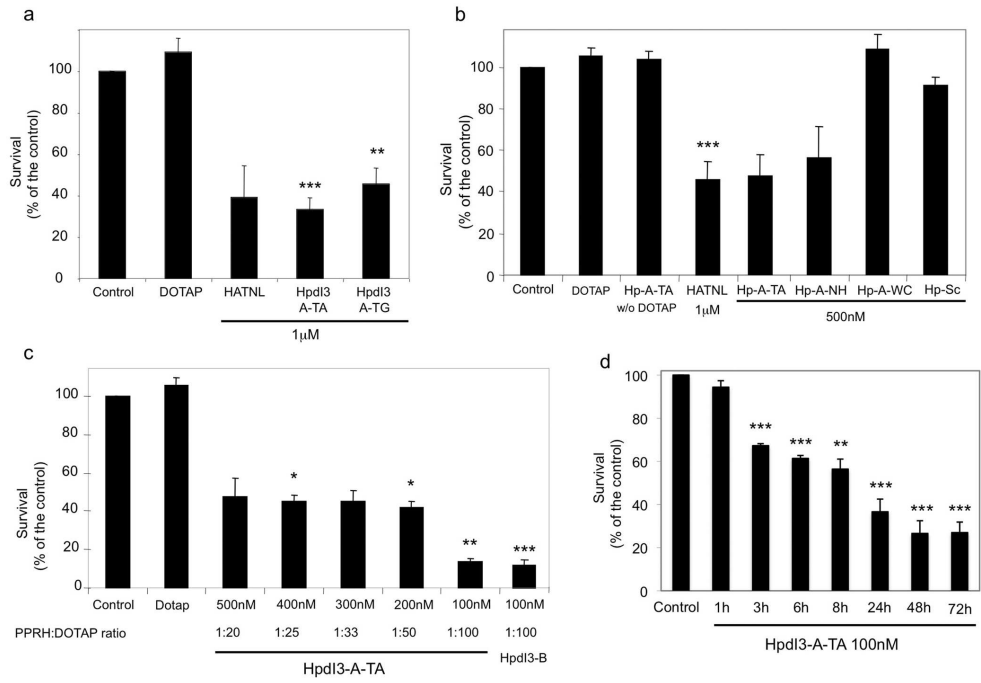
Figure 6. Coding-PPRH specificity. *Dhfr*⁻ DG44 cells (30,000) stably transfected with (a) pDCHIP (DCHM1 cells) or (b) pDCHIP-Hp (DCHM1-Hp cells) were incubated with Coding-PPRHs, in DHFR selective medium (-GHT) for a week after which MTT assays were performed. The hairpins used were HpdI3-A-TA, HpdI3-A-NH, HpdI3-A-WC or HpdI3-Sc incubated at the indicated concentrations plus 10 μ M DOTAP. Data represent the mean \pm SEM of four experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.

Figure 7. Effects of Coding-PPRHs in MCF7 cells resistant to 10^{-6} M MTX. (a) Cytotoxicity. 10,000 MCF7-R cells were plated in DHFR selective medium (-GHT). Cells were incubated with hairpins HpdI3-A-TA, HpdI3-A-TG, HpdI3-A-NH, or the negative controls HpdI3-A-WC and HpdI3-Sc at the indicated concentrations plus 10 μ M DOTAP. The effect of DOTAP 10 μ M alone and HpdI3-A-TA without DOTAP was also determined. To assess cell responsiveness and for comparison purposes the aODN HATNL-24 and the Template hairpin HpdI3-B were also tested. A week after

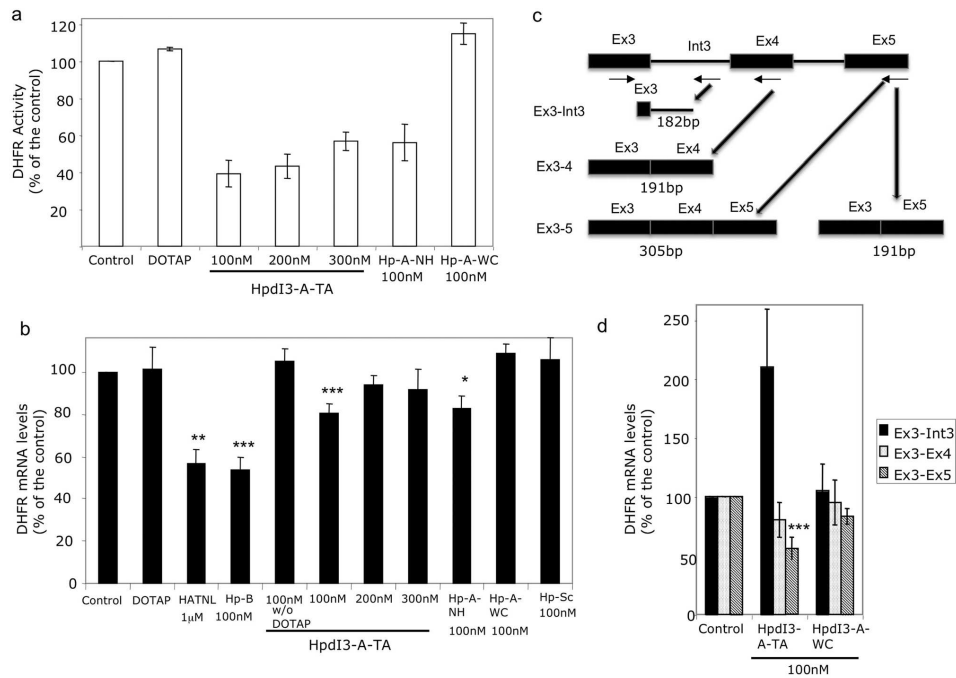
treatment, MTT assays were performed. Data represent the mean \pm SEM of at least four experiments. (b) DHFR mRNA levels. MCF7-R cells (30,000) were incubated with the indicated PPRHs, aODN HATNL-24 or 30 μ M DOTAP. Three days after transfection, DHFR mRNA levels were determined by RT-Real Time-PCR using the signal corresponding to APRT mRNA to normalize the results. Data represent the mean \pm SEM of at least four experiments. (c) DHFR protein levels. 30,000 MCF7-R cells were incubated with HpdI3-B, HpdI3-A-TA, HpdI3-A-NH, HpdI3-A-WC 300 nM or 30 μ M DOTAP alone. Three days after transfection, DHFR protein levels were determined by Western blot using Tubulin to normalize the results. Data represent the mean \pm SEM of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.005$.



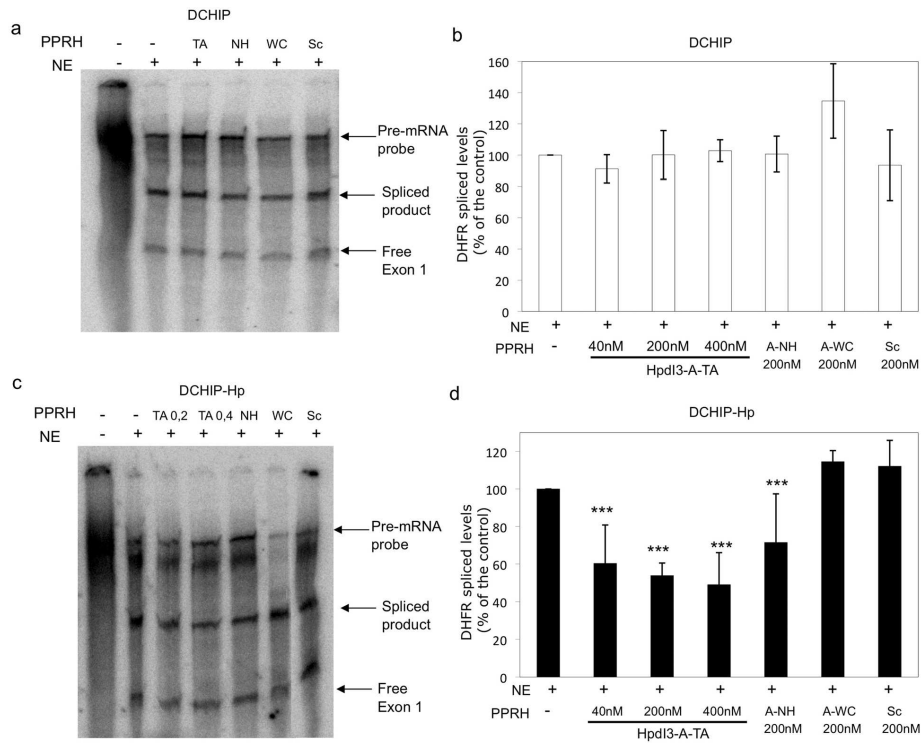
90x64mm (300 x 300 DPI)



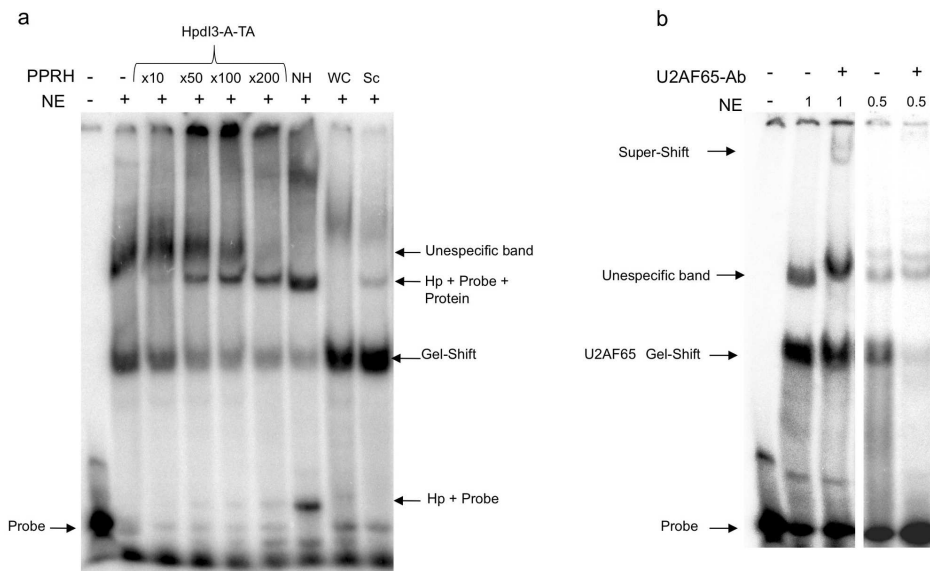
178x124mm (300 x 300 DPI)



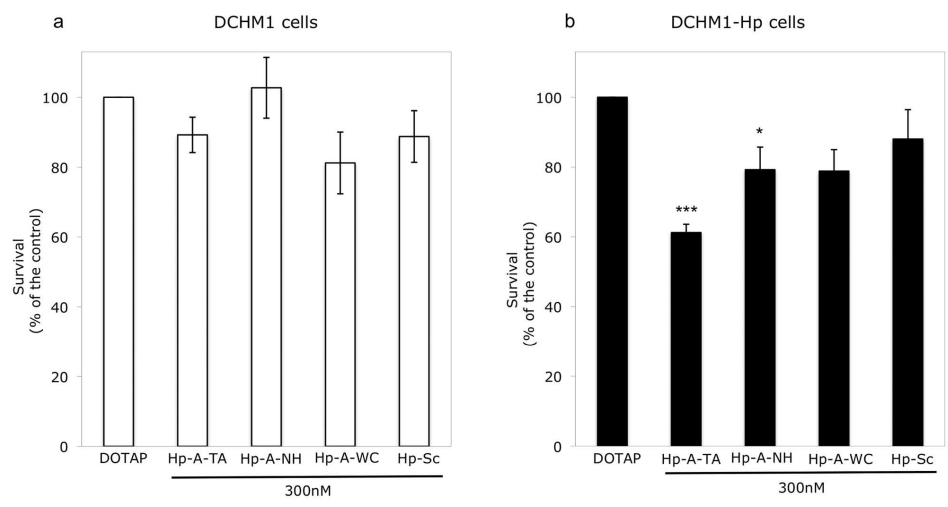
178x134mm (300 x 300 DPI)



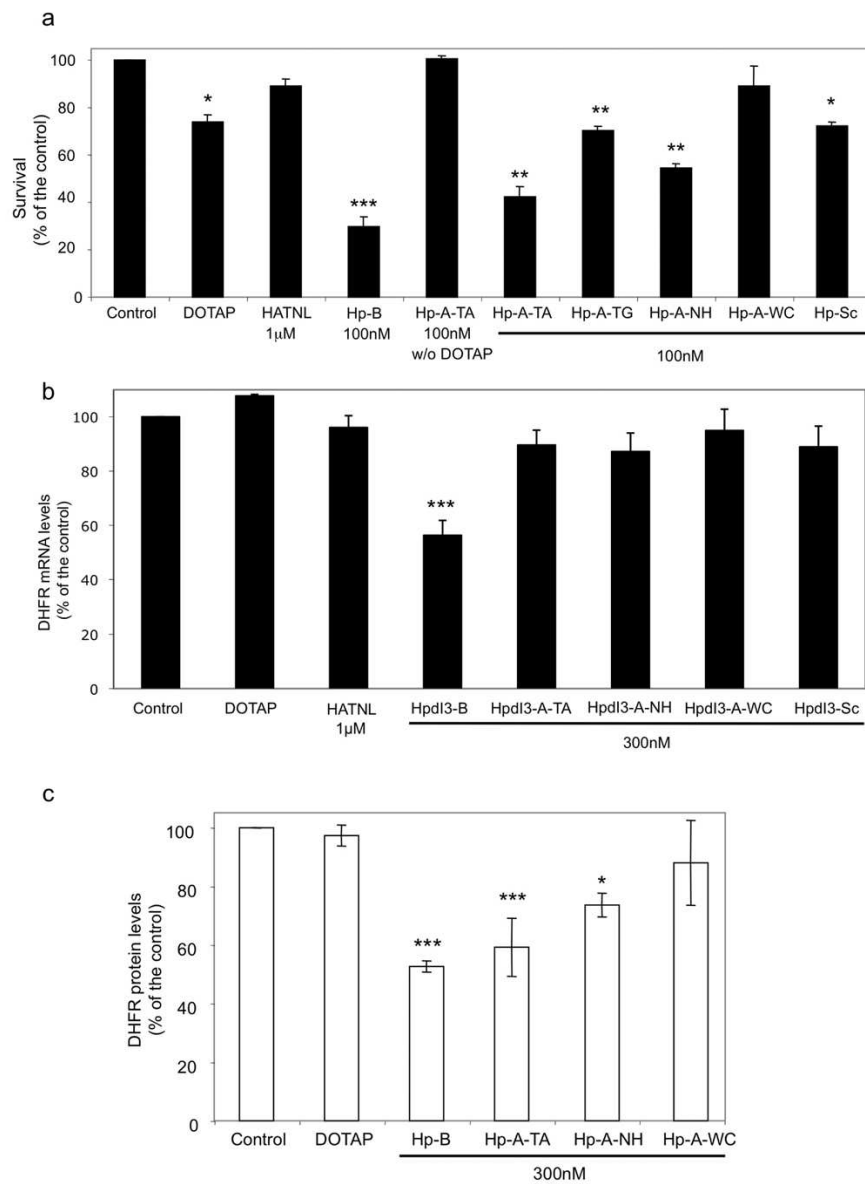
178x134mm (300 x 300 DPI)



180x111mm (300 x 300 DPI)



179x100mm (300 x 300 DPI)



87x116mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Sequences of the PPRHs used in this study and their target sequences.

<i>Name</i>	<i>Sequence</i>
<i>dhfr</i>	Target sequence Intron 3 - reverse strand
Template	5'- (CATTCTCTTGATTG)CCTCCTCCCTCTCCCTCCTC -3'
HpdI3- B	5'- GGAGGAGGGAGAGGGAGGAG-(T) ₅ - GAGGAGGGAGAGGGAGGAGG -3'
<i>dhfr</i>	Target sequence Intron 3 - forward strand
Coding	5'- (TACTTCA) TTTTTCACCCCTCTCCCC (AATG) -3'
HpdI3-A-TA	5'- AAAAAGAGGGGAGAGGGGG-(T) ₅ -GGGGGAGAGGGGGAGAAAAA-3'
HpdI3-A-TG	5'- AAAAAGGGGGGAGAGGGGG-(T) ₅ -GGGGGAGAGGGGGGAAAAA-3'
HpdI3-A-TA-WC	5'- TTTTCTCCCTCTCCCC-(T) ₅ -GGGGGAGAGGGGGAGAAAAA-3'
HpdI3-A-TA-NH	5'- GGGGGAGAAAAGAGAAAAA-(T) ₅ -GGGGGAGAGGGGGAGAAAAA-3'
HpdI3-Sc	5'- GAGAGGAGGAGGGAGGGAGA-(T) ₅ -AGAGGGAGGGAGGAGGAGAG-3'

Bold letters indicate mismatches between the target sequence and the PPRH. The sequences in parenthesis are not PPRH target sequences.

Table 2. Coding-PPRH specificity.

	<i>dhfr</i>	<i>Telomerase</i>	<i>Survivin</i>	<i>UGT1A10</i>	<i>S100A4</i>
Control	100	100	100	100	100
HpdI3-A-TA	58,5±9,7	143,7±35,5	110±6,1	127±12,5	85,2±14,7

SKBR3 cells were transfected with HpdI3-A-TA and a RT-Real Time-PCR was performed to determine the mRNA levels of unrelated genes. Data represent the mean ± SEM of at least four experiments.

ANNEX

4.3.1. Activació de la resposta immune

Es va procedir a estudiar la capacitat dels PPRHs per activar el sistema immune, i per tant, si la citotoxicitat que observàvem era deguda a aquesta activació en comptes de la inhibició selectiva dels gens diana.

Es van utilitzar cèl·lules Jurkat (limfòcits T) per tal de mesurar les variacions en els nivells de mRNA de gens implicats en la resposta immune a oligonucleòtids, en ser transfectades amb PPRHs.

Es van incubar 30.000 cèl·lules Jurkat durant 48h amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio (10 μ M). Es va extreure el RNA total i es van analitzar per RT-Real Time PCR els nivells d'expressió de DAI, IFN α , IFN β , OAS1 i DHFR (aquesta darrera com a control del correcte funcionament dels PPRHs) (Fig.1). Es va utilitzar el senyal corresponent a l'mRNA de l'APRT per normalitzar els resultats. No es van observar augments significatius en els valors de cap d'aquests gens implicats en la resposta immune a oligonucleòtids.

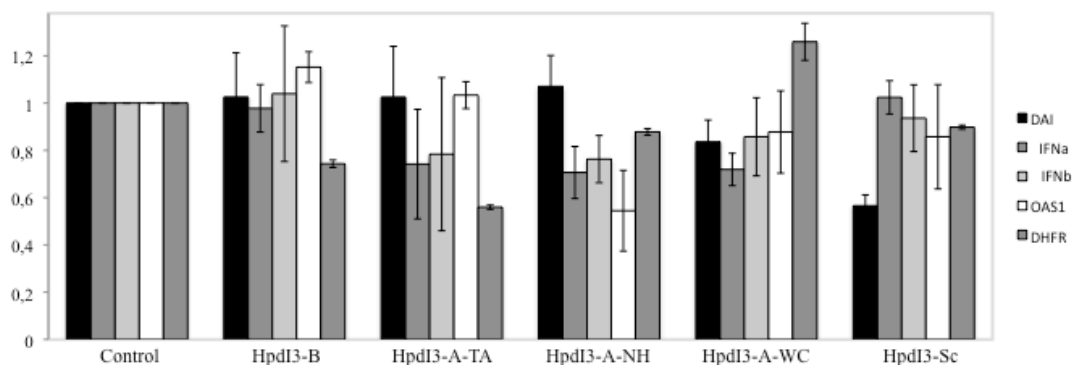


Fig.1. Anàlisi dels nivells de mRNA de gens de resposta immune. 30.000 cèl·lules Jurkat van ser incubades durant 48h amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Es van analitzar els nivells de mRNA per RT-Real Time PCR, i es van normalitzar els valors per l'APRT. Els valors representen la mitja \pm SEM de al menys tres experiments.

L'especificitat de la citotoxicitat produïda pels PPRHs també va ser analitzada utilitzant Template-PPRHs contra gens que no s'expressin; per tant, si s'observés citotoxicitat aquesta seria deguda simplement a la unió del hairpin al DNA i no a la

inhibició de la transcripció dels gens diana. En incubar cèl·lules MiaPaCa amb un PPRH contra el receptor d'estrògens (gen que no es troba expressat en aquest tipus cel·lular) no es va observar cap variació en la viabilitat cel·lular, indicant que la citotoxicitat dels PPRHs és deguda a la inhibició transcripcional.

4.3.2. Aplicació dels Template-PPRHs

Es va procedir a l'estudi de l'aplicabilitat del PPRHs en altres gens que una vegada inhibits causessin apoptosi, per tal de poder ésser utilitzats com a eines terapèutiques.

Es van dissenyar PPRHs contra els gens: *topoisomerasa I*, *bcl-2*, *mdm2*, i *c-myc*. Aquests es van assajar en tres línies cel·lulars de càncer de mama diferents: SKBR3, MCF7 i MDA-MB 468.

- *c-Myc*

Es va dissenyar un PPRH contra el gen *c-myc*. Es va trobar una seqüència de polipirimidines en l'intró 1, de 34 nt i amb 3 interrupcions (seqüències en la secció 3.1.3.2- PPRHs). El fet que fos un oligonucleòtid tan llarg ens va permetre estudiar si la transfecció de PPRHs tan llargs era viable.



Es va assajar l'activitat citotòxica d'aquest PPRH a les tres línies de càncer de mama. Com es pot apreciar a la figura 2, el HpmycI1-B a una concentració de 100 nM causava a les tres línies cel·lulars una notable citotoxicitat, quedant aproximadament un 10% de supervivència. El control negatiu WC causava un 20% de mort inespecífica mentre que Hp-Sc no tenia efecte.

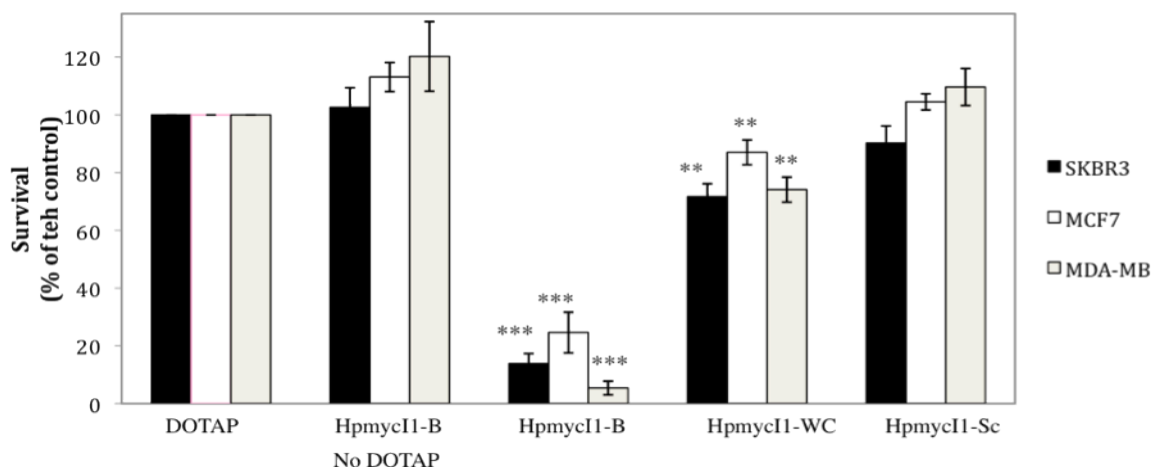


Fig.2. Citotoxicitat causada pels *c-myc* PPRHs. 30.000 cèl·lules SKBR3, MCF7 o MDA-MB 468 van ser incubades amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Al cap d'una setmana es van realitzar assajos de MTT. Els valors representen la mitja±SEM de al menys tres experiments. ** $p < 0,01$, or *** $p < 0,005$.

Per tal d'assegurar que l'efecte observat era degut a l'acció dels PPRHs sobre *c-myc*, es van mesurar els nivells de mRNA, tal com es pot observar a la figura 3.

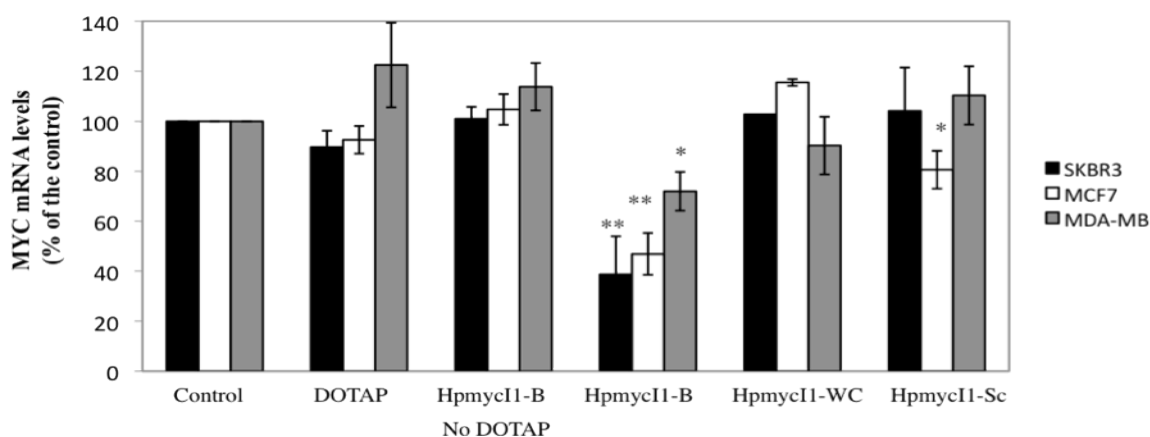
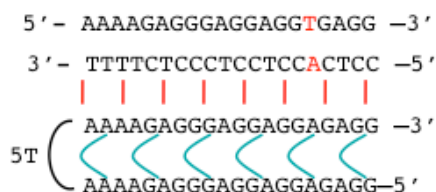


Fig.3. Anàlisi dels nivells de mRNA de *c-myc*. 30.000 cèl·lules SKBR3, MCF7 o MDA-MB 468 van ser incubades durant 48h amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Es van analitzar els nivells de mRNA per RT-Real Time PCR, i es van normalitzar els valors per l'APRT. Els valors representen la mitja±SEM de al menys tres experiments. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, or *** $p < 0,005$.

- *Topoisomerasa I*

Degut a la importància terapèutica de la *Topoisomerasa I*, diana de quimioteràpics tal com l'irinotecà, es va dissenyar un PPRH contra aquest gen. Es va trobar una seqüència de polipirimidines en l'intró 2, de 20 nt i amb una interrupció que va ser solventada amb una adenina al hairpin.



Es va assajar l'activitat citotòxica del PPRH en les tres línies de càncer de mama. Com es pot apreciar a la figura 4, HpTopI2-B a una concentració de 100 nM causava en les tres línies cel·lulars una notable citotoxicitat. El control negatiu WC i Sc causaven una certa mort inespecífica que en gairebé tots els casos no era significativa.

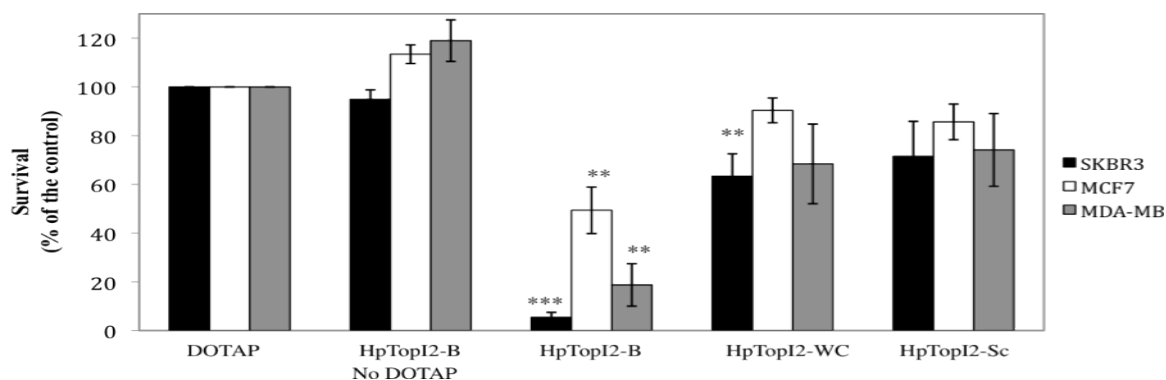


Fig.4. Citotoxicitat causada pels *top* PPRHs. 30.000 cèl·lules SKBR3, MCF7 o MDA-MB 468 van ser incubades amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Al cap d'una setmana es van realitzar assajos de MTT. Els valors representen la mitja±SEM de al menys tres experiments. ** $p < 0,01$, or *** $p < 0,005$.

Es van mesurar els nivells de mRNA per *TopI* en incubar les cèl·lules amb els PPRHs, tal com es pot observar a la figura 5, i es va observar una disminució en els nivells de mRNA de la *Topoisomerasa-1*.

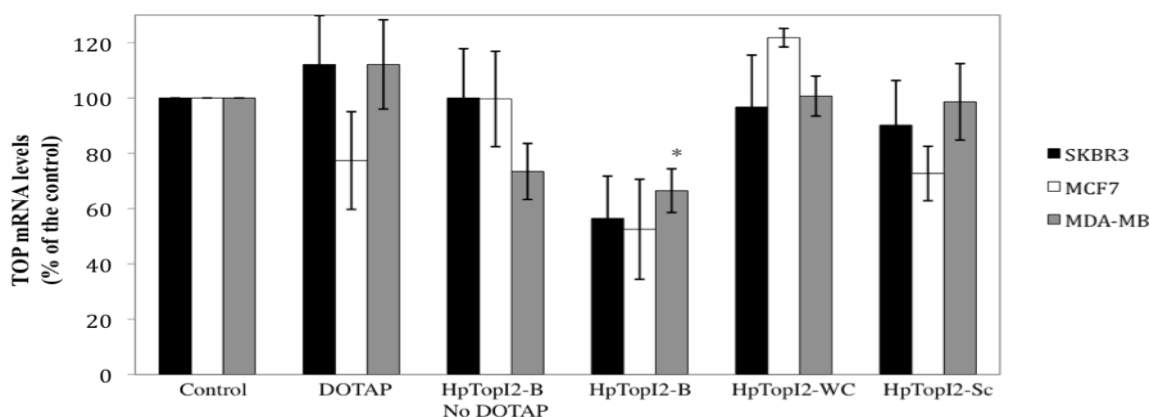


Fig.5. Anàlisi dels nivells de mRNA de *TopI*. 30.000 cèl·lules SKBR3, MCF7 o MDA-MB 468 van ser incubades durant 48h amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM

1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Es van analitzar els nivells de mRNA per RT-Real Time PCR, i es van normalitzar els valors per l'APRT. Els valors representen la mitja±SEM de al menys tres experiments. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, or *** $p < 0,005$.

- *Mdm-2*

Es va dissenyar un PPRH contra el gen *mdm-2*. Es va trobar una seqüència de polipirimidines en l'intró 7, de 21 nt i amb 3 interrupcions (seqüències en la secció 3.1.3.2- PPRHs). En aquest cas podríem estudiar si PPRHs curts amb 3 interrupcions seguien sent efectius.



Es va assajar l'activitat citotòxica en les tres línies de càncer de mama. Com es pot apreciar a la figura 6, Hpmdm17-B a una concentració de 100 nM causava en les tres línies cel·lulars una notable citotoxicitat. Els controls negatius WC i Sc no causaven cap efecte citotòxic.

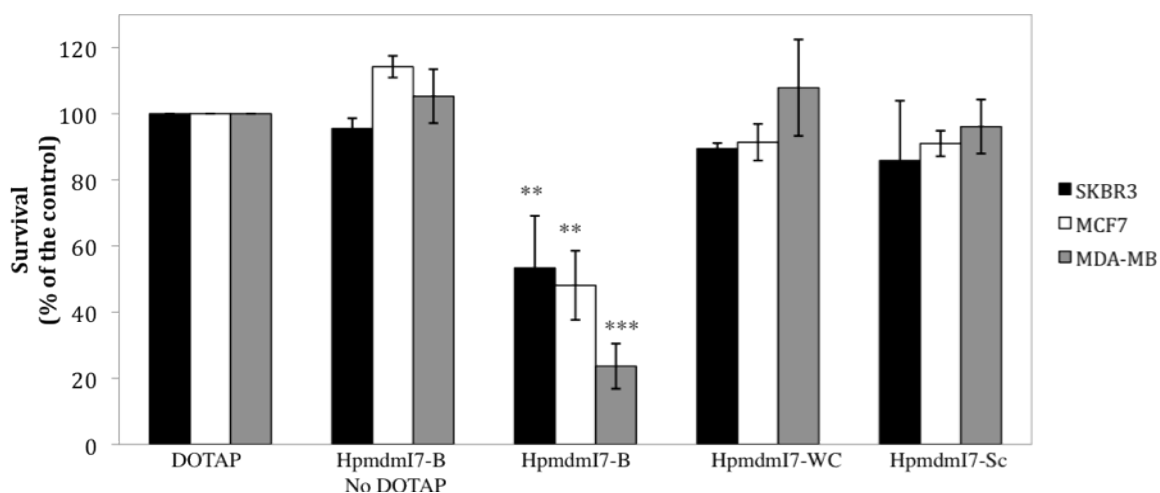


Fig.6. Citotoxicitat causada pels *mdm-2* PPRHs. 30.000 cèl·lules SKBR3, MCF7 o MDA-MB 468 van ser incubades amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Al cap d'una setmana es van realitzar assajos de MTT. Els valors representen la mitja±SEM de al menys tres experiments. ** $p < 0,01$, or *** $p < 0,005$.

Els nivells de mRNA per *mdm2* van ser analitzats tal com es pot observar a la figura 7.

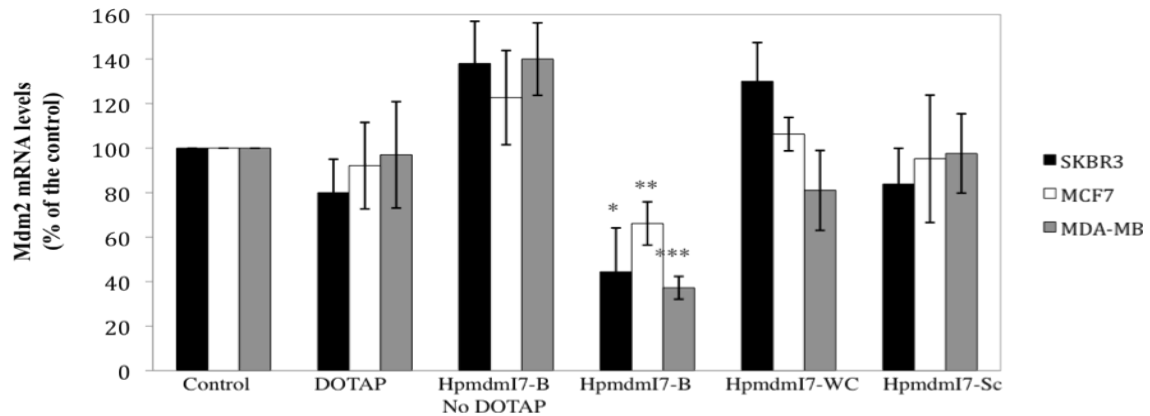
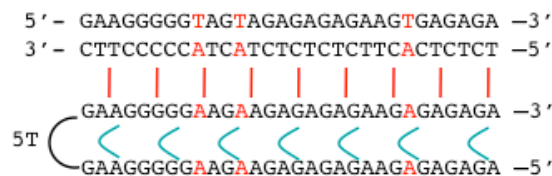


Fig.7. Anàlisi dels nivells de mRNA de *mdm2*. 30.000 cèl·lules SKBR3, MCF7 o MDA-MB 468 van ser incubades durant 48h amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Es van analitzar els nivells de mRNA per RT-Real Time PCR, i es van normalitzar els valors per l'APRT. Els valors representen la mitja±SEM de al menys tres experiments. * p < 0,05, ** p < 0,01, or *** p < 0,005.

- *Bcl-2*

El gen *bcl-2* és conegut per la seva activitat antiapoptòtica, per tant seria interessant dissenyar un PPRH contra aquest gen per la seva possible activitat terapèutica. Es va trobar una seqüència de polipirimidines en l'intró 2, de 30 nt i amb 3 interrupcions.



Es va assajar l'activitat citotòxica en les tres línies de càncer de mama. Com es pot apreciar a la figura 8, HpbclI2-B a una concentració de 100 nM causava una certa toxicitat, essent més marcada a SKBR3 i MDA-MB 468. Els controls negatius WC i Sc no causaven cap efecte citotòxic.

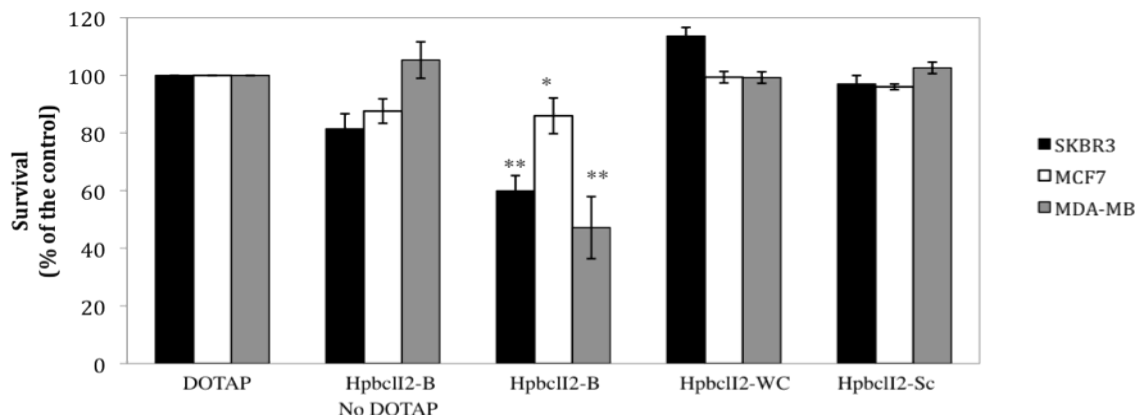


Fig.8. Citotoxicitat causada pels *bcl-2* PPRHs. 30.000 cèl·lules SKBR3, MCF7 o MDA-MB 468 van ser incubades amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Al cap d'una setmana es van realitzar assajos de MTT. Els valors representen la mitja±SEM de al menys tres experiments. * $p < 0,05$ or ** $p < 0,01$.

Per tal d'assegurar que l'efecte observat era degut a l'acció dels PPRHs sobre *bcl-2*, es van mesurar els nivells de mRNA, tal com es pot observar a la figura 9, i es va apreciar una disminució en els nivells de *bcl-2*, inclús en cèl·lules MCF7 les quals quasi no presentaven citotoxicitat deguda a HpbclI2-B.

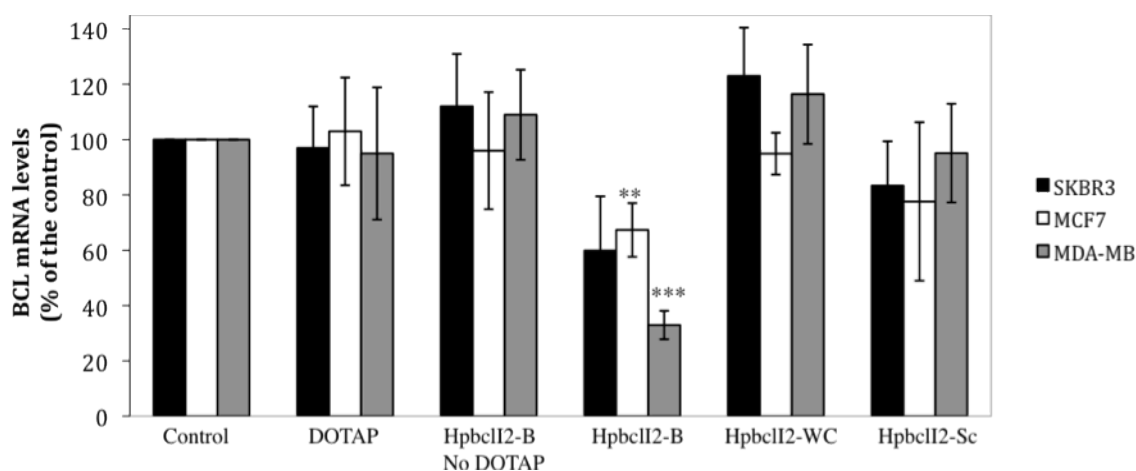


Fig.9. Anàlisi dels nivells de mRNA de *bcl-2*. 30.000 cèl·lules SKBR3, MCF7 o MDA-MB 468 van ser incubades durant 48h amb els corresponents PPRHs a una concentració de 100 nM 1:100 PPRH/DOTAP ràtio. Es van analitzar els nivells de mRNA per RT-Real Time PCR, i es van normalitzar els valors per l'APRT. Els valors representen la mitja±SEM de al menys tres experiments. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, or *** $p < 0,005$.

DISCUSSIÓ

En aquest treball, hem estudiat la resistència al quimioteràpic metotrexat en cèl·lules de càncer de mama. S'han dut a terme dos aproximacions, ja que actualment es contempla la necessitat de teràpies combinades i adjuvants que ataquin el càncer per diferents fronts, degut a la capacitat de crear resistències que tenen les cèl·lules canceroses.

Una aproximació ha estat trobar nous gens que puguin estar implicats en el procés de resistència, per tal de seleccionar noves dianes terapèutiques contra la resistència al metotrexat. S'ha trobat en cèl·lules de càncer de mama la família de les UGTs, específicament UGT1A6, com a gen sobreexpressat en cèl·lules resistents al MTX, i s'ha estudiat la seva possible implicació en el procés de resistència al MTX, i les causes que fan que estigui sobreexpressat.

Un altre aproximació ha estat l'estudi mitjançant la teràpia gènica de nous mètodes per infraexpressar el gen *dhfr*, que codifica per l'enzim diana del MTX i principal responsable de les resistències al MTX, i que aquest mètode fos aplicable a altres gens també involucrats en el desenvolupament de resistència. S'ha desenvolupat un nou tipus de molècules, els PPRHs, per tal d'inhibir l'expressió gènica a nivell de la transcripció, Template-PPRHs, o a nivell de mRNA, Coding-PPRHs. S'ha estudiat el seu mecanisme d'acció així com la seva efectivitat, estabilitat i especificitat, trobant-se resultats remarcables, que permeten considerar-los com a alternativa a altres molècules ja existents.

5.1 – UGT1A6

La resistència als quimioteràpics és un dels principals problemes que presenten aquests fàrmacs pel tractament de tumors. Entendre l'impacte que les mutacions o variacions en l'expressió gènica degudes a resistències exerceixen en els processos cel·lulars és un punt crucial per dissenyar tractaments pels càncers que no responen a la quimioteràpia convencional. En aquest treball s'ha estudiat la resistència al metotrexat en cèl·lules de càncer de mama per tal de trobar noves dianes terapèutiques que puguin pal·liar els efectes d'aquestes resistències.

Es van realitzar experiments amb microarrays d'expressió de tot el genoma humà per comparar dos línies de càncer de mama resistents al MTX amb les seves homòlogues sensibles, i es va trobar que ambdues línies tenien en comú la sobreexpressió de la família de les UGT1As. La família de les UGT1As està formada per 13 isoformes, però era el clúster de les isoformes UGT1A1-6, i particularment UGT1A6, la que es trobava sobreexpressada. A la seva vegada UGT1A6 està composta per dos membres, que es diferencien en el final de la regió 5'-UTR i l'inici de l'exó-1, sent la tipus 1 la que es trobava sobreexpressada en ambdues línies cel·lulars resistents al MTX. Això concorda amb el fet de que sembla que només UGT1A6 tipus 1 es tradueix, estant la tipus 2 només present a nivell de transcrit.

UGT1A6 és una de les UGTs més important per la glucuronidació en humans (Krishnaswamy et al. 2005), i responsable del metabolisme de fàrmacs com l'acetaminofè (Court 2001) i valproat (Ethell et al. 2003); carcinògens com el benzo(a)pirè; i substrats endògens com la serotonina (Krishnaswamy et al. 2003) i el 5-hidroxitriptofol (Krishnaswamy et al. 2004). La glucuronidació és un dels processos metabòlics de fase II més importants per a l'eliminació de xenobiòtics i substàncies endògenes. La glucuronidació fa més solubles compostos lipòfils per tal de que puguin ser eliminats per orina o per la bilis. Les UGT1As podrien d'alguna forma contribuir en cert grau al metabolisme del MTX, ja que aquest comparteix amb altres substrats de les UGT1As una estructura fenòlica. Aquest fet es podria hipotetitzar per l'augment en la supervivència de cèl·lules sensibles al MTX quan eren transfectades amb el plasmidi d'expressió de UGT1A6 juntament amb MTX. En canvi, la inhibició de UGT1A6 en cèl·lules resistents al MTX, no les sensibilitzava a aquest quimioteràpic. Tampoc ho feia

un aODN dirigit contra els altres membres del clúster UGT1A1-6 que es trobaven sobreexpressats en cèl·lules resistents. Aquest fenomen de resistència per sobreexpressió de UGT1A6 i manca de sensibilització per la seva inhibició pot ser explicat per la complementaritat i solapament d'activitat entre les diferents UGT1As. En estudis anteriors, quan s'utilitzava un siRNA dirigit contra tota la família de les UGT1As, s'apreciava una sensibilització al MTX en cèl·lules resistents, el que reforça la idea de redundància d'acció de les UGT1As (Selga et al. 2009). Així mateix, és difícil discriminar la contribució d'una sola UGT1A en el metabolisme d'un substrat. A més no es disposa de substrats específics d'una isoforma, inhibidors químics específics d'isoforma ni anticossos inhibitoris (Liu et al. 2007).

La sobreexpressió de UGT1A6 en cèl·lules resistents no era deguda a amplificació gènica, sinó a un augment en la transcripció que originaria un augment en l'activitat enzimàtica. La família UGT1A es caracteritza per la seva gran induibilitat per un gran nombre de substàncies. Entre el compostos que indueixen l'expressió de UGT1A6 es poden trobar els flavonoids, sulfurars (Wang et al. 2005), LPS (Heurtaux et al. 2006), 3-metilcolantrè (3-MC) (Grams et al. 2000), benzo[a]pirè (B[a]P), dioxina (Munzel et al. 1996), b-naftoflavona (BNF) (Yokota et al. 1989), oltipraz (Kessler et al. 1997), i rifampicina (van de Kerkhof et al. 2008). El MTX també pot ser un inductor de UGT1A6, tal com apunten els nostres resultats d'augment dels nivells de mRNA, activitat luciferasa i activitat enzimàtica en presència de MTX.

La inducció transcripcional de les UGT1As està duta a terme per diferents factors de transcripció, entre els que es troben *activator protein 1* (AP-1) (Emi et al. 1995), *constitutive active receptor* (CAR) (Yokota et al. 1989), *pregnane X receptor* (PXR) (Xie et al. 2003), *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) (Barbier et al. 2003), *antioxidant response element* (ARE) a través del Nrf2 (Yeager et al. 2009) i *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) (Emi et al. 1996). S'ha descrit que AhR causa una inducció moderada de UGT1A6 en humans i rosegadors (Munzel et al. 1998). AhR és un factor de transcripció citosòlic, que en activar-se per unió al seu lligand, s'uneix a l'*AhR nuclear translocator* (ARNT) formant l'heterodímer AhR/ARNT, el qual es dirigeix al nucli, on s'unirà a la seva seqüència diana del DNA, el *xenobiotic response element* (XRE 5'-GCGTG-3') (Carver et al. 1998). AhR/ARNT regula l'expressió d'una sèrie de gens implicats en el metabolisme de fàrmacs i hormones com són

CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2, ALDH3, GSTA2, NAD(P)H:quinona reductasa i UGT1A6 (Kress et al. 1997; Klinge et al. 2001). El TCDD (dioxina) és un dels compostos que indueix l'expressió de UGT1A6 a través de AhR/ARNT en cultius primaris d'hepatòcits i cèl·lules de càncer de còlon CaCo-2 (Munzel et al. 1998). Fins i tot, alguns agonistes AhR/ARNT causen una regulació coordinada de l'expressió de diferents enzims metabòlics, com poden ser els CYPs de fase I i les UGT1As de fase II per tal d'atenuar la producció de carcinògens tal com el benzo[a]pirè (Bock et al. 2009). A més, AhR és a la seva vegada responsable de l'homeòstasi d'algun dels seus lligands com la bilirubina (Bock and Bock-Hennig 2009). Els resultats dels assajos de luciferasa així com de gel-shift indiquen que el MTX podria estar induint l'expressió de UGT1A6 a través de l'heterodímer AhR/ARNT, però també a través d'ARNT. ARNT té la capacitat d'unir-se a altres lligands com l'*hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1), que s'uneix a una caixa del promotor diferent de XRE, (5'-CACGT-3'). S'ha observat que cèl·lules MCF7 tractades amb un siRNA per disminuir l'expressió de HIF-1 α eren sensibilitzades al MTX (Li et al. 2006). A més, la sobreexpressió d'HIF-1 atorga un fenotip més agressiu a les cèl·lules i les fa més resistents tant a quimioteràpia com a radioteràpia (Generalì et al. 2006). Els mecanismes potencials pels quals l'HIF-1 afavoreix la resistència a la quimioteràpia inclouen l'alteració de l'apoptosi (Erler et al. 2004), la sobreexpressió del *multidrug resistance transporter P-glycoprotein* (Wartenberg et al. 2003), i una baixada en la distribució dels fàrmacs degut a deficiències en els vasos sanguinis (Generalì et al. 2006). Per tant, el MTX podria estar induint UGT1A6 a través d'HIF-1, causant un fenotip més resistent al MTX. Un altre possibilitat és que el MTX, en comptes de regular directament AhR o ARNT, ho fes a través de reguladors d'aquests, com dels inhibidors d'ARNT, *heterodímer partner* (SHP) i SMRT, o a través de l'activació d'ARNT a partir de coactivadors com CBP i ERAP140. S'ha observat que SHP és capaç d'inhibir l'activació de UGT1A6 per TCDD en cèl·lules RL95-2 (Klinge et al. 2001).

La inducció de UGT1A6 pel MTX pot tenir conseqüències farmacològiques i fisiològiques molt importants, ja que aquesta inducció disminuiria la biodisponibilitat de molts compostos provinents de la dieta i de fàrmacs susceptibles de glucuronidació, com el tamoxifè i l'irinotecà, que serien menys actius en combinació amb el MTX, tal com mostren els nostres resultats. S'ha descrit que les UGT1As estarien implicades en el mecanisme de resistència d'alguns fàrmacs degut a la seva glucuronidació, com és el

cas de la daunorubicina (Gessner et al. 1990) i l'àcid micofenòlic (Franklin et al. 1996). Aquest tipus de resistència creuada suposa un problema pel tractament del càncer, ja que la teràpia combinada és habitual justament per prevenir resistències, com és el cas de l'administració de MTX i tamoxifè pel tractament de càncer de mama. A més, el MTX en combinació amb qualsevol altre fàrmac com el paracetamol, faria disminuir la seva biodisponibilitat i efecte terapèutic.

En resum, UGT1A6 es troba sobreexpressada en cèl·lules de càncer de mama resistents al MTX degut a un augment en la seva transcripció, dirigit per AhR/ARNT i ARNT. La repercussió farmacològica de la inducció de UGT1A6 pel MTX ha de ser tinguda en compte quan s'administri aquest en combinació amb altres fàrmacs glucuronidables.

5.2 - Template-PPRHs

La regulació de l'expressió gènica és un dels objectius més ambiciosos de la teràpia gènica. El control de l'expressió de gens involucrats en processos patològics obre el camp a un nou tipus de tractaments basats en gens en comptes de proteïnes, com fa la farmacologia clàssica. La regulació de l'expressió gènica podria inclús significar el guariment complet d'una malaltia si aquesta regulació gènica es fés d'una manera estable i controlada.

Dins de les diferents possibilitats que presenta la teràpia gènica es troben els oligonucleòtids. En aquest treball hem desenvolupat els PPRHs, molècules de DNA amb dos dominis homopurina, units entre ells per un pont de timidines i que formen una estructura de pinça degut a la formació d'enllaços intramoleculars de tipus Hoogsteen. Aquestes molècules s'uniran per enllaços Watson-Crick a seqüències dianes de polipirimidines, formant tríplexs. Es van dissenyar els Template-PPRHs destinats a unir-se a la cadena motlle del DNA.

Es va utilitzar el gen *dhfr* com a model, i es va trobar una seqüència polipirimidina localitzada a l'intró 3. No és d'estranyar que es trobés en un intró, ja que s'ha observat que les seqüències polipirimidines no es troben homogèniament repartides pel genoma, sinó que es localitzen principalment als promotors, introns i amb menys freqüència als exons. A més, la quantitat de seqüències polipirimidíniques que es troben al genoma són més nombroses de les que caldria esperar per disposició aleatòria dels nucleòtids (Goñi et al. 2004). Pràcticament, tots els gens contenen aquest tipus de seqüències, cosa que fa que la trobada de regions pirimidines, que *a priori* podria semblar un desavantatge en la utilització de PPRHs, sigui bastant probable. S'ha proposat que aquesta abundància de regions polipirimidíniques és deguda a una funció reguladora en l'expressió dels gens, ja sigui per unió de proteïnes a aquestes seqüències, o facilitant la unió de proteïnes a regions annexes (Goñi et al. 2006). Així mateix, s'ha observat que els gens que tenen més regions *TFO target sequence* (TTS) al seu promotor estan relacionats amb importants processos biològics.

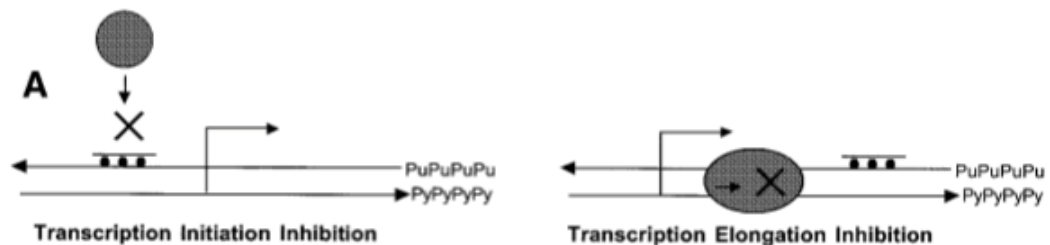
Els Template-PPRHs són capaços d'unir-se a la seva seqüència polipirimidínica diana de dsDNA tal com van mostrar els assajos de retardació de la mobilitat electroforètica. Aquesta capacitat dels hairpins de polipurines ja havia estat observada anteriorment. Els

hairpins eren capaços d'unir-se a la seva seqüència diana de dsDNA amb molta afinitat, produint l'obertura de la doble cadena de DNA i el desplaçament d'una de les hebres (Coma et al. 2005). Aquesta unió era específica de seqüència, i es donava en condicions fisiològiques de pH, temperatura i concentració de cations encara que la seqüència diana es trobés en mig de fragments llargs. Els assajos de retardació de la mobilitat electroforètica reflexen que HpdI3-B és capaç d'unir-se a la seva seqüència diana, però també ho és HpdI3-NH, degut a que aquest PPRH encara que no pugui formar enllaços intramoleculars Hoogsteen, té la seqüència d'unió per enllaços Watson-Crick a la diana.

Es va trobar que HpdI3-B era el PPRH més actiu causant citotoxicitat, inclús a una concentració de 100 nM. El PPRH amb una regió ampliada de la cadena que forma enllaços Watson-Crick amb la diana, HpdI3-T, era menys actiu. Això pot ser explicat pel fet de que la presència d'enllaços Hoogsteen estabilitza la formació dels enllaços Watson-Crick amb la seqüència diana (Aviñó et al. 2003). Així mateix, HpdI3-BT, que tenia els dos fragments llargs (32 nt) i per tant teòricament era més específic, també era menys actiu. Es va trobar que HpdI3-NH, també era actiu i produïa citotoxicitat, però en un menor grau que HpdI3-B. HpdI3-NH, que s'uneix a la seva seqüència diana com un aODN amb una cua, ens va permetre veure la importància dels enllaços Hoogsteen en l'activitat dels PPRHs. Per tant, la formació d'un tríplex d'un PPRH amb una cadena diana de dsDNA és més estable que la d'un oligonucleòtid per enllaços Watson-Crick (Coma et al. 2005).

Encara que hi hagi una certa abundància de seqüències polipirimidines en el genoma, a vegades pot ser difícil trobar seqüències homopirimidines pures, per tant es van estudiar com influeixen les interrupcions de purines. Es van dissenyar PPRHs que contenien diferents bases en front d'una interrupció de purines en la cadena diana de polipirimidines, i es va veure que a nivell d'unió *in vitro*, i d'activitat citotòxica, aquell PPRH que aconseguia una major activitat, era aquell que tenia una adenina en front de la interrupció de purines. Aquests resultats concordaven amb estudis anteriors del nostre grup, en els que mitjançant estudis termodinàmics, es va observar que en front d'una interrupció d'una guanina, l'adenina al hairpin era la que aconseguia una major estabilitat en la formació del tríplex (Coma et al. 2005).

Es va analitzar el mecanisme d'acció pel qual els PPRHs dirigits contra el gen *dhfr* causaven citotoxicitat. Es va procedir a l'estudi dels nivells de mRNA de la DHFR, i es va observar la seva disminució. Aquesta disminució anava seguida de la corresponent baixada en els nivells de proteïna i d'activitat enzimàtica de la DHFR, cosa que explicava la citotoxicitat observada. Per tant, el mecanisme d'acció dels Template-PPRHs consistia en la seva unió a la cadena motlle del DNA, i l'inhibició de la transcripció. D'aquesta forma, els PPRHs comparteixen amb els TFOs el mateix mecanisme d'acció. Encara que la inhibició més efectiva és aquella contra seqüències dianes localitzades al promotor (Goñi et al. 2004) ja que inhibeixen l'inici de la transcripció, també hi ha inhibició per bloqueig de l'elongació del mRNA com seria el cas quan la seqüència és intrònica (Young et al. 1991; Faria et al. 2000).



(Knauert and Glazer 2001)

Un aspecte molt important en utilitzar oligonucleòtids és l'especificitat per la seva diana. Per aquesta raó en dissenyar els PPRHs es van fer anàlisis de BLAST, i es va analitzar la capacitat dels PPRHs per disminuir els nivells de mRNA de gens no relacionats, no observant-se variacions. A més, per assegurar l'especificitat es va utilitzar un control negatiu amb una seqüència aleatòria, HpdI3-Sc, que no presentava activitat, així com HpdI3-WC. Aquest darrer PPRH és un hairpin que en comptes de tenir enllaços intramoleculars tipus Hoogsteen té enllaços Watson-Crick, i per tant té una estructura de pinça tancada que no pot unir-se a cap seqüència diana. Així mateix, HpdI3-WC serveix de control de la resposta cel·lular davant la transfecció d'una estructura tipus PPRH. A diferència d'altres molècules com els siRNAs, el fet de transfectar un PPRH de 20-30 nt no produeix cap efecte citotòxic, degut a la seva composició de dsDNA (Sledz et al. 2003; Reynolds et al. 2006).

Es va analitzar la validesa terapèutica dels PPRHs dirigits contra el gen *dhfr*, transfectant-los en cèl·lules de càncer de mama MCF7 resistents al MTX. Aquestes cèl·lules, que creixien sense problemes en presència d'una concentració de 10^{-6} M de MTX, i que tenen el gen *dhfr* amplificat i sobreexpressat, en ser transfectades amb els PPRHs presentaven mort cel·lular. Aquesta citotoxicitat anava precedida d'una disminució en les nivells de mRNA i proteïna DHFR.

Així mateix, es va estudiar la funcionalitat dels PPRHs contra altres gens que tinguessin regions de polipirimidines, com la *survivina* i *telomerasa*. En ambdós casos, es va observar una notable citotoxicitat acompanyada d'una disminució en les nivells de mRNA dels gens corresponents. En el cas de la *telomerasa*, el PPRH dissenyat salvava 3 interrupcions de purines a la seqüència diana, amb tres adenines en el PPRH. Aquest PPRH era totalment funcional, corroborant la utilització d'adenines en front d'interrupcions de purines. Pel gen de la *surivina* es van dissenyar dos PPRHs, un dirigit contra el promotor, i un altre contra un exó. El PPRH contra l'exó pràcticament no era actiu, mentre que el dirigit contra el promotor presentava una gran activitat. Aquest fet reforça la idea del paper regulador de les seqüències de polipirimidines.

Els PPRHs presenten una sèrie d'avantatges en front a altres molècules similars:

- Són actius a concentracions de 100 nM (similars a les concentracions utilitzades per siRNAs)
- Són molt actius produint citotoxicitat final, més que els oligonucleòtids antisentit (HATNL-24), siRNAs (siRNA-DHFR) i PPRHs sense enllaços Hoogsteen intramoleculares (HpdI3-NH)
- Tenen major estabilitat, d'uns 5 dies de vida mitja, en front dels 2 dies dels aODNs modificats
- Són molt fàcils de sintetitzar, econòmics i molt estables i sense requeriments especials de manipulació degut a que són una cadena de ssDNA no modificada.

En resum, els PPRHs són molècules que inhibeixen la transcripció, i quan estan dirigits contra gens essencials, poden tenir implicacions terapèutiques. Els Template-PPRHs representen un nou tipus de molècules a tenir en compte per disminuir l'expressió gènica.

5.3 - Coding-PPRHs

La capacitat de modular selectivament l'expressió gènica, especialment de gens implicats en malalties, és l'objectiu de la teràpia gènica, així com de la biologia molecular per tal d'obtenir eines per l'estudi de les funcions dels gens.

Anteriorment s'han descrit els Template-PPRHs, molècules antígen que disminueixen l'expressió gènica (de Almagro et al. 2009). Així mateix, s'han desenvolupat els Coding-PPRHs, molècules destinades a unir-se al mRNA i inhibir l'expressió gènica. El mRNA com a diana va agafant força davant de teràpies més clàssiques basades en les proteïnes, en part gràcies a l'aparició de noves molècules capaces d'inhibir la traducció o degradar el mRNA com els microRNAs, siRNAs i aODNS (Wood et al. 2007; Madsen et al. 2008). Els aODNs també s'han aplicat contra pre-mRNAs en cultius cel·lulars, per tal d'alterar estèricament el processament de l'RNA (Bruno et al. 2004; Du et al. 2007).

Els Template-PPRHs van ser dissenyats per unir-se a la cadena motlle del DNA i inhibir la transcripció. En el cas dels Coding-PPRHs, han estat dirigits contra el mRNA i per tant, com totes les molècules destinades a unir-se al mRNA, també aniran dirigides contra la cadena codificant del DNA, a l'igual que aODNs i siRNAs. En els assajos d'unió *in vitro*, es pot observar com HpdI3-A-TA és capaç d'unir-se a la seva seqüència diana tant de RNA, com de ssDNA, però també en certa mesura al dsDNA. Els estudis dels nivells de mRNA, en que primer s'observa un augment dels nivells de pre-mRNA seguit d'una disminució de l'mRNA madur, indiquen que el mecanisme d'acció predominant és per unió al pre-mRNA i alteració del procés d'empalmament, però no es pot descartar que els Coding-PPRHs s'uneixin en cert grau a la cadena codificant del DNA.

HpdI3-A-TA dirigit contra el gen *dhfr* era molt actiu produint citotoxicitat en cèl·lules de càncer de mama, a una concentració de 100 nM produïa un 90% de mort cel·lular, molt semblant a la produïda pel Template HpdI3-B (PPRH contra la cadena motlle del DNA), i major que la causada per HpdI3-A-NH (aODN amb una cua) i per l'aODN HATNL-24. Així mateix, a les 3-6 hores ja començava a ser efectiu.

HpdI3-A-TA en ser incubat en cèl·lules produïa una disminució en l'activitat enzimàtica DHFR, els nivells de proteïna, però sorprenentment, els nivells de mRNA només experimentaven una lleugera baixada, a diferència dels Template-PPRHs, que causant la mateixa citotoxicitat produïen una major disminució. Com que el mètode d'anàlisi dels nivells de mRNA amb la sonda Taqman es basava en la detecció de l'exó-1, i HpdI3-A-TA estava dirigit contra una seqüència polipirimidínica localitzada a l'intró 3, es va procedir a l'estudi dels nivells de pre-mRNA. Sorprenentment, quan les cèl·lules eren incubades amb HpdI3-A-TA, es produïa un augment en els nivells de pre-mRNA d'un 200%, seguit d'una disminució en els nivells de mRNA madur després de l'empalmament similars a les observades amb els Template-PPRHs. Aquest fet indicava que els Coding-PPRHs podien estar interferint en el procés d'empalmament. El lleuger decrement en els nivells de mRNA de la DHFR observats en primera instància amb la sonda Taqman poden ser deguts a la mesura d'un conjunt de pre-mRNAs i mRNAs madurs presents en aquell moment a la cèl·lula. Això és degut a que la mesura de l'exó-1 correspondria a la mitjana de les abundàncies relatives de cada espècie, i com que el mRNA madur es troba en més quantitat que el pre-mRNA, la baixada d'aquest tindria més pes en el còmput dels valors globals del mRNA i emmascararia la pujada del pre-mRNA (l'abundància relativa de pre-mRNA era 3,8% i 96,2% pel mRNA madur).

Degut a l'alteració en l'empalmament deguda als Coding-PPRHs, es va procedir a l'estudi del seu mecanisme d'acció a través de reaccions d'empalmament *in vitro*. Quan una sonda que contenia a l'intró la seqüència diana de HpdI3-A-TA era incubada amb aquest PPRH, es produïa una disminució en els nivells de mRNA madur, indicant un bloqueig dels PPRHs en el processament del pre-mRNA.

És coneguda la importància de les seqüències polipirimidíniques als introns i al procés d'empalmament. Les regions de 15-30 polipirimidines apareixen al genoma amb més freqüència de la que caldria esperar per la simple probabilitat de la combinació de les quatre bases, trobant-se principalment al promotor, intró i amb menys freqüència als exons, suggerint un paper regulador; a més aquest fenomen es troba conservat, des de llevats fins a humans (Bucher et al. 1991; Behe 1995). Entre les seqüències polipirimidíniques es troba el *polypyrimidin tract*, un dels principals elements en *cis* que regulen l'eliminació dels introns en l'empalmament del pre-mRNA. Però el *polypyrimidin tract* no és l'única seqüència de polipirimidines que té un paper en

l'empalmament. S'ha vist que successives delecions a partir de l'extrem 3' del *polypyrimidin tract*, així com mutacions, impedièn la formació de l'espliceosoma i per tant de l'empalmament (Maschhoff et al. 1992; Coolidge et al. 1997). Encara que aquesta seqüència sigui tan crucial per l'empalmament, presenta flexibilitat de seqüència, i inclús permet la presència de purines (Coolidge et al. 1997).

Entre els diferents factors implicats en l'empalmament, es troba *U2 Auxiliary Factor* (U2AF) (Zamore et al. 1992). Aquesta proteïna s'uneix a seqüències de polipirimidines presents als introns, concretament al *polypyrimidin tract*. En unir-se, recluta la resta de maquinària de l'empalmament que permet l'eliminació de l'intró, però a la seva vegada, la unió de U2AF al *polypyrimidin tract* té un paper regulador, ja que competeix amb altres proteïnes per la unió al mateix *locus*, com són *sex-lethal protein* i PTB (*Polypyrimidine Tract Binding protein*) (Valcarcel et al. 1993; Lin et al. 1995; Singh et al. 1995). U2AF reconeix seqüències consensu 3'-*splice sites*, i s'uneix i recluta la resta de factors que permetran l'empalmament. Aquestes seqüències consensu en mamífers tenen una gran flexibilitat de seqüència, longitud, inclús permeten la presència de purines (Senapathy et al. 1990; Sickmier et al. 2006). U2AF està format per dos subunitats, U2AF65 l'encarregada d'unir-se al mRNA i U2AF35, que s'uneix als altres factors d'empalmament. Ja que la unió d'U2AF65 al pre-mRNA l'encarrila cap a l'empalmament d'aquell intró, la interacció entre aquests dos elements és un factor clau en la regulació de l'empalmament i pot ser utilitzada per alterar-lo. Els Coding-PPRHs podrien estar actuant a aquest nivell, tal com indiquen els assajos de gel-shift. HpdI3-A-TA s'uniria a la seqüència de polipirimidines, evitant la unió de U2AF65, i per tant la formació de l'espliceosoma. Els Coding-PPRHs serien competidors de U2AF en comptes de PTB, ja que la unió de PTB a regions de polipirimidines causa empalmament alternatiu d'aquell intró (Cote et al. 2001; Stern et al. 2009), i en el nostre estudi no hem observat variacions en el patró d'empalmament.

S'han descrit aproximacions utilitzant oligonucleòtids dirigits contra molècules reguladores de l'empalmament per tal d'evitar la traducció de gens. S'han utilitzat aODNs per modificar el patró d'empalmament, fent que s'incloguin o eliminin exons per tal de restablir la correcta seqüència, com és el cas d'aODNs per guarir la distròfia muscular de Duchenne (Aartsma-Rus et al. 2007; Marshall et al. 2007). També s'han estudiat RNAs com molècules antisense, en aquest sentit a cèl·lules HeLa o K562, que

expressen de forma estable gens de β -globina truncada, incubades amb U1 i U7 *small nuclear* RNAs modificats per tal de contenir seqüències antisense complementàries als llocs d'empalmament aberrants, s'aconseguia una correcta expressió i patró d'empalmament de la β -globina (Vacek et al. 2003).

Un dels principals problemes de totes les molècules que tenen com diana d'unió els àcids nucleics és l'especificitat. Per aquesta raó, es van realitzar anàlisis de BLAST, emprar controls negatius, determinar nivells de mRNA de gens no relacionats, i estudiar les línies cel·lulars DCHIM1 i DCHIM1-Hp. Aquestes dues línies cel·lulars van confirmar l'especificitat dels nostres Coding-PPRHs, ja que HpdI3-A-TA només causava citotoxicitat a la línia cel·lular de hamster que contenia el corresponent minigen *dhfr* amb la seqüència diana del PPRH inserida.

L'aplicació terapèutica dels Coding-PPRHs va ser analitzada en cèl·lules de càncer de mama MCF7 resistents al metotrexat. Aquestes cèl·lules que creixen a una concentració de 10^{-6} M de metotrexat, presentaven una notable mort cel·lular quan eren incubades amb els Coding-PPRHs. Per tant, aquests PPRHs podrien ser utilitzats com a eines terapèutiques per la sensibilització de cèl·lules tumorals resistents als quimioteràpics.

Els Coding-PPRHs amplien el ventall d'utilització dels PPRHs, ja que els Template-PPRHs es limitaven a l'existència de regions polipirimidina a la cadena motlle del DNA, mentre que ara els Coding-PPRHs permeten utilitzar aquesta tecnologia quan la seqüència diana es troba en la cadena codificant. A més, els Coding-PPRHs presenten el mateix poder citotòxic que els Template-PPRHs, així com també gaudeixen de tots els avantatges: actius a concentracions de 100 nM, gran estabilitat de aproximadament 5 dies, facilitat de manipulació ja que són oligonucleòtids de DNA, i facilitat de síntesi i economia. Totes aquestes característiques els fan uns bons candidats com a alternativa a l'ús de molècules més convencionals com els aODNs i siRNAs.

Els Coding-PPRHs són un nou tipus de molècula per disminuir l'expressió gènica de forma específica a nivell de pre-mRNA. Per tant, quan van dirigits contra gens amb importància en malalties, podrien ser utilitzats com a eines terapèutiques.

5.4 – Activació de la resposta immunitària i gens amb importància terapèutica com a diana

Un dels principals problemes que presenten els RNAs d'interferència és l'activació de la resposta immune. Aquest fet suposa un gran inconvenient per a la seva utilització degut a la citotoxicitat cel·lular resultant. L'activació de la resposta immune està sota control si els siRNAs són d'uns 19 nt, però això a la vegada comporta un problema d'especificitat, ja que oligonucleòtids més llargs evitarien l'altre gran problema dels siRNAs, l'inespecificitat.

Els PPRHs són molècules de dsDNA, i no presenten activació del sistema immune per dsRNA, cosa que els permet tenir una major llargada, i així assegurar l'especificitat sense comprometre la viabilitat cel·lular. Els PPRHs no eren capaços d'activar un dels gens responsables de l'activació de la resposta immune dels siRNAs (OAS). Tampoc activaven un gen responsable de la detecció de DNA exogen (DAI), ni marcadors generals d'activació de la resposta immune com són l'IFN α i l'IFN β . Per tant, la citotoxicitat observada amb els PPRHs no era causada per l'activació del sistema immune davant la seva transfecció, com corroboren estudis anteriors amb PPRHs control negatiu tipus Hp-WC, que donen informació de la resposta cel·lular davant d'un PPRH (de Almagro et al. 2009).

L'eficàcia dels Template-PPRHs contra la DHFR ens va portar a dissenyar PPRHs contra altres gens que poguessin ser eines terapèutiques. Així, PPRHs contra *c-myc*, *topoisomerasa*, *bcl-2* i *mdm2* presentaven un notable poder citotòxic en diverses línies cel·lulars de càncer de mama, i aquesta activitat era dependent de la baixada en els nivells de mRNA dels gens corresponents. Aquesta eficàcia indica la generalitat del mecanisme d'acció dels PPRHs. Aquesta generalitat, juntament amb l'alta probabilitat de trobar seqüències de polipirimidines, fa que els PPRHs puguin ser utilitzats per disminuir l'expressió de tot tipus de gens, i els PPRHs poden ser utilitzats amb fins terapèutics si aquesta disminució afecta a gens que en ser inhibits causin apoptosi.

Aquests nous PPRHs també ens van permetre estudiar altres característiques dels hairpins, com són la possibilitat de transfectar PPRHs de 34 nt de seqüència de

polipurines sense problemes. Aquest fet fa guanyar una gran especificitat al PPRH, ja que una seqüència de 21 polipirimidines té un 10% de probabilitats de trobar-se un altre vegada en regions gèniques en el genoma, i un 50% d'estar en qualsevol zona genòmica, mentre que 24 o més polipirimidines són totalment específiques (Goñi et al. 2004).

L'estratègia d'inhibir gens amb importància terapèutica ja s'havia utilitzat anteriorment per tal de trobar nous tractaments alternatius a la farmacologia química clàssica. En el cas de la *telomerasa*, s'han utilitzat molècules estabilitzadores dels enllaços Hoogsteen que realitzen les guanines formant G-quàdruplexs en els telòmers dels gens, de forma que la telomerasa no s'hi pot unir, i no pot allargar els telòmers en cèl·lules tumorals, evitant així la immortalitat d'aquestes cèl·lules (Pagano et al. 2007). També s'han utilitzat aODNs totalment modificats amb enllaços fosfotioat contra *c-myc*, que aconsegueixen disminuir un 60% l'expressió d'aquest gen en ratolins (Forte et al. 2005). Les possibilitats dels àcids nucleics com a fàrmacs queden paleses en l'aprovació d'un aODN per tractar la retinitis induïda per CMV (Vitravene), així com el fet que hi hagin aODNs per tractar càncer i malalties inflamatòries en assajos clínics en fase II i III (Marwick 1998; Kurreck 2003).

CONCLUSIONS

- La resistència al MTX en cèl·lules de càncer de mama causa la sobreexpressió de UGT1A6. Aquesta sobreexpressió contraresta la citotoxicitat produïda pel MTX en cèl·lules sensibles. Aquests fets estan en consonància amb el fet que la inhibició de tota la família UGT1A sensibilitzi les cèl·lules al MTX
- El MTX indueix l'expressió de UGT1A6 i la seva activitat enzimàtica. Aquesta inducció està mitjançada per AhR/ARNT i ARNT a través dels llocs d'unió XRE i HIF-1 al promotor de UGT1A6
- El MTX administrat en combinació amb fàrmacs glucuronidables, com el tamoxifè o l'irinotecà, redueix el poder citotòxic dels darrers. Per tant, la inducció de UGT1A6 pel MTX pot tenir repercussions farmacològiques molt importants, ja que el MTX és un quimioteràpic que es combina amb altres fàrmacs com el tamoxifè, pel tractament del càncer de mama
- Els hairpins de polipurines (PPRHs) poden ser utilitzats per disminuir l'expressió gènica de gairebé tots els gens de mamífer, ja que és molt probable trobar-hi seqüències polipirimidíniques pures en regions no codificants. Les interrupcions de purines (1-3) en la seqüència diana de polipirimidines es poden resoldre amb adenines al PPRH
- Els PPRHs s'uneixen específicament a la seva seqüència diana, com es demostra amb els controls negatius (Hp-WC i Hp-Sc), l'anàlisi de BLAST, l'estudi dels nivells de mRNA de gens no relacionats, i les línies cel·lulars DCHM1 i DCHM1-Hp
- Respecte el mecanisme d'acció dels PPRHs, en el cas dels Template-PPRHs, aquests actuen a nivell de DNA, impeding la correcta transcripció del mRNA, mentre que els Coding-PPRHs actuen a nivell de pre-mRNA, impeding el seu correcte empalmament
- Els PPRHs dirigits contra altres gens implicats en el creixement cel·lular i proliferació, fan disminuir la viabilitat cel·lular, amb el corresponent interès terapèutic que això implica. A més, els PPRHs no activen la resposta immune cel·lular

- Els PPRHs són un nou tipus de molècules per disminuir l'expressió gènica, que operen amb alta sensibilitat, tenen una gran estabilitat i d'obtenció força econòmica, propietats que els poden fer una alternativa als siRNAs

ANNEX

Al llarg de la meua tesi doctoral, he col·laborat en el treball experimental de 2 altres articles científics, que s'indiquen a continuació

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

La meua contribució va consistir en la generació de les línies de càncer de mama resistents al MTX i els corresponents experiments de microarrays i la seva anàlisi, així com els estudis de les UGT1As.

Overexpression of S100A4 in human cancer cell lines resistant to methotrexate

La meua contribució va consistir en la generació de les línies de càncer de mama resistents al MTX, l'estudi de l'especificitat del siRNA contra S100A4, les determinacions per Westerns de S100A4, l'activitat del siRNA contra S100A4 en altres línies cel·lulars (SaOsII i MDA-MB-R), i validació dels nivells de mRNA d'HOMER1 i DHFR en cèl·lules de càncer de mama.

BIBLIOGRAFIA

A

- Aartsma-Rus, A. and G. J. van Ommen (2007). "Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications." Rna **13**(10): 1609-24.
- Alemaný, C., V. Noe and C. J. Ciudad (2000). "Identification by RNA-based arbitrarily primed PCR of the involvement of cytochrome c oxidase in the development of resistance to methotrexate." Biochim Biophys Acta **1495**(3): 319-26.
- Aliño, S. F., M. Jose Herrero, V. Bodi, et al. (2010). "Naked DNA delivery to whole pig cardiac tissue by coronary sinus retrograde injection employing non-invasive catheterization." J Gene Med.
- Ambrosini, G., C. Adida, G. Sirugo, et al. (1998). "Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting." J Biol Chem **273**(18): 11177-82.
- Antonsson, B., F. Conti, A. Ciavatta, et al. (1997). "Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2." Science **277**(5324): 370-2.
- Auyeung, D. J., F. K. Kessler and J. K. Ritter (2001). "An alternative promoter contributes to tissue- and inducer-specific expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6 gene." Toxicol Appl Pharmacol **174**(1): 60-8.
- Aviño, A., E. Cubero, C. González, et al. (2003). "Antiparallel triple helices. Structural characteristics and stabilization by 8-amino derivatives." J Am Chem Soc **125**(51): 16127-38.
- Aviño, A., M. Frieden, J. C. Morales, et al. (2002). "Properties of triple helices formed by parallel-stranded hairpins containing 8-aminopurines." Nucleic Acids Res **30**(12): 2609-19.
- Aviño, A., J. C. Morales, M. Frieden, et al. (2001). "Parallel-stranded hairpins containing 8-aminopurines. Novel efficient probes for triple-helix formation." Bioorg Med Chem Lett **11**(13): 1761-3.

B

- Banerjee, D., E. Ercikan-Abali, M. Waltham, et al. (1995). "Molecular mechanisms of resistance to antifolates, a review." Acta Biochim Pol **42**(4): 457-64.
- Barbier, O., L. Villeneuve, V. Bocher, et al. (2003). "The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma target gene." J Biol Chem **278**(16): 13975-83.
- Behe, M. J. (1995). "An overabundance of long oligopurine tracts occurs in the genome of simple and complex eukaryotes." Nucleic Acids Res **23**(4): 689-95.

- Belanger, A., D. W. Hum, M. Beaulieu, et al. (1998). "Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues." *J Steroid Biochem Mol Biol* **65**(1-6): 301-10.
- Beral, V. (2003). "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study." *Lancet* **362**(9382): 419-27.
- Bertino, J. R., E. Goker, R. Gorlick, et al. (1996). "Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors." *Oncologist* **1**(4): 223-226.
- Bissel, D. (1986). *Heme catabolism and bilirubin formation*. New York, Dekker.
- Bock, K. W. (1991). "Roles of UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26**(2): 129-50.
- Bock, K. W. and B. S. Bock-Hennig (2009). "UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): from purification of Ah-receptor-inducible UGT1A6 to coordinate regulation of subsets of CYPs, UGTs, and ABC transporters by nuclear receptors." *Drug Metab Rev*.
- Bock, K. W. and C. Kohle (2005). "UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects." *Methods Enzymol* **400**: 57-75.
- Bock, K. W., J. Wiltfang, R. Blume, et al. (1987). "Paracetamol as a test drug to determine glucuronide formation in man. Effects of inducers and of smoking." *Eur J Clin Pharmacol* **31**(6): 677-83.
- Bruno, I. G., W. Jin and G. J. Cote (2004). "Correction of aberrant FGFR1 alternative RNA splicing through targeting of intronic regulatory elements." *Hum Mol Genet* **13**(20): 2409-20.
- Bucher, P. and G. Yagil (1991). "Occurrence of oligopurine.oligopyrimidine tracts in eukaryotic and prokaryotic genes." *DNA Seq* **1**(3): 157-72.
- Buckley, D. B. and C. D. Klaassen (2007). "Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice." *Drug Metab Dispos* **35**(1): 121-7.
- Buckley, D. B. and C. D. Klaassen (2009). "Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2." *Drug Metab Dispos* **37**(4): 847-56.

C

- Carver, L. A., J. J. LaPres, S. Jain, et al. (1998). "Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9." *J Biol Chem* **273**(50): 33580-7.
- Clemens, M. J. and B. R. Williams (1978). "Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts." *Cell* **13**(3): 565-72.

- Coma, S., V. Noe, R. Eritja, et al. (2005). "Strand displacement of double-stranded DNA by triplex-forming antiparallel purine-hairpins." Oligonucleotides **15**(4): 269-83.
- Coolidge, C. J., R. J. Seely and J. G. Patton (1997). "Functional analysis of the polypyrimidine tract in pre-mRNA splicing." Nucleic Acids Res **25**(4): 888-96.
- Cote, J., S. Dupuis and J. Y. Wu (2001). "Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion." J Biol Chem **276**(11): 8535-43.
- Court, M. H. (2001). "Acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase in ferrets: species and gender differences, and sequence analysis of ferret UGT1A6." J Vet Pharmacol Ther **24**(6): 415-22.
- Cubero, E., A. Aviãno, B. G. de la Torre, et al. (2002). "Hoogsteen-based parallel-stranded duplexes of DNA. Effect of 8-amino-purine derivatives." J Am Chem Soc **124**(12): 3133-42.

D

- Dang, C. V., L. M. Resar, E. Emison, et al. (1999). "Function of the c-Myc oncogenic transcription factor." Exp Cell Res **253**(1): 63-77.
- de Almagro, M. C., S. Coma, V. Noe, et al. (2009). "Polypurine hairpins directed against the template strand of DNA knock down the expression of mammalian genes." J Biol Chem **284**(17): 11579-89.
- Dervieux, T., D. Furst, D. O. Lein, et al. (2004). "Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **50**(9): 2766-74.
- Du, L., J. M. Pollard and R. A. Gatti (2007). "Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 6007-12.
- Dutton, G. (1980). "Glucuronidation of Drugs and Other Compounds." CRC Press, Boca Raton, FL.: 3-78.

E

- Emi, Y., S. Ikushiro and T. Iyanagi (1995). "Drug-responsive and tissue-specific alternative expression of multiple first exons in rat UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) gene complex." J Biochem **117**(2): 392-9.

- Emi, Y., S. Ikushiro and T. Iyanagi (1996). "Xenobiotic responsive element-mediated transcriptional activation in the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex." J Biol Chem **271**(7): 3952-8.
- Emine Abalia, N. E. S., Hilal Celikkayaa and Yi-Ching Hsieha (2008). "Regulation of Human Dihydrofolate Reductase Activity and Expression." Vitamins & Hormones **79**: 267-292.
- Erler, J. T., C. J. Cawthorne, K. J. Williams, et al. (2004). "Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance." Mol Cell Biol **24**(7): 2875-89.
- Ethell, B. T., G. D. Anderson and B. Burchell (2003). "The effect of valproic acid on drug and steroid glucuronidation by expressed human UDP-glucuronosyltransferases." Biochem Pharmacol **65**(9): 1441-9.

F

- Faria, M., C. D. Wood, L. Perrouault, et al. (2000). "Targeted inhibition of transcription elongation in cells mediated by triplex-forming oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 3862-7.
- Faucon, B., J. L. Mergny and C. Helene (1996). "Effect of third strand composition on the triple helix formation: purine versus pyrimidine oligodeoxynucleotides." Nucleic Acids Res **24**(16): 3181-8.
- Flórez, J. and J. A. Armijo (1992). Quimioterapia antineoplásica I. Bases fundamentales. Antimetabolitos. Baecelona, Masson Salvat Medicina.
- Forte, A., U. Galderisi, M. De Feo, et al. (2005). "c-Myc antisense oligonucleotides preserve smooth muscle differentiation and reduce negative remodelling following rat carotid arteriotomy." J Vasc Res **42**(3): 214-25.
- Franklin, T. J., V. Jacobs, G. Jones, et al. (1996). "Glucuronidation associated with intrinsic resistance to mycophenolic acid in human colorectal carcinoma cells." Cancer Res **56**(5): 984-7.

G

- Generali, D., A. Berruti, M. P. Brizzi, et al. (2006). "Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer." Clin Cancer Res **12**(15): 4562-8.
- Gessner, T., L. A. Vaughan, B. C. Beehler, et al. (1990). "Elevated pentose cycle and glucuronyltransferase in daunorubicin-resistant P388 cells." Cancer Res **50**(13): 3921-7.

- Giovannangeli, C., T. Montenay-Garestier, M. Rougee, et al. (1991). "Single-stranded DNA as a target for triple-helix formation." Journal of the American Chemical Society **113**, nº20: 7775-7777.
- Gong, Q. H., J. W. Cho, T. Huang, et al. (2001). "Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus." Pharmacogenetics **11**(4): 357-68.
- Goñi, J. R., X. de la Cruz and M. Orozco (2004). "Triplex-forming oligonucleotide target sequences in the human genome." Nucleic Acids Res **32**(1): 354-60.
- Goñi, J. R., J. M. Vaquerizas, J. Dopazo, et al. (2006). "Exploring the reasons for the large density of triplex-forming oligonucleotide target sequences in the human regulatory regions." BMC Genomics **7**: 63.
- Gorlick, R., E. Goker, T. Trippett, et al. (1996). "Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia." N Engl J Med **335**(14): 1041-8.
- Grams, B., A. Harms, S. Braun, et al. (2000). "Distribution and inducibility by 3-methylcholanthrene of family 1 UDP-glucuronosyltransferases in the rat gastrointestinal tract." Arch Biochem Biophys **377**(2): 255-65.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." Cell **43**(2 Pt 1): 405-13.

H

- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hardwick, L. J., S. Velamakanni and H. W. van Veen (2007). "The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2)." Br J Pharmacol **151**(2): 163-74.
- Heurtaux, T., A. Benani, D. Moulin, et al. (2006). "Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes." Neuropharmacology **50**(3): 317-28.
- Hubner, R. A., K. R. Muir, J. F. Liu, et al. (2006). "Genetic variants of UGT1A6 influence risk of colorectal adenoma recurrence." Clin Cancer Res **12**(21): 6585-9.
- Husler, P. L. and H. H. Klump (1995). "Prediction of pH-dependent properties of DNA triple helices." Arch Biochem Biophys **317**(1): 46-56.

K

- Kandimalla, E. R., Agrawal, S., Venkataraman, S. and Sasisekharan, V. (1995). "Single strand targeted triplex formation: parallel-stranded DNA hairpin

- duplexes for targeting pyrimidine strands." *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 6416–6417.
- Kenworthy, R., D. Lambert, F. Yang, et al. (2009). "Short-hairpin RNAs delivered by lentiviral vector transduction trigger RIG-I-mediated IFN activation." *Nucleic Acids Res* **37**(19): 6587-99.
- Kessler, F. K. and J. K. Ritter (1997). "Induction of a rat liver benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol glucuronidating activity by oltipraz and beta-naphthoflavone." *Carcinogenesis* **18**(1): 107-14.
- Klinge, C. M., S. C. Jernigan, K. E. Risinger, et al. (2001). "Short heterodimer partner (SHP) orphan nuclear receptor inhibits the transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT)." *Arch Biochem Biophys* **390**(1): 64-70.
- Knauert, M. P. and P. M. Glazer (2001). "Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting." *Hum Mol Genet* **10**(20): 2243-51.
- Koster, D. A., A. Crut, S. Shuman, et al. (2010). "Cellular strategies for regulating DNA supercoiling: a single-molecule perspective." *Cell* **142**(4): 519-30.
- Kress, S. and W. F. Greenlee (1997). "Cell-specific regulation of human CYP1A1 and CYP1B1 genes." *Cancer Res* **57**(7): 1264-9.
- Krishnaswamy, S., S. X. Duan, L. L. Von Moltke, et al. (2003). "Validation of serotonin (5-hydroxytryptamine) as an in vitro substrate probe for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6." *Drug Metab Dispos* **31**(1): 133-9.
- Krishnaswamy, S., Q. Hao, A. Al-Rohaimi, et al. (2005). "UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 pharmacogenetics: I. Identification of polymorphisms in the 5'-regulatory and exon 1 regions, and association with human liver UGT1A6 gene expression and glucuronidation." *J Pharmacol Exp Ther* **313**(3): 1331-9.
- Krishnaswamy, S., Q. Hao, L. L. Von Moltke, et al. (2004). "Evaluation of 5-hydroxytryptophol and other endogenous serotonin (5-hydroxytryptamine) analogs as substrates for UDP-glucuronosyltransferase 1A6." *Drug Metab Dispos* **32**(8): 862-9.
- Kurreck, J. (2003). "Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications." *Eur J Biochem* **270**(8): 1628-44.

L

- Li, F. (2005). "Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis." *Br J Cancer* **92**(2): 212-6.
- Li, J., M. Shi, Y. Cao, et al. (2006). "Knockdown of hypoxia-inducible factor-1alpha in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth

- and increased sensitivity to methotrexate." Biochem Biophys Res Commun **342**(4): 1341-51.
- Lin, C. H. and J. G. Patton (1995). "Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors." Rna **1**(3): 234-45.
- Liu, X., V. H. Tam and M. Hu (2007). "Disposition of flavonoids via enteric recycling: determination of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms responsible for the metabolism of flavonoids in intact Caco-2 TC7 cells using siRNA." Mol Pharm **4**(6): 873-82.

M

- Ma, Y. P., Y. Yang, S. Zhang, et al. "Efficient inhibition of lung cancer in murine model by plasmid-encoding VEGF short hairpin RNA in combination with low-dose DDP." J Exp Clin Cancer Res **29**: 56.
- Madsen, E. C., P. A. Morcos, B. A. Mendelsohn, et al. (2008). "In vivo correction of a Menkes disease model using antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3909-14.
- Marshall, N. B., S. K. Oda, C. A. London, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." J Immunol Methods **325**(1-2): 114-26.
- Marwick, C. (1998). "First "antisense" drug will treat CMV retinitis." JAMA **280**(10): 871.
- Maschhoff, K. L. and R. A. Padgett (1992). "Phosphorothioate substitution identifies phosphate groups important for pre-mRNA splicing." Nucleic Acids Res **20**(8): 1949-57.
- Melchjorsen, J., H. Kristiansen, R. Christiansen, et al. (2009). "Differential Regulation of the OASL and OAS1 Genes in Response to Viral Infections." J Interferon Cytokine Res.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1993). "Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line." Blood **81**(1): 151-7.
- Morgan, A. R. and R. D. Wells (1968). "Specificity of the three-stranded complex formation between double-stranded DNA and single-stranded RNA containing repeating nucleotide sequences." J Mol Biol **37**(1): 63-80.
- Munzel, P. A., G. Bookjans, G. Mehner, et al. (1996). "Tissue-specific 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible expression of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6." Arch Biochem Biophys **335**(1): 205-10.
- Munzel, P. A., T. Lehmkoetter, M. Bruck, et al. (1998). "Aryl hydrocarbon receptor-inducible or constitutive expression of human UDP glucuronosyltransferase UGT1A6." Arch Biochem Biophys **350**(1): 72-8.

N

- Nadal, A., R. Eritja, T. Esteve, et al. (2005). "'Parallel' and 'antiparallel tail-clamps' increase the efficiency of triplex formation with structured DNA and RNA targets." *ChemBiochem* **6**(6): 1034-42.
- Nagar, S. and R. P. Remmel (2006). "Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer." *Oncogene* **25**(11): 1659-72.
- Nesbit, C. E., J. M. Tersak and E. V. Prochownik (1999). "MYC oncogenes and human neoplastic disease." *Oncogene* **18**(19): 3004-16.
- Noé, V., C. Chen, C. Alemany, et al. (1997). "Cell-growth regulation of the hamster dihydrofolate reductase gene promoter by transcription factor Sp1." *Eur J Biochem* **249**(1): 13-20.
- Noé, V. and C. J. Ciudad (1995). "Protein kinase C inhibitors reduce phorbol ester-induced resistance to methotrexate in Chinese hamster ovary cells." *Biochem Pharmacol* **50**(3): 337-46.
- Noé, V., C. J. Ciudad and L. A. Chasin (1999). "Effect of differential polyadenylation and cell growth phase on dihydrofolate reductase mRNA stability." *J Biol Chem* **274**(39): 27807-14.

O

- Olie, R. A., A. P. Simoes-Wust, B. Baumann, et al. (2000). "A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy." *Cancer Res* **60**(11): 2805-9.

P

- Pagano, B. and C. Giancola (2007). "Energetics of quadruplex-drug recognition in anticancer therapy." *Curr Cancer Drug Targets* **7**(6): 520-40.
- Pardal, R., M. F. Clarke and S. J. Morrison (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(12): 895-902.
- Perez-Garay, M., B. Arteta, L. Pages, et al. (2010). "alpha2,3-sialyltransferase ST3Gal III modulates pancreatic cancer cell motility and adhesion in vitro and enhances its metastatic potential in vivo." *PLoS One* **5**(9).
- Peyman, A., M. Helsberg, G. Kretzschmar, et al. (1995). "Inhibition of viral growth by antisense oligonucleotides directed against the IE110 and the UL30 mRNA of herpes simplex virus type-1." *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(3): 195-8.
- Philipp, T., M. Durazzo, C. Trautwein, et al. (1994). "Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D." *Lancet* **344**(8922): 578-81.

Praseuth, D., A. L. Guieysse and C. Helene (1999). "Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression." Biochim Biophys Acta **1489**(1): 181-206.

R

Reynolds, A., E. M. Anderson, A. Vermeulen, et al. (2006). "Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent." Rna **12**(6): 988-93.

Rivory, L. P., M. R. Bowles, J. Robert, et al. (1996). "Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase." Biochem Pharmacol **52**(7): 1103-11.

Rodriguez, M., S. Coma, V. Noe, et al. (2002). "Development and effects of immunoliposomes carrying an antisense oligonucleotide against DHFR RNA and directed toward human breast cancer cells overexpressing HER2." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **12**(5): 311-25.

S

Sah, N. K., Z. Khan, G. J. Khan, et al. (2006). "Structural, functional and therapeutic biology of survivin." Cancer Lett **244**(2): 164-71.

Sasso, S. P., R. M. Gilli, J. C. Sari, et al. (1994). "Thermodynamic study of dihydrofolate reductase inhibitor selectivity." Biochim Biophys Acta **1207**(1): 74-9.

Schmiegelow, K. (2009). "Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review." Br J Haematol **146**(5): 489-503.

Selga, E., C. Oleaga, S. Ramirez, et al. (2009). "Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate." Genome Med **1**(9): 83.

Senapathy, P., M. B. Shapiro and N. L. Harris (1990). "Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project." Methods Enzymol **183**: 252-78.

Shay, J. W. and S. Bacchetti (1997). "A survey of telomerase activity in human cancer." Eur J Cancer **33**(5): 787-91.

Shibayama, Y., K. Ushinohama, R. Ikeda, et al. (2006). "Effect of methotrexate treatment on expression levels of multidrug resistance protein 2, breast cancer resistance protein and organic anion transporters Oat1, Oat2 and Oat3 in rats." Cancer Sci **97**(11): 1260-6.

Sickmier, E. A., K. E. Frato, H. Shen, et al. (2006). "Structural basis for polypyrimidine tract recognition by the essential pre-mRNA splicing factor U2AF65." Mol Cell **23**(1): 49-59.

- Singh, R., J. Valcarcel and M. R. Green (1995). "Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins." Science **268**(5214): 1173-6.
- Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, et al. (2003). "Activation of the interferon system by short-interfering RNAs." Nat Cell Biol **5**(9): 834-9.
- Song, J., Z. Intody, M. Li, et al. (2004). "Activation of gene expression by triplex-directed psoralen crosslinks." Gene **324**: 183-90.
- Soucek, L., J. Whitfield, C. P. Martins, et al. (2008). "Modelling Myc inhibition as a cancer therapy." Nature **455**(7213): 679-83.
- Stern, M. Z., S. K. Gupta, M. Salmon-Divon, et al. (2009). "Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism." Rna **15**(4): 648-65.
- Stevens, C., S. Pettersson, B. Wawrzynow, et al. (2008). "ATP stimulates MDM2-mediated inhibition of the DNA-binding function of E2F1." FEBS J **275**(19): 4875-86.
- Swerts, K., B. De Moerloose, C. Dhooge, et al. (2006). "Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia." Eur J Cancer **42**(3): 295-309.

T

- Takaoka, A., Z. Wang, M. K. Choi, et al. (2007). "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response." Nature **448**(7152): 501-5.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- Tukey, R. H. and C. P. Strassburg (2000). "Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 581-616.

U

- Uchaipichat, V., P. I. Mackenzie, X. H. Guo, et al. (2004). "Human udp-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid." Drug Metab Dispos **32**(4): 413-23.
- Uhrinova, S., D. Uhrin, H. Powers, et al. (2005). "Structure of free MDM2 N-terminal domain reveals conformational adjustments that accompany p53-binding." J Mol Biol **350**(3): 587-98.

V

- Vacek, M., P. Sazani and R. Kole (2003). "Antisense-mediated redirection of mRNA splicing." Cell Mol Life Sci **60**(5): 825-33.
- Valcarcel, J., R. Singh, P. D. Zamore, et al. (1993). "The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA." Nature **362**(6416): 171-5.
- van de Kerkhof, E. G., I. A. de Graaf, A. L. Ungell, et al. (2008). "Induction of metabolism and transport in human intestine: validation of precision-cut slices as a tool to study induction of drug metabolism in human intestine in vitro." Drug Metab Dispos **36**(3): 604-13.
- Vermeulen, A., L. Behlen, A. Reynolds, et al. (2005). "The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency." Rna **11**(5): 674-82.

W

- Wang, M., Y. Q. Li, N. Zhong, et al. (2005). "[Induction of uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase gene expression by sulforaphane and its mechanism: experimental study in human colon cancer cells]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **85**(12): 819-24.
- Wartenberg, M., F. C. Ling, M. Muschen, et al. (2003). "Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species." FASEB J **17**(3): 503-5.
- Wood, M., H. Yin and G. McClorey (2007). "Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy." PLoS Genet **3**(6): e109.

X

- Xie, W., M. F. Yeuh, A. Radominska-Pandya, et al. (2003). "Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4150-5.

Y

- Yeager, R. L., S. A. Reisman, L. M. Aleksunes, et al. (2009). "Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery"." Toxicol Sci **111**(2): 238-46.
- Yokota, H., N. Ohgiya, G. Ishihara, et al. (1989). "Purification and properties of UDP-glucuronyltransferase from kidney microsomes of beta-naphthoflavone-treated rat." J Biochem **106**(2): 248-52.

Young, S. L., S. H. Krawczyk, M. D. Matteucci, et al. (1991). "Triple helix formation inhibits transcription elongation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10023-6.

Z

Zamore, P. D., J. G. Patton and M. R. Green (1992). "Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF." Nature **355**(6361): 609-14.

Zitvogel, L., A. Tesniere and G. Kroemer (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." Nat Rev Immunol **6**(10): 715-27.