



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implicació del miRNorma tumoral en l'expressió del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1

Clara Boces Pascual

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR

FACULTAT DE BIOLOGIA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Implicacions del miRNoma tumoral en
l'expressió del transportador concentratiu
de nucleòsids hCNT1**

Clara Boces Pascual

2020

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTORA PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA UNIVERSITAT DE BARCELONA

Implicacions del miRNoma tumoral en l'expressió del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1

Memòria presentada per

Clara Boces Pascual

La interessada,

Vist-i-plau dels directors:

Dr. Marçal Pastor Anglada

Catedràtic de Bioquímica i
Biologia Molecular
Departament de Bioquímica i
Biomedicina Molecular
Universitat de Barcelona

Dra. Sandra Pérez Torras

Investigadora CIBERhd
Professora Associada
Departament de Bioquímica i
Biomedicina Molecular
Universitat de Barcelona

Dans la vie, rien n'est à craindre,
tout est à comprendre.

Marie Curie

ABSTRACT

Human Concentrative Nucleoside Transporters (hCNTs) are encoded by *SLC28* gene family. It has been demonstrated that hCNT1 is lost in some cancers. Furthermore, hCNTs have the ability of translocating selected nucleoside- derivatives, currently used in anticancer therapies, for that reason, a change in their expression profile could affect drug bioavailability and drug chemoresistance. Recent studies demonstrate that hCNT1 has also additional functions, being a transceptor and it is likely to be relevant in tumor biology and during the carcinogenic process. Although mechanisms responsible for hCNT1 loss during carcinogenesis are unknown, it seems likely that epigenetic modifications might be able to affect hCNT1 expression and functional activity. miRNAs are small, non-coding transcripts which play a key role during the carcinogenic process with a discriminatory expression profiles significantly different to healthy individuals. miRNAs pair to mRNA by complementarity to 3'UTR extreme of the target gene, modulating its expression. The objective of this work aims to elucidate miRNAs associated with hCNT1 loss of expression in CRC, PDAC and HCC. The analysis of paired clinical samples of CRC, PDAC and HCC confirm the decrease of hCNT1 compared to the adjacent non-tumoral tissue. Also, increased expression of miR-106a, miR-17 and miR-18a is correlated with hCNT1 loss of expression in the same clinical samples. The luciferase assay validates hCNT1 as a direct target of miR-106a and miR-17. Furthermore, the modulation of these miRNAs could affect hCNT1 mRNA and protein levels. A new 3D cell culture model (spheroids) is presented to increase basal levels of endogenous hCNT1 compared to monolayer cell culture. This new model allows to evaluate hCNT1 modulation by miRNAs as an easy and complete way. The results obtained in spheroid culture confirm the ability of miR-106a and miR-17 to regulate hCNT1 expression. Moreover, miRNAs silencing increase gemcitabine effect in spheroids. All these results propose miR-106a and miR-17 as possible new therapeutic targets to improve nucleoside analogs treatment by increasing hCNT1 and also the possibility of using them as biomarkers.

ÍNDEX

LLISTAT D'ACRÒNIMS	1
LLISTAT DE FIGURES.....	3
LLISTAT DE TAULES	7
INTRODUCCIÓ	11
1. microRNAs	11
1.1 Descobriment dels microRNAs	11
1.2 Biogènesi dels microRNAs.....	12
1.3 Mecanisme d'acció dels microRNAs	18
1.4 Implicació clínica dels microRNAs.....	20
2. Nucleòsids i nucleòtids	28
2.1 Biosíntesi dels nucleòtids.....	29
3. Transportadors de nucleòsids.....	32
3.1 Transportadors concentratius de nucleòsids (<i>SLC28</i>)	32
3.2 Transportadors equilibratius de nucleòsids (<i>SLC29</i>).....	35
3.3 Distribució tissular i expressió dels transportadors de nucleòsids	37
3.4 Els transportadors de nucleòsids com a transceptors	41
3.5 Implicació clínica dels transportadors de nucleòsids.....	42
3.6 Regulació dels transportadors de nucleòsids	45
HIPÒTESI I OBJECTIUS	49
MATERIALS I MÈTODES.....	53
1. Cultius cel·lulars	53
1.1. Línies cel·lulars	53
1.2. Manteniment i criopreservació	53
1.3. Test de micoplasma.....	55
1.4. Tractaments amb fàrmacs.....	55
1.5. Modulació dels microRNAs.....	56
1.5.1. Sobreexpressió miRNAs.....	57
1.5.2. Silenciament miRNAs.....	57
1.5.3. Bloqueig miRNAs	57
2. Generació d'esferoides.....	58
2.1. Control del creixement dels esferoides	58
3. Generació de vectors.....	59

3.1	PCR	59
3.2	Gels d'agarosa	60
3.3	Clonació de vectors	61
3.4	Mutagènesi dirigida.....	63
3.5	Seqüenciació.....	64
4.	Assaig Luciferasa	65
5.	Anàlisi de l'expressió d'RNA	66
5.1.	Extracció d'RNA	66
5.2.	Síntesi de cDNA	66
5.3.	<i>Real-time</i> PCR (RT-PCR)	68
5.4.	<i>Real-time</i> PCR absoluta	69
6.	Anàlisi de l'expressió de proteïnes	70
6.1.	Obtenció d'extractes proteics totals	70
6.2.	Valoració de la concentració de proteïna.....	70
6.3.	Anàlisi de proteïnes per Western Blot.....	71
6.4.	Localització subcel·lular de proteïnes per immunofluorescència	73
7.	Anàlisi del perfil de cicle cel·lular.....	75
8.	Assaig de viabilitat cel·lular	76
9.	Transport de nucleòsids	77
9.1.	Medis i reactius	77
9.2.	Assaig de transport en cèl·lules en monocapa	78
9.3.	Valoració proteica pel mètode BCA.....	78
9.4.	Càlculs d'activitat específica	78
10.	Estudis del creixement tumoral	79
11.	Estadística	79
RESULTATS I DISCUSSIÓ		83
1.	Determinar <i>in silico</i> els miRNA candidats a regular l'expressió de les proteïnes hCNT1 i hCNT2 en càncer colorectal, adenocarcinoma ductal pancreàtic i hepatocarcinoma	83
1.1	Variants gèniques d'hCNT1.....	83
1.2	Determinar els microRNAs candidats	92
2.	Avaluar l'expressió dels miRNA i d'hCNT1 i hCNT2 en mostres aparellades de teixit sa i tumoral en càncer colorectal, pancreàtic i hepatocarcinoma	95
2.1	Expressió en mostres aparellades de teixit sa i tumoral.....	95

2.2 Correlacions miRNA-hCNTs.....	100
3. Validar la implicació dels miRNAs alterats en la pèrdua d'expressió dels transportadors	108
3.1 Efecte de la modulació de la família miR-17 sobre l'expressió d'hCNT1	109
3.2 Deleció del lloc d'unió del miR-106a, miR-17, miR-18a i miR-9 a l'extrem 3'UTR d'hCNT1.....	123
3.3 Assaig luciferasa per validar la unió del miR-106a, miR-17, miR-18a i miR-9 al 3'UTR d'hCNT1.	125
4. Analitzar l'efecte de la restitució dels transportadors, mitjançant la modulació dels miRNAs candidats, en models preclínic de les neoplàsies estudiades.	127
4.1 Efecte del silenciament de miR-106a i miR-17 en l'expressió d'hCNT1	127
4.2 Inhibició miR-106a amb el vector miRZip-106a sobre l'expressió d'hCNT1.....	131
4.3 Anàlisi de l'efecte dels microRNAs en la modulació dels transportadors en un nou model cel·lular tridimensional	136
DISCUSSIÓ GENERAL.....	151
CONCLUSIONS	163
BIBLIOGRAFIA.....	167
ANNEX.....	179

LLISTAT D'ACRÒNIMS

AGO	Proteïna Argonaute
AMPK	Proteïna quinasa activada per AMP
ATP	Adenosina Trifosfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BS	<i>Binding site</i>
CCA	Colangiocarcinoma
CDI	<i>Coefficient of drug interaction</i>
CDK	Quinasa dependent de ciclina
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid CDS Coding sequence</i>
CED	Domini central (Drosha)
CLL	Leucèmia limfàtica crònica
CNT	<i>Concentrative Nucleoside Transporter</i> Dip Dipiridamol
CRC	Càncer colorectal
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxinucleòtid Trifosfat
dpm	Desintegracions per minut
DS	Desviació Estàndard
ds-RBD	Double-Strand RNA Binding Domain
EMT	Transició Epiteli-mesenquimal
ENT	<i>Equilibrative Nucleoside Transporter</i>
ES	Error Estàndard
EXP-5	Exportina-5
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FW	<i>Forward</i>
GEM	Gemcitabina
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HCC	Hepatocarcinoma
HDAC	Histona Desacetilasa
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
JCRB	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
KM	Constant Michaelis-Menten
MCS	<i>MultiCloning Site</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistance Transporters</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
miRNA	microRNA
MW	<i>MultiWell</i>
NEAA	Aminoàcids no essencials
NLS	Senyal de localització nuclear

Pb	Parells de bases
P-Bodies	Processing bodies
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreàtic
RIIIDa-RIIIDb	Domini RNasa II (a i b)
RISC	RNA-inducerd silencing complex
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Revolucions per minut
RT-PCR	<i>Real-Time PCR</i>
RV	<i>Reverse</i>
SAHA	<i>Suberanolohydroxamic acid (Vorinostat)</i>
SDS	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
snoRNAs	<i>Small nucleolar RNAs</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
TM	Transmembrana
TMD	Domini Transmembrana
tRNA	RNA de transferència
VF	Volum final
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild Type</i>
3'UTR	3'Untranslated Region
5-FU	5-Fluorouracil

LLISTAT DE FIGURES

Figura 1. Esquema de la via canònica de la biogènesi dels microRNAs i el seus efectes sobre el gen diana.....	12
Figura 2. Esquema del pri-miRNA (A) i el complex microprocessador (B).	14
Figura 3. Processament del pre-miRNA fins al miRNA madur	16
Figura 4. Esquema de les vies no canòniques de la biogènesi dels microRNAs.	17
Figura 5. Mecanisme de silenciament de l'mRNA dels microRNAs	19
Figura 6. Estructura dels nucleòsids i nucleòtids i de les bases púriques i pirimidíniques que els formen.....	28
Figura 7. Vies de síntesi <i>de novo</i> dels nucleòsids	30
Figura 8. Principals vies de recuperació de nucleòsids.	31
Figura 9. Representació esquemàtica dels transportadors concentratius de nucleòsids en humans (hCNTs).	33
Figura 10. Estructura predita per als transportadors concentratius de nucleòsids (hCNTs) per homologia amb vcCNT.	35
Figura 11. Representació esquemàtica dels transportadors equilibratius de nucleòsids en humans hENT1 i hENT2.	36
Figura 12. Estructura del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1	37
Figura 13. Distribució cel·lular dels transportadors de nucleòsids en l'intestí prim de ratolí	39
Figura 14. Representació de la distribució subcel·lular dels transportadors de nucleòsids	40
Figura 15. hCNT1 com a transceptor	41
Figura 16. Esquema de l'estratègia d'amplificació i disseny dels primers per la deleció dels BS dels miRNAs al vector 3'UTR d'hCNT1.	64
Figura 17. Esquema representatiu dels transcrits de les dues variants d'hCNT1	85
Figura 18. Expressió de les dues variants d'hCNT1 a colangiocarcinoma.	86
Figura 19. Expressió de les variants d'hCNT1 en hepatòcits humans determinats per RT-PCR absoluta	86
Figura 20. Expressió basal de l'mRNA d'hCNT1 V2 en línies derivades de CCA.....	87
Figura 21. Expressió de les variants d'hCNT1 amb les seves corresponents transfeccions a diferents temps.....	88
Figura 22. Expressió de la variant 2 d'hCNT1 amb la seva transfecció en el vector pcDNA3.1 i amb el vector pcDNA3.1+C-HA.	89
Figura 23. Localització subcel·lular de les variants d'hCNT1.	89
Figura 24. Activitat de transport de les variants d'hCNT1 a les línies cel·lulars HEK293 i Huh7.	90
Figura 25. Activitat luciferasa del 3'UTR de les dues variants d'hCNT1 respecte el vector PGL3-promoter	92

Figura 26. Expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids en mostres clíniques de càncer colorectal (CRC), adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) i hepatocarcinoma (HCC).	96
Figura 27. Disminució de l'expressió de la proteïna hCNT1 en teixit tumoral de CRC i PDAC.	97
Figura 28. Expressió dels miRNAs candidats a les mostres clíniques de CRC.....	99
Figura 29. Expressió dels miRNAs candidats a les mostres clíniques de PDAC.	99
Figura 30. Expressió dels miRNAs candidats a les mostres clíniques d'HCC.	100
Figura 31. Correlació de l'expressió del transportador hCNT1 i els miRNAs candidats a CRC.	101
Figura 32. Correlació de l'expressió del transportador hCNT2 i els miRNAs candidats a CRC.	102
Figura 33. Correlació de l'expressió del transportador hCNT1 i els miRNAs candidats a PDAC. Correlacions negatives significatives entre hCNT1 i miR-106a (p valor=0.008), miR-17 (p valor=0.045) i miR-18a (p valor=0.033). La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.....	102
Figura 34. Correlació de l'expressió del transportador hCNT2 i els miRNAs candidats a PDAC.....	103
Figura 35. Correlació de l'expressió del transportador hCNT1 i els miRNAs candidats a HCC.	104
Figura 36. Correlació de l'expressió del transportador hCNT2 i els miRNAs candidats a HCC. La.....	104
Figura 37. Correlacions significatives entre els miRNAs i els transportadors hCNT1 en línies derivades de CRC (A) i PDAC (B) i l'anàlisi en conjunt de les línies de CRC i PDAC (C).....	106
Figura 38. Correlacions significatives entre els miRNAs i els transportadors hCNT2 en línies derivades de PDAC (A) i l'anàlisi en conjunt de les línies de CRC i PDAC (B).	106
Figura 39. Esquema dels tres clústers paràlegs miR-17-92, miR-106a-363 i miR-106b-25, i les famílies que els formen.	108
Figura 40. Modulació d'hCNT1 amb el silenciament de la família miR-17.....	109
Figura 41. Activitat luciferasa del 3'UTR amb el silenciament de la família miR-17	111
Figura 42. El SAHA modula l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids.	113
Figura 43. Efecte del SAHA sobre els miRNA de la família miR-17 i els clústers paràlegs candidats a 4 i 6h de tractament.	113
Figura 44. Efecte del SAHA sobre l'expressió dels miRNAs candidats de la família miR-17 i els clústers paràlegs i sobre el transportador hCNT1 a les 48h de tractament.	114
Figura 45. Modulació dels transportadors de nucleòsids i hOCT1 amb el tractament de cisplatí a diferents temps.....	116
Figura 46. Activitat de transport amb el tractament de cisplatí.	117
Figura 47. Efecte de la gemcitabina en la viabilitat cel·lular amb la combinació de tractament amb cisplatí.	118
Figura 48. Efecte del tractament del cisplatí sobre els transportadors <i>in vivo</i>	119
Figura 49. Efecte de la combinació del cisplatí i la gemcitabina en tumors derivats de la línia EGI-1 .	119
Figura 50. Expressió dels miRNAs amb el tractament de cisplatí a les mostres de tumors subcutanis generats a partir de les línies de CCA EGI-1 i BCLC12.....	120
Figura 51. Activitat luciferasa del 3'UTR d'hCNT1 amb el tractament de cisplatí.	121

Figura 52. Activitat luciferasa amb el silenciament del miR-106a a les línies derivades de CRC, HT29 i PDAC, CP15T.	123
Figura 53. Esquema de la seqüència i posició dels llocs d'unió (BS) dels microRNAs a l'extrem 3'UTR d'hCNT1.	124
Figura 54. Esquema de l'activitat luciferasa amb els 3'UTR WT (<i>Wild type</i>) i els delecionats (DEL) en els quals es van eliminar els BS dels microRNAs seleccionats.....	125
Figura 55. Validació de la unió dels microRNAs a l'extrem 3'UTR d'hCNT1 mitjançant l'activitat luciferasa.	126
Figura 56. Modulació de l'expressió del missatger d'hCNT1 amb el silenciament del miR-106a.	128
Figura 57. Modulació de l'expressió del missatger d'hCNT1 amb el silenciament del miR-17.	128
Figura 58. Expressió proteica del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 amb la modulació dels microRNAs miR-106a i miR-17.....	130
Figura 59. Estructura del vector miRZip i esquema del shRNA.	132
Figura 60. Expressió d'hCNT1 amb el bloqueig del miR-106a pel vector miRZip-106a.....	132
Figura 61. Activitat de transport de citidina amb la transfecció del miRZip-106a a la línia CP15T	133
Figura 62. Anàlisi del perfil del cicle cel·lular amb el bloqueig del miR-106a mitjançant el vector miRZip-106 a les línies derivades de CRC i PDAC, HT29 i CP15T respectivament.....	134
Figura 63. Expressió i fosforilació de les quinases AKT i ERK amb el bloqueig del miR-106a.	135
Figura 64. Expressió d'mRNA dels transportadors concentratius de nucleòsids en diferents condicions de confluència cel·lular.	137
Figura 65. Expressió d'mRNA dels transportadors equilibratius de nucleòsids en diferents condicions de confluència cel·lular.	137
Figura 66. Creixement del cultiu cel·lular d'esferoides durant 10 dies de les diferents línies tumorals.	139
Figura 67. Creixement esferoides de la línia HT29 durant els 10 dies de creixement	139
Figura 68. Expressió dels transportadors hCNT1, hCNT3, hENT1 i hENT2 i dels microRNAs miR-106a i miR-17 en el cultiu cel·lular tridimensional d'esferoides en comparació amb el cultiu en monocapa.....	140
Figura 69. Expressió del mRNA d'hCNT1 amb la modulació dels miRNAs miR-106a i miR-17 al cultiu tridimensional d'esferoides.....	141
Figura 70. Expressió de la proteïna hCNT1 amb la modulació dels microRNAs miR-106a i miR-17 al cultiu tridimensional d'esferoides.	142
Figura 71. Expressió i fosforilació de les quinases AKT i ERK amb el bloqueig del miR-106a i el silenciament i sobreexpressió dels miR-106a i miR-17 en el cultiu d'esferoides.	144
Figura 72. Activitat de transport concentratiu amb el bloqueig del miR-106a.....	145
Figura 73. Efecte del 5D-Fur en la viabilitat cel·lular dels esferoides amb la modulació dels microRNAs.	146

**Figura 74. Efecte de la gemcitabina en la viabilitat cel·lular dels esferoides amb la modulació dels
microRNAs. 147**

LLISTAT DE TAULES

Taula 1. Fàrmacs actuals en estudi pre-clínic (Fase I i II) basats en microRNAs.	27
Taula 2. Estequiometria i selectivitat dels transportadors concentratius de nucleòsids.	34
Taula 3. Transportadors equilibratius de nucleòsids, els seus substrats i les seves constants d'afinitat.	36
Taula 4. Fàrmacs anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpia oncològica.	45
Taula 5. Descripció de les línies cel·lulars utilitzades.	54
Taula 6. Fàrmacs utilitzats a la tesi.	56
Taula 7. Condicions de transfecció amb Lipofectamina 2000 i Lipofectamina 3000	57
Taula 8. Macro Generat per la mesura del creixement dels esferoides.	59
Taula 9. Vectors plasmídics utilitzats i subclonació per la que s'han utilitzat.	61
Taula 10. Primers utilitzats.	65
Taula 11. Sondes TaqMan generades al laboratori utilitzades per l'anàlisi RT-PCR.....	69
Taula 12. Sondes TaqMan comercials utilitzades per l'anàlisi RT-PCR.	70
Taula 13. Anticossos utilitzats	75
Taula 14. miRNA candidats a regular hCNT1 (<i>SLC28A1</i>) i hCNT1 (<i>SLC28A2</i>) als tumors de CRC, PDAC i HCC.	94

A watercolor splash graphic with a mix of yellow, orange, and light blue colors, positioned to the left of the title text.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. microRNAs

1.1 Descobriment dels microRNAs

Els microRNAs (miRNAs) són RNAs petits endògens no codificants, els quals tenen una mida d'uns 22 nucleòtids aproximadament. La seva funció és la regulació post-transcripcional de diversos gens mitjançant la unió a l'extrem 3'UTR del seu mRNA diana. El descobriment dels miRNAs va obrir un nou àmbit d'estudi en la regulació gènica, ja que aquests estan involucrats en la majoria dels processos cel·lulars com la diferenciació, la proliferació, la regulació del cicle cel·lular o l'apoptosi, entre d'altres (Bartel 2004, Jonas and Izaurralde 2015). La majoria de les proteïnes estan sota el control dels miRNAs; en humans, més del 60% d'aquestes estan sotmeses a la fina regulació dels microRNAs (Bofill-De Ros et al. 2019, Friedman et al. 2009). La desregulació dels miRNAs està associada a diverses malalties com el càncer, malalties del desenvolupament o desordres neurodegeneratius (Ha and Kim 2014).

L'any 1991 es va observar una repressió del gen *lin-14* produïda pel producte del gen *lin-4*, el qual controla el desenvolupament larval de *C. Elegans* (Wightman et al. 1991). Dos anys més tard, al 1993, diversos investigadors van observar que el gen *lin-4* no codificava per una proteïna, sinó que generava un RNA de 61 nt i un parell d'RNAs petits de 22 nucleòtids (Lee, Feinbaum and Ambros 1993). Aquests RNAs petits tenien una seqüència complementària a diferents llocs del 3'UTR del gen *lin-14*, essent els responsables d'aquesta regulació. Set anys després, es va descobrir un altre gen a *C.Elegans*, *lin-41*, que estava regulat per un RNA petit no codificant *let-7*, el qual també s'unia a l'extrem 3'UTR del gen diana per a regular-ne l'expressió. Ambdós gens són importants per al desenvolupament larval de *C.Elegans*, per tant, la seva expressió en determina el desenvolupament (Reinhart et al. 2000). Ràpidament es va observar que *let-7* tenia homòlegs a altres espècies animals, inclosos els vertebrats (Pasquinelli et al. 2000). Aquests RNAs petits, responsables de la regulació de diversos gens del desenvolupament larval, van ser els primers microRNAs descrits, posicionant-los com a elements clau per a la regulació gènica dels animals (Lagos-Quintana et al. 2001, Lau et al. 2001, Lee and Ambros 2001). A partir d'aleshores, un gran nombre de microRNAs van ser descrits en animals, plantes i virus (Griffiths-Jones et al. 2008). Simultàniament al

descobriments dels miRNAs, altres tipus de RNAs petits també van ser descoberts. És el cas dels *small interfering RNA*, anomenats siRNA (Reinhart and Bartel 2002, Ambros et al. 2003) o els *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs) (Aravin, Hannon and Brennecke 2007). Aquests RNAs petits, igual que els miRNAs, regulen l'expressió del RNA, però difereixen al seu origen i la seva biogènesi (Bartel 2004). Des del seu descobriment l'any 1993, el nombre de microRNAs ha incrementat a molta velocitat, actualment el nombre de miRNAs identificats en humans és de 4719 i de 38589 per tots els organismes (Griffiths-Jones 2004, Griffiths-Jones et al. 2006, Griffiths-Jones et al. 2008, Griffiths-Jones 2010, Kozomara and Griffiths-Jones 2011, Kozomara and Griffiths-Jones 2014, Kozomara, Birgaoanu and Griffiths-Jones 2019).

1.2 Biogènesi dels microRNAs

La biogènesi dels miRNAs es basa en un procés de múltiples passos, el primer d'ells és la transcripció i processament al nucli, amb el que es genera el pri-miRNA. A través del complex microprocessador format per l'enzim Drosha i el seu cofactor DGCR8 es genera el pre-miRNA, el qual és exportat al citoplasma per l'exportina 5. Al citoplasma el pre-miRNA és de nou processat en aquest cas per l'enzim Dicer per donar lloc al microRNA madur, el qual junt amb la proteïna Argonaute (AGO) formen el complex de silenciament (RISC), així el microRNA ja es pot unir a l'extrem 3'UTR del seu gen diana per a regular-ne la seva expressió (Bartel 2004, Ha and Kim 2014, Bofill-De Ros et al. 2019) (Figura 1).

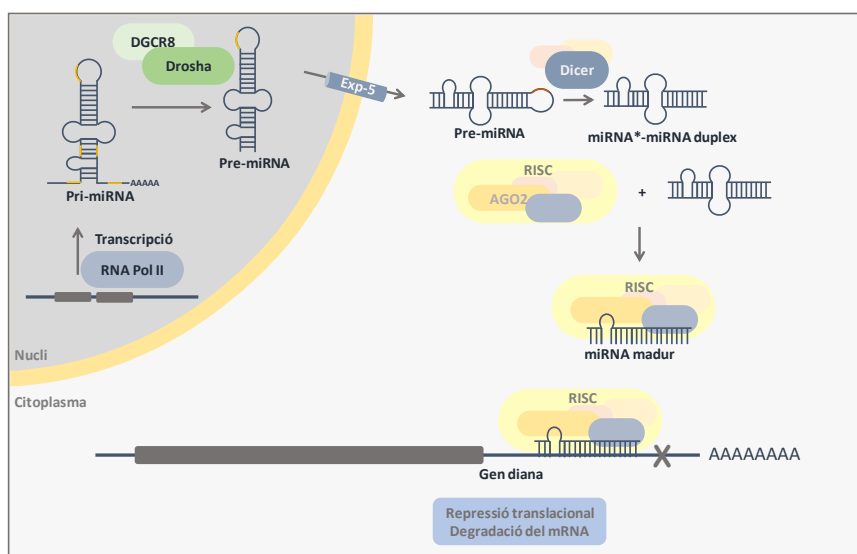


Figura 1. Esquema de la via canònica de la biogènesi dels microRNAs i el seus efectes sobre el gen diana.

Els microRNAs poden estar organitzats de diferent manera dins el genoma, el seu origen pot ser intergènic o intrònic, i es poden codificar per un sol precursor d'un miRNA o per un clúster de microRNAs. Normalment els loci estan propers els uns als altres generant així una unitat policistrònica de transcripció (Ha and Kim 2014). Alguns gens dels miRNAs estan a la part intrònica de gens de proteïnes codificants, amb les quals comparteixen el promotor. En els humans, la majoria de microRNAs estan codificats per introns. Aproximadament, el 30% dels microRNAs estan organitzats en clústers policistrònics. A més, la seva transcripció pot estar regulada per un promotor d'un altre gen o pel promotor del mateix gen. Normalment els microRNAs d'un mateix clúster comparteixen promotor. L'organització dels microRNAs en clústers es caracteritza per una estructura secundària complexa amb diversos *hairpins* que permeten estabilitzar l'RNA i per tant evitar la seva degradació. Els microRNAs d'un mateix clúster poden compartir la *seed sequence* (seqüència de reconeixement al 3'UTR), fet que classifica els microRNAs en famílies. (Khuu, Utheim and Sehic 2016).

La transcripció es pot donar per l'RNA polimerasa II (Pol-II) o l'RNA polimerasa III (Pol-III), essent en humans, més freqüent la transcripció per part de la Pol-II. El transcrit generat, anomenat pri-miRNA té una mida aproximada d'1kb, forma un *stem-loop* d'uns 35 parells de bases amb un *loop* apical i dos extrems de cadena senzilla a la part basal (Figura 2) (Ha and Kim 2014, Lee et al. 2002). Aquesta estructura, junt amb diferents motius altament conservats en unes zones concretes del pri-miRNA permet que aquest sigui reconegut pel complex microprocessador. Aquest està format per la proteïna nuclear Drosha de 159kDa que consisteix en un domini central (CED), dos dominis RNasa III (RIIIDa i RIIIDb) i d'un domini d'unió (dsRNA-binding, ds-RBD) (Nguyen et al. 2015), el qual és necessari però no suficient per al reconeixement de substrat. El segon element del microprocessador és la proteïna DGCR8, de 90kDa. Aquesta proteïna consisteix en un domini N-Terminal que senyalitza per la localització nuclear (NLS), un domini central anomenat Rhed per al qual hi ha els llocs d'unió a l'RNA, dos dominis d'unió al dsRNA (dsRBDs) i un extrem C-Terminal (CTT). Una unitat de la proteïna Drosha i dues de DGCR8 formen el microprocessador (Figura 2) (Nguyen et al. 2015).

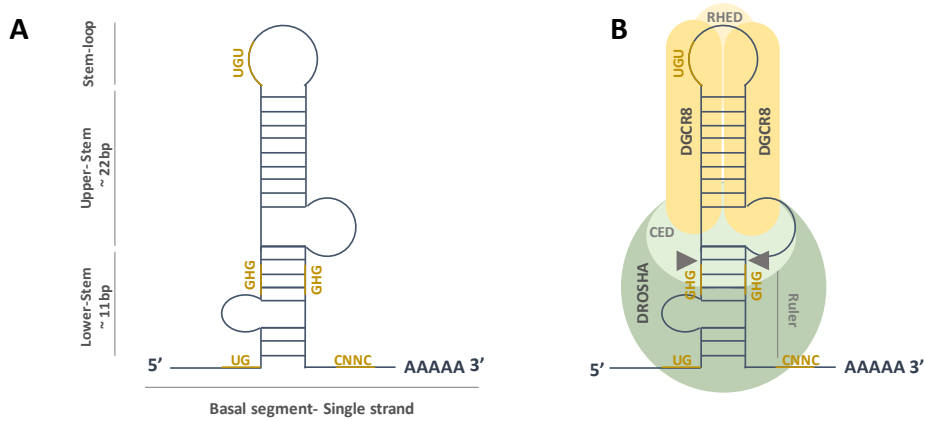


Figura 2. Esquema del pri-miRNA (A) i el complex microprocessador (B). Adaptat de S. Chun Kwon, 2019; Nguyen, 2016.

Existeix una autoregulació entre ambdues proteïnes que assegura l'homeòstasi del complex. La DGCR8 estabilitza Drosha mitjançant interaccions proteïna-proteïna, mentre que Drosha desestabilitza el missatger de DGCR8 amb l'escissió del mRNA. També existeixen altres mecanismes de regulació, a nivell post-translacional com la fosforilació de Drosha per a la seva correcta localització nuclear, o l'acetilació i desacetilació que influeixen en la seva estabilitat proteica (Ha and Kim 2014). El reconeixement del pri-miRNA pel microprocessador ha estat un fet molt estudiat recentment, i que en els 4-5 darrers anys s'ha anat configurant i completant, essent un estudi del 2019 l'últim en publicar un model de reconeixement que ha agrupat tots els elements clau del funcionament del microprocessador. Aquest model es basa en el reclutament del pri-miRNA per part de DGCR8 a través de l'alta afinitat amb l'RNA (Kwon et al. 2016), aquest pri-miRNA és col·locat al domini central de Drosha i el domini central de DGCR8 (RHED). L'orientació del pri-miRNA es basa en el reconeixement per part de Drosha del motiu basal UG i el motiu apical UGU per part de DGCR8 (Nguyen et al. 2015). Posteriorment, els dominis dsRBD de Drosha s'uneixen al pri-miRNA i localitzen el motiu mGHG, per tal de determinar la posició d'escissió (Kwon et al. 2019). Finalment, els dominis RNasa III processen el pri-miRNA per generar el pre-miRNA, un *stem-loop* intermedi d'uns 60-70 nt el qual és exportat al citoplasma a través de l'exportina 5 (Yi et al. 2003, Bartel 2004).

L'exportació del pre-miRNA al citoplasma es dona a través del transportador Exportina-5 (EXP-5), membre de la família de les kariosferines (*Kariospherin family of*

nucleocytoplasmic transport factors), una família de transportadors que tenen un paper important en el transport de RNAs no codificants com els tRNAs o els snRNAs (Yi et al. 2003, Lei and Silver 2002). Una característica important d'aquests transportadors és el fet que el transport nuclear comporta la unió a GTP des d'una Ran GTPasa, la qual hidrolitza a GDP al citoplasma al realitzar el transport (Yi et al. 2003). La cristal·lització de EXP-5 defineix la seva estructura com una cistella dins la qual es col·loca el pre-miRNA i és exportat al citoplasma (Ha and Kim 2014). El reconeixement del pre-miRNA per part de l'EXP-5 és degut a la seva naturalesa de RNA petit de doble cadena (Bohnsack, Czaplinski and Gorlich 2004).

El següent processament es dona al citoplasma per part de la proteïna Dicer, una RNasa III endonucleasa, la qual va ser identificada en primer lloc per ser la responsable del processament dels siRNAs (Bernstein et al. 2001, Ambros et al. 2003). Poc després va ser reconeguda també com a element de la síntesi dels microRNAs (Grishok et al. 2001, Hutvagner et al. 2001, Ketting et al. 2001, Bartel 2004). L'estructura d'aquesta proteïna de 200kDa consisteix en un extrem C-Terminal amb els dos dominis RNasa III, els quals al formar el dímer donen lloc al centre catalític de l'enzim i un domini dSRBD. A l'extrem N-Terminal es troba el domini ATP/Helicasa (DUF283) i el domini PAZ (Piwi/Argonaute/Zwilli). Es creu que la regió entre els dominis PAZ i els RNasa III d'unió al pre-miRNA serveixen com a regla per mesurar la distància de processament per generar el miRNA, mentre que la funció del domini helicasa de Dicer no ha estat reconeguda encara (Macfarlane and Murphy 2010, Ha and Kim 2014). L'escissió del pre-miRNA és ATP independent, encara que diversos estudis suggereixen que el recanvi de la proteïna, així com els canvis conformacionals necessaris pel correcte funcionament d'aquesta sí que requereixen ATP (Macfarlane and Murphy 2010). El reconeixement del pre-miRNA per part de Dicer es dona a l'extrem 3' generat per Drosha. L'estabilitat d'aquest enzim ve donada per la interacció amb la proteïna TAR RNA-Binding protein (TRBP) i PACT (Ha and Kim 2014). El producte final d'aquest processament és un fragment dsRNA d'uns 22 nt aproximadament, format per dues cadenes. Una d'elles, l'anomenada cadena guia, generarà el micro-RNA madur (miRNA*) i l'altre, anomenada cadena passatgera, serà eliminada (miRNA). Aquest procés el duu a terme el complex RISC (RNA-induced silencing complex), el qual està format per la proteïna Argonaute

(AGO) de 100kDa, l'enzim Dicer i el seus cofactors PACT i TRBP (Macfarlane and Murphy 2010) (Figura 3). El primer pas de l'assemblatge del miRNA madur al complex és la unió del dúplex d'RNA a la proteïna AGO, generant-se el complex anomenat pre-RISC. Aquesta unió requereix d'ATP i és un procés mediat per les xaperones Hsc70/Hsc90. És important l'orientació de la unió entre les dues cadenes i la proteïna, ja que es determinarà quina d'elles és la guia i quina la passatgera, essent la menys estable a l'extrem 5' la seleccionada com a cadena guia, degut a una millor unió amb la proteïna. La maduració d'aquest complex per formar el RISC amb el miRNA madur, es basa en dos passos: la unió de la cadena guia i l'ejecció de la cadena passatgera (Figura 3). El primer pas, després de la unió del dúplex d'RNA a la proteïna, és l'inici de l'obertura de les dues cadenes per l'extrem 3' de la cadena guia a través de l'extrem N-Terminal de la proteïna AGO, el que serveix com a prefaci del darrer pas, l'ejecció de la cadena passatgera (Figura 3). Per aquest pas hi ha dues hipòtesis o vies: la dependent d'Slicer i la independent d'Slicer. La primera consisteix en l'escissió de les bases intermèdies del dúplex d'RNA a través de la proteïna Slicer. Mentre que la segona es basa en la separació dels *mismatch* entre les bases intermèdies típic en el dúplex miRNA*/miRNA. Una vegada s'ha produït l'ejecció de la cadena passatgera, el complex RISC amb el microRNA madur ja està llest per induir la regulació del seu gen diana a través de la unió d'aquest al 3'UTR del mRNA (Kobayashi and Tomari 2016) (Figura 3).

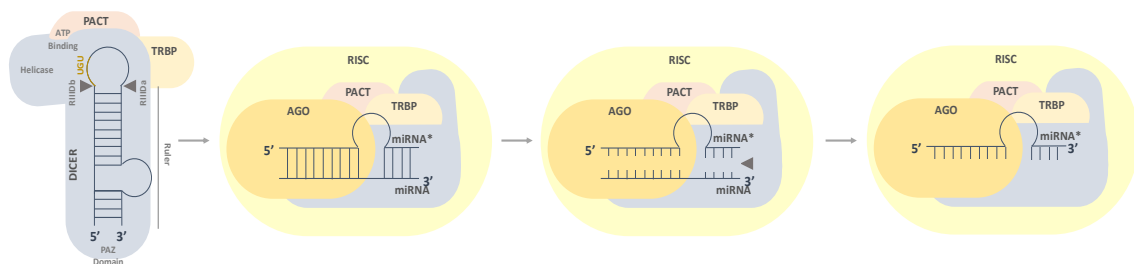


Figura 3. Processament del pre-miRNA fins al miRNA madur. Esquema de l'enzim DICER, escissió de l'*stem-loop* i acoblament al complex RISC. Eliminació de la cadena passatgera del miRNA. Adaptat de Kobayashi and Tomari 2016.

3.2.1.1 Vies no canòniques de la Biogènesi dels microRNAs

Existeixen diverses vies no canòniques de la generació dels microRNAs, les quals es basen en el "bypass" d'alguns dels processos esmentats anteriorment (Figura 4). La primera de les vies alternatives consisteix en la generació del microRNA a partir dels anomenats mirtrons, són pre-RNA formats per *splicing*, els quals adquireixen una

estructura d'*stem-loop* similar als miRNAs. Aquests són exportats directament al citoplasma per l'EXP-5 i processats per Dicer com en la via canònica. De la mateixa manera, altres RNAs petits no codificants com tRNAs o snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) poden entrar al processament de Dicer sense l'acció de l'enzim Drosha (Figura 4). Encara que la majoria de vies alternatives són dependents de Dicer, hi ha una via alternativa en que el miRNA és processat sense l'acció d'aquest enzim. Aquest procediment consisteix en que el pre-miRNA generat per Drosha conté un *stem-loop* massa curt, el qual no pot ser processat per Dicer, el pre-miRNA es col·loca directament al centre d'AGO i aquest és el responsable del seu processament fins a obtenir un miRNA madur funcional (Figura 4). Finalment, la darrera via alternativa és conseqüència també de la generació del pre-miRNA amb un nucleòtid menys a l'extrem 3'. Per això aquest pre-miRNA abans de ser processat per Dicer és monouridilat per la Terminal Uridil Transferasa (TUT) (Figura 4). Un fet important és que la majoria dels microRNAs estan generats seguint la via canònica i que aquestes vies alternatives representen només un 1% de la biogènesi dels miRNAs (Ha and Kim 2014).

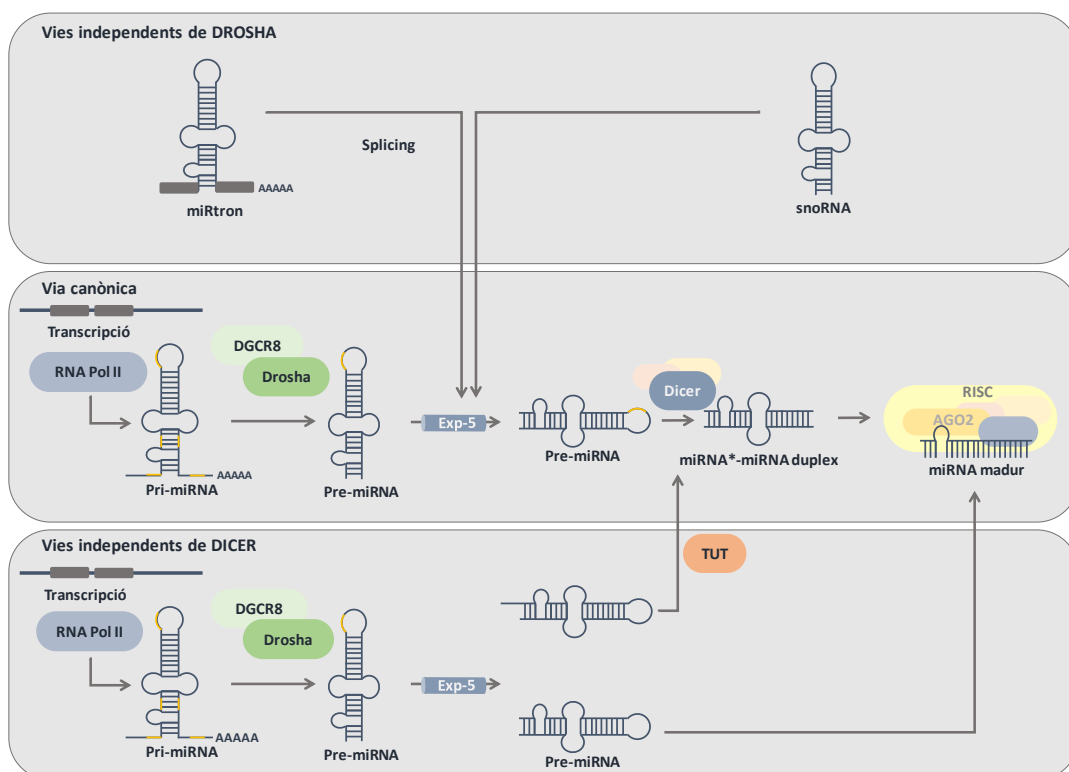


Figura 4. Esquema de les vies no canòniques de la biogènesi dels microRNAs. Adaptat de (Ha and Kim 2014).

1.3 Mecanisme d'acció dels microRNAs

El mecanisme pel qual els microRNAs reprimeixen l'expressió de l'mRNA del seu gen diana es basa en el concepte d'unió entre parells de bases de Watson-Crick entre el miRNA i l'extrem 3'UTR del seu gen diana (Lee et al. 1993, Wightman, Ha and Ruvkun 1993, Macfarlane and Murphy 2010). Concretament, de tota la seqüència del microRNAs, els nucleòtids 2-7, anomenats "*seed-sequence*" són els responsables d'aquesta unió. A l'intentar fer prediccions de possibles dianes dels microRNAs es va observar que aquesta seqüència era la responsable de reduir els falsos positius i que, a més, estava altament conservada en tots els microRNAs que pertanyien a la mateixa família (Brennecke et al. 2005, Krek et al. 2005, Lewis, Burge and Bartel 2005, Bartel 2009). El grau de complementarietat entre aquesta seqüència i el lloc d'unió a l'extrem 3'UTR definirà el mecanisme de silenciament del miRNA. Si hi ha una complementarietat del 100%, es produeix una degradació de l'mRNA; mentre que si hi ha una complementarietat imperfecta es dona una repressió temporal de l'mRNA (Macfarlane and Murphy 2010). Cada regió del miRNA, com ja s'ha vist a l'apartat de biogènesi, és important. En aquest cas la *seed-sequence* és la responsable del reconeixement de la diana, mentre que altres regions del miRNA tenen altres funcions. En aquest cas, la regió de l'extrem 3' (nucleòtids 9-12) és important per estabilitzar l'mRNA i senyalitzar el lloc de l'escissió, en el cas que es doni (Bartel 2009). La repressió translacional es pot donar per quatre mecanismes: la inhibició de l'inici de la traducció, la inhibició de l'elongació, la degradació proteica o l'aturament prematur de la translació (Huntzinger and Izaurralde 2011). Existeixen diversos models pels quals es dona aquesta repressió (Figura 5). El model més acceptat és que el miRNA inhibeix la translació a l'inici interferint el reconeixement entre eIF4E i l'extrem 5' de manera competitiva amb el complex RISC; o inhibint la formació del complex ribosomal 80S per a iniciar la translació. El complex miRISC també podria inhibir l'elongació bloquejant el ribosoma una vegada ja s'ha iniciat la translació o provocant una degradació co-translacional, degradant els pèptids naixents (Wu and Belasco 2008) (Figura 5).

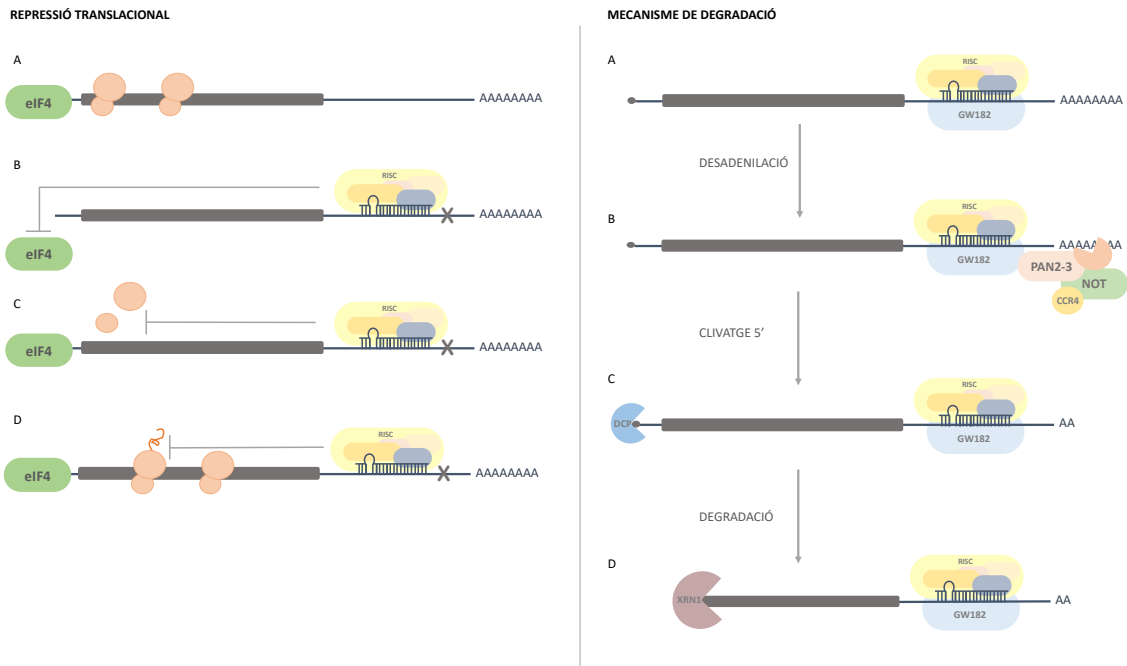


Figura 5. Mecanisme de silenciament de l'mRNA dels microRNAs. Repressió translacional (esquerra): Traducció normal de l'mRNA gràcies a la unió de l'activador eIF4 i la unió dels ribosomes (A). Inhibició de l'inici de la translació deguda a la inhibició competitiva d'eIF4 a l'extrem 5' de l'mRNA (B). Inhibició de l'activació de la translació per l'impediment de la formació del complex ribosomal 80S (C). Inhibició de la translació quan ja s'ha iniciat: tant de l'elongació com de la degradació del pèptid naixent (D). Adaptada de Belasco 2008. **Mecanisme de degradació (dreta):** El primer pas és la desadenilació deguda a la unió del miRISC amb la proteïna GW182 que al seu torn interacciona amb el complex PAN2-3 i NOT-CCR4 (A-B) una vegada la cua de poliA ha estat desadenilada, es produeix una escissió de l'extrem 5' per part de la proteïna DCP1 (C), fet que produeix la degradació de l'mRNA per l'exoribonucleasa XRN1 (D). Adaptada de Izaurralde 2015.

Per altra banda, l'altre mecanisme d'acció dels microRNAs es basa en la degradació del mRNA del seu gen diana i es dona quan la complementarietat de bases és completa. Per a aquest mecanisme, es requereix d'una família de proteïnes cofactors d'AGO: les proteïnes GW182, així com els complexos desadenilases PAN2-3 i CCR4-NOT. El primer pas és la unió d'AGO amb la proteïna GW182, la qual interacciona amb els complexos desadenilases PAN2-3, els quals desadenilen la cua Poli-A, fet que provoca que la proteïna DCP2 es desprengui de l'extrem 5' i l'mRNA resultant sigui degradat per l'exoribonucleasa Xrn1 (Figura 5) (Huntzinger and Izaurralde 2011, Jonas and Izaurralde 2015, Parsyan et al. 2011). Tant la proteïna AGO com la GW182, així com la resta de maquinària necessària per la repressió translacional, estarien localitzades en regions citoplasmàtiques anomenades mRNA-Processing bodies (P-Bodies) (Jonas and Izaurralde 2015). Els P-Bodies són compartiments citoplasmàtics dinàmics altament conservats, des dels llevats fins als humans i contenen mRNA i enzims responsables de la degradació de l'mRNA (Macfarlane and Murphy 2010). El model proposat, es basa en

la compartimentació dels *P-Bodies*, els quals una vegada l'mRNA està unit al miRNA, entren al *P-Body* on depenent del nivell de complementarietat entre bases serà degradat a un dels compartiments on hi ha la maquinària necessària o serà emmagatzemat per la seva posterior degradació. Hi ha alguns tipus cel·lulars, com els oòcits o les neurones, en que el mecanisme de repressió pot ser reversible, i que després d'una nova poliadenilació, el mRNA pot tornar a ser alliberat i de nou activat (Macfarlane and Murphy 2010, Jonas and Izaurralde 2015).

Amb aquests dos mecanismes d'acció, els microRNAs són els responsables de la regulació d'un gran nombre de gens. Es tracta d'una regulació fina que pot ser deguda a la combinació de diferents miRNAs per un sol gen o que un microRNA reguli diferents gens. A més, es pot donar un *feed-back* negatiu de regulació entre diana i miRNA, de manera que la xarxa de regulació dels microRNAs pot arribar a ser molt complicada i englobar un gran nombre de processos biològics (Du and Zamore 2005).

1.4 Implicació clínica dels microRNAs

La primera evidència de la implicació dels miRNAs en el procés carcinogènic va ser descrita pel grup del Dr. Croce, el qual va identificar una regió del cromosoma 13q14 la qual estava freqüentment delecionada en cèl·lules B de Leucèmia Limfàtica crònica (LLC). Aquesta regió codifica per dos miRNAs: miR-15a i miR-16-1, els quals estan delecionados en aquestes cèl·lules. Posteriorment, es van descriure aquests dos microRNAs com a supressors tumorals, ja que indueixen l'apoptosi reprimint l'expressió de Bcl-2, una proteïna anti-apoptòtica que normalment està sobreexpressada en cèl·lules tumorals (Peng and Croce 2016). Aquest fet va ser clau per determinar la implicació dels microRNAs en el procés carcinogènic, i va obrir un nou àmbit d'estudi dins la recerca en càncer, postulant els microRNAs com possibles biomarcadors o dianes terapèutiques de diferents tipus de tumors. Aquestes evidències es van confirmar amb diferents estudis on es defineix els microRNAs com a responsables de la regulació de diversos gens implicats en el creixement tumoral, la invasió tumoral o l'angiogènesi, entre d'altres processos relacionats amb la biologia del càncer (Chi and Zhou 2016).

1.4.1 Mecanismes de desregulació dels miRNAs en càncer

L'alteració de l'expressió dels microRNAs durant el procés carcinogènic, junt amb el fet que els miRNAs tinguin com a dianes multitud de gens relacionats amb la carcinogènesi, posiciona els microRNAs com a una peça clau en la tumorigènesi. La desregulació dels miRNAs, pot ser en els dos sentits, tant hi pot haver una sobreexpressió com una disminució de la seva expressió. Així com l'efecte del microRNA pot ser de repressor tumoral, o tenir efectes d'oncogèn; en aquest últim cas, el miRNA s'anomena oncomiR. Les causes de la desregulació dels microRNAs en càncer engloben fets com l'amplificació dels gens dels miRNAs, canvis en el control transcripcional, modificacions epigenètiques o defectes en la maquinària de biogènesis.

Amplificació o deleció dels gens dels miRNAs

Les alteracions en l'expressió dels microRNAs en tumors pot ser deguda a un canvi en el nombre de còpies dels gens codificants dels miRNAs. Normalment, els gens codificants per als miRNAs es troben en regions inestables del genoma i, per tant, amb predisposició a patir alteracions. Com s'ha comentat anteriorment la deleció de la regió que codifica els miR-15a i miR-16-1 és la responsable que l'expressió d'aquests miRNAs en càncer estigui disminuïda. Per altra banda, es pot donar l'amplificació del gen que codifica per a alguns microRNAs, com és el cas del gen que codifica per al clúster miR-17-92, el qual provoca un increment d'aquests miRNAs en diversos tipus de tumors (Peng and Croce 2016).

Control transcripcional dels miRNAs

Durant el procés carcinogènic, la desregulació de diversos factors de transcripció ha estat validada per diferents estudis. Aquests factors de transcripció, també poden estar regulant l'expressió dels microRNAs i per tant, ser responsables de la seva alteració en càncer. Un dels més coneguts és c-Myc, el qual està incrementat en molts càncers i regula la proliferació cel·lular i l'apòptosi. S'ha demostrat que c-Myc activa la transcripció del clúster miR-17-92 amb la seva unió als elements E-box al seu promotor, i per tant afecta a l'expressió dels miRNAs d'aquest clúster (Peng and Croce 2016, Yu et al. 2019, Filip and Mraz 2019).

Canvis epigenètics

Els canvis epigenètics són uns clars exemples de mecanismes de desregulació en càncer. Els canvis en la metilació del DNA o la modificació de les histones poden estar afectant als microRNAs i, per tant, condicionant la seva expressió. Un exemple és la modificació del clúster miR-17-92 amb el tractament de SAHA (Yang et al. 2015). Per tant, la metilació o l'acetilació de les histones dels gens dels microRNAs també podrien utilitzar-se com a possibles biomarcadors en càncer.

Defectes en la maquinària de biogènesi dels miRNAs

La biogènesi dels microRNAs és un procés complex, format per una gran quantitat d'enzims i components altament regulats. Un defecte en aquesta maquinària pot suposar una expressió aberrant del microRNA. El primer processament per part de Drosha és el que té més impacte alhora de determinar l'expressió dels microRNAs (Ha and Kim 2014, Bofill-De Ros et al. 2019). Per altra banda, una alteració en l'enzim Dicer també està relacionada amb l'expressió aberrant de miRNAs en càncer colorectal (CRC) així com un increment de la capacitat d'iniciació tumoral i metastàtica (Iliou et al. 2014). També s'han observat alteracions en les proteïnes AGO o en l'exportina 5 involucrades en la biogènesi dels miRNAs, que tenen com a conseqüència una alteració del perfil d'expressió dels microRNAs en tumors.

1.4.2 Conseqüències de l'alteració dels miRNAs en càncer

El procés carcinogènic es basa en un procés de múltiples passos de canvis que condicionen el desenvolupament del tumor. Per a definir aquest procés, l'any 2011 es va revisar les anomenades "*Hallmarks of cancer*", les quals determinen diversos processos biològics que s'adquireixen o intervenen en el desenvolupament tumoral. Les sis característiques diferencials inicials es basaven en l'activació dels senyals de proliferació, l'evasió dels supressors de creixement, la resistència a la mort cel·lular, l'habilitat de replicació, la inducció de l'angiogènesi i l'activació de la invasió i la metastasi (Hanahan and Weinberg 2000). Posteriorment es van afegir la inestabilitat del genoma i la inflamació tumoral. Va ser al 2011 quan es van afegir la reprogramació del metabolisme energètic i l'evasió del sistema immune. Configurant així les característiques diferencials del càncer que es consideren actualment. Tots els

processos que les configuren estan sotmesos a possibles regulacions per microRNAs (Hanahan and Weinberg 2011).

L'activació dels senyals de proliferació i replicació i l'evasió dels supressors de creixement són dues de les causes principals de la carcinogènesi, ja que l'alteració del cicle cel·lular i la seva desregulació provoca un desequilibri entre la proliferació cel·lular i la seva repressió. En aquest sentit, molts microRNAs tenen dianes relacionades amb les vies de proliferació cel·lular i la seva regulació, és el cas de les proteïnes E2F, les quals tenen un rol fonamental en la regulació del cicle cel·lular. Aquestes proteïnes estan sota la regulació del clúster miR-17-92, mentre que c-Myc indueix la transcripció tant d'E2F com del clúster, generant-se així un *feedback* d'autoregulació. Per tant, la desregulació d'aquest clúster provoca una alteració del cicle cel·lular afavorint la proliferació descontrolada (Li et al. 2017, Peng and Croce 2016).

La resistència a la mort cel·lular és una de les claus en la progressió tumoral. Un factor determinant en aquesta regulació és p53, un important supressor tumoral gràcies a la seva activitat pro-apoptòtica. Aquest també està sota la regulació de diversos miRNAs, com el miR-122, el qual afavoreix la seva activitat; altres, poden regular negativament l'expressió de p53 (Liu et al. 2017). Per altra banda, també hi ha la regulació dels agents anti-apoptòtics de la família Bcl-2, tal i com ja s'ha esmentat, per part de miR-15a i miR-16-1 (Peng and Croce 2016).

La metàstasi és un procés complex que s'inicia amb l'activació de la invasió. El primer pas d'aquest procés és la transició epiteli-mesenquima (EMT), caracteritzat per la pèrdua d'adhesió cel·lular mitjançant la repressió d'elements epitelials com l'E-cadherina i l'activació dels mesenquimals. Molts d'aquests elements estan sota la regulació dels miRNAs, essent-ne un exemple la regulació de ZEB1 i ZEB2, els quals són repressors de l'E-cadherina per part de miR-200 (Rankovic et al. 2019). La inducció a l'angiogènesi és un procés necessari perquè es produeixi la metàstasi, així com per a satisfer les necessitats energètiques del tumor, el qual es caracteritza per l'ambient d'hipòxia que s'hi genera. Aquest fet determina una resposta a la hipòxia a través de diversos factors com el factor d'inducció d'hipòxia (HIF), el qual influeix a un cert nombre de gens, com VEGF (*vascular endothelial growth factor*), i diversos miRNAs, per a la

formació de nous vasos sanguinis. Les necessitats energètiques dels tumors són diferents a les del teixit normal, per això durant la carcinogènesi hi ha una reprogramació del metabolisme energètic. Aquest es caracteritza per un augment de la glucòlisi aeròbica, també conegut com efecte Warburg, i per tant un major consum de glucosa i augment de la producció de lactat (Bertout, Patel and Simon 2008, Solaini, Sgarbi and Baracca 2011). Aquest canvi de vies d'obtenció d'ATP també està regulat per diversos miRNAs (Xu et al. 2019).

Un altre factor que influeix en el microambient del tumor són les cèl·lules necròtiques i la inflamació tumoral. En aquest context, les cèl·lules necròtiques envien senyals d'inflamació cel·lular que alhora poden afavorir les vies de proliferació cel·lular. Aquest procés pot estar regulat per miRNAs, afectant a diferents elements del sistema immune com les cèl·lules T. En aquest sentit, també es produeix una evasió del sistema immune durant el procés carcinogènic on hi intervenen diversos miRNAs a diferents nivells.

1.4.3 Aplicacions clíniques dels microRNAs

La clara relació entre els miRNAs i el procés carcinogènic, així com que es trobin en circulació sistèmica, fa que aquests es puguin utilitzar com uns possibles biomarcadors no invasius, tant a nivell de diagnòstic com de pronòstic (Jansson and Lund 2012, Soltani-Sedeh et al. 2019). A més, les aplicacions clíniques dels microRNAs també es basen en la possibilitat d'utilitzar-los com a tractaments.

1.4.3.1 miRNAs com a indicadors de diagnòstic i pronòstic:

Els darrers anys s'han realitzat molts estudis d'anàlisi de perfil tumoral que demostren la implicació dels miRNAs amb el fenotip tumoral. Aquest fet, junt amb diverses característiques dels miRNAs, els posicionen com a bons biomarcadors. Una d'elles és la seva estabilitat en diversos fluids corporals com el plasma, la saliva, l'orina, el fluid cerebroespinal, el semen o, fins i tot, la llet materna. Així com el seu robust perfil d'expressió, el qual permet diferenciar i classificar els teixits (Marcuello et al. 2019b, Herreros-Villanueva et al. 2019). També cal tenir en compte que els mètodes de detecció dels microRNAs són simples i ràpids com la PCR (Koturbash et al. 2015). En l'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) el perfil d'expressió de diversos microRNAs pot donar un diagnòstic més acurat que amb la citologia convencional (Vila-Navarro et

al. 2019). La sobreexpressió de diversos miRNAs també ha estat relacionada amb major o menor supervivència, com és el cas de miR-200c el qual s'ha relacionat amb una millor supervivència post-cirurgia en càncer colorectal (CRC) (Valihrach, Androvic and Kubista 2019). Per a CRC, recentment s'ha descrit un panell de 6-miRNAs (miR-19a-3p + miR-19b-3p + miR335-5p + miR29a-3p + miR-15b-5p + miR-18a-5p) que s'utilitza com a biomarcador d'aquest tumor en l'anàlisi combinat de plasma i femtes (Marcuello et al. 2019a).

L'ús de microRNAs com a biomarcadors, també s'ha de considerar com a anàlisi farmacològic de seguretat i funcionament dels fàrmacs, ja que els microRNAs tenen un rol important en la regulació gènica de l'absorció del fàrmac, de les vies d'acció dels fàrmacs i en el metabolisme i disposició d'aquest. Per tant, un canvi d'expressió dels microRNAs pot estar determinant la sensibilitat, l'eficàcia i/o la seguretat dels agents terapèutics (Koturbash et al. 2015). Aquest fet és important, ja que pot ser útil a l'hora de determinar poblacions resistents o adients a les teràpies. Per altra banda, els microRNAs també poden estar alterats a causa dels fàrmacs. És el cas de dexametasona, vinblastine, fluoxetine, l'enoxacin o el SAHA, els quals poden modular l'expressió dels miRNAs, concretament, s'ha descrit que el SAHA pot disminuir l'expressió dels miRNAs del clúster miR-17-92 (Yang et al. 2015). Aquest fet pot tenir conseqüències més enllà de l'efecte del fàrmac en si (Koturbash et al. 2015, Yang et al. 2015).

1.4.3.2 miRNAs i tractament oncològic:

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, els microRNAs modulen una gran quantitat de gens i vies relacionades amb la carcinogènesi, és per això que la seva modulació es podria usar com a tractament oncològic. Un aspecte molt important en el tractament oncològic és la resistència als fàrmacs. Els microRNAs poden tenir un paper fonamental en la resistència farmacològica que es dona en alguns tumors. Aquests poden estar intervenint de diverses maneres, com incrementant l'expressió de les bombes d'extrusió, les quals provoquen la sortida del fàrmac de la cèl·lula. En són un exemple el transportadors MDR (*Multi Drug Resistance Transporters*), els quals s'ha demostrat que estan alterats per alguns microRNAs. Els microRNAs també poden estar afectant el metabolisme del fàrmac provocant-ne així la resistència, és el cas del miR-130b el qual s'ha relacionat amb resistència a paclitaxel (Koturbash et al. 2015). En el cas de

l'hepatotarcinoma (HCC) s'han descrit diversos microRNAs com a participants en l'aparició de resistència a fàrmacs com el sorafenib i el miR-93, el miR-216a i el miR-217 els quals afectarien a l'expressió de CDKN1A (*cell cycle protein-dependent kinase 1A*) que codifica per p21. Per altra banda el miR-122 estaria afavorint l'efecte del sorafenib a través de diferents factors (Wei et al. 2019).

Per tal de modular els nivells de microRNAs que intervenen en el procés tumoral hi ha diverses estratègies. Els oligonucleòtids anti-miRNAs (AMOs) i els AntagomiRs són molècules de cadena senzilla que s'uneixen per complementarietat als microRNAs i els inhibeixen. També existeixen els LNAs (*Locked nucleic acids*) els quals tenen una modificació que els hi confereix més estabilitat i increment d'afinitat pels miRNAs. Per altra banda, si l'opció necessària és la inhibició de diversos miRNAs alhora, l'eina a utilitzar són els *miRNA sponge*. Aquests es basen en la unió de diverses seqüències les quals s'uneixen als miRNAs per complementarietat bloquejant així el seu efecte. En contraposició, si s'ha de sobreexpressar un microRNA, s'utilitzen els miRNA mímic. Tal i com el seu nom indica és una seqüència que imita el microRNA en qüestió. Cal però trobar l'estratègia d'administració correcta per aconseguir una bona bioassequibilitat d'aquests miRNAs i antagomirs i així poder modular l'expressió dels miRNAs al teixit diana. Algunes de les estratègies es basen en lipovesícules o nanopartícules que contenen el miRNA mímic o l'antagomiR (Boca et al. 2019, Chen, Gao and Huang 2015, Lee et al. 2019).

1.4.3.3 Fàrmacs i assajos clínics basats en microRNAs:

Darrerament ha augmentat molt l'estudi dels microRNAs en càncer i en altres malalties. Alguns d'aquests estudis han permès que s'acabin desenvolupant fàrmacs basats en miRNAs i que hi hagi molts assajos clínics focalitzats en els microRNAs com a biomarcadors. Alguns d'aquests fàrmacs ja s'estan utilitzant en assajos clínics, com és el cas de Miravirsen, un antagomir del miR-122, el qual s'administra via injecció subcutània, i s'està estudiant com a possible tractament de l'hepatitis C (HCV) en fase II (Bonneau et al. 2019). Un altre exemple, en aquest cas per a tractament oncològic, és MRX34, un miRNA mímic sintètic del miR-34a. Aquest miRNA és supressor tumoral i es troba disminuït en alguns càncers (Hayes, Peruzzi and Lawler 2014). Actualment hi ha més de 140 assajos clínics basats o relacionats amb els microRNAs, ja sigui com a

tractament o com a biomarcadors (ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 Nov 2019) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=microRNA&type=Intr&cond=Cancer>). La majoria dels assajos clínics actuals relacionats amb miRNAs es basen en la seva utilització com a biomarcadors, els que es basen en l'acció dels miRNAs com a tractament farmacològic es recullen a la (Taula 1).

Companyia	Producte	miRNA	Malaltia	inhibidor/ mimètic	Fase
Roche Santaris	Miravirsen	miR-122	HCV	inhibidor	Fase II
Regulus Therapeutics	RG-101	miR-122	HCV	inhibidor	Fase II
	RG-012	miR-21	Síndrome Alport		Fase I
	RG-125	miR-103/107	NASH		Fase I
MiRagen Therapeutics	MRG-201	miR-29b	Fibrosis	mimètic	Fase II
	MRG-106	miR-155	Limfoma i	inhibidor	Fase I i Fase II
	MRG-107	miR-155	leucèmia	inhibidor	Pre-Clínic
	MRG-110	miR-92	Isquèmia	inhibidor	Fase I
ENGeneIC	Mesomir	miR-16	Mesotelioma	mimètic	Fase II
Abivax	ABX464	miR-124	IBD	mimètic	Fase II

Taula 1. Fàrmacs actuals en estudi pre-clínic (Fase I i II) basats en microRNAs. HCV (Hepatitis), NASH (esteatohepatitis no alcohòlica), IBD (malaltia inflamatòria intestinal). Adaptat de E. Bonneau et al; 2019

2. Nucleòsids i nucleòtids

Els nucleòsids i nucleòtids són biomolècules essencials per la cèl·lula implicades en una gran quantitat de processos cel·lulars com la síntesi d'RNA (àcid ribonucleic) i DNA (àcid desoxiribonucleic), la senyalització cel·lular o la regulació metabòlica (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). Els nucleòtids estan formats per una nucleobase unida a una ribosa o desoxiribosa a través d'un enllaç β -glicosídic i almenys un grup fosfat (King et al. 2006). Aquests es classifiquen segons la naturalesa de la base nitrogenada. Les purines són l'adenina, la guanina i la hipoxantina, les quals formen els nucleòsids purínics adenosina, guanosina i inosina. Les pirimidines són la citosina, la timina i l'uracil, que donen lloc als nucleòsids pirimidínics: citidina, timidina i uridina. Quan els nucleòsids es fosforilen donen lloc als nucleòtids, els quals poden estar mono, di o tri-fosforilats (Figura 6).

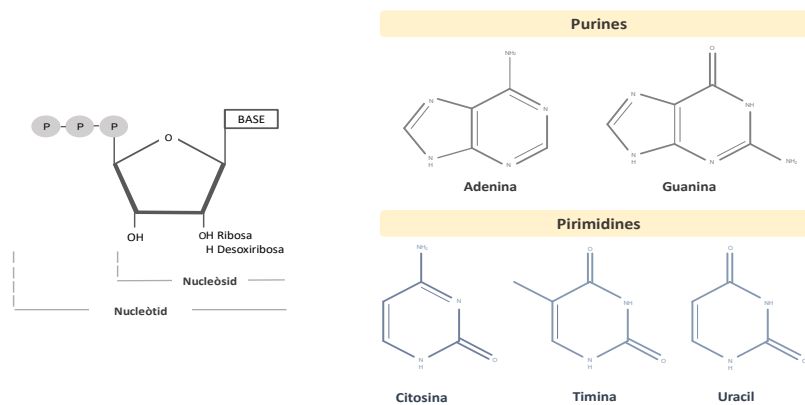


Figura 6. Estructura dels nucleòsids i nucleòtids i de les bases puríniques i pirimidíniques que els formen.

Una de les funcions principals dels nucleòsids i nucleòtids és formar el material genètic (RNA i DNA) però també intervenen en altres processos cel·lulars importants. L'aportació energètica a la cèl·lula és una d'elles, ja que quan els nucleòtids estan trifosforilats (ATP, UTP, GTP i CTP), poden actuar com a font d'energia gràcies a la hidròlisi dels seus enllaços fosfat. També poden formar part de diversos cofactors cel·lulars com el coenzim-A, o intervenir en la senyalització cel·lular com és el cas del AMPc o GMPc.

L'homeòstasi dels nucleòsids i nucleòtids està molt regulada, ja que aquesta és molt important per a mantenir la integritat del genoma, considerant que aquestes biomolècules en són els seus precursors (Pai and Kearsey 2017). L'alteració de

l'expressió d'aquestes molècules està relacionada amb diverses malalties com el càncer, malalties renals o patologies mitocondrials (Aird and Zhang 2015). Uns nivells baixos de nucleòsids i nucleòtids resulten en un augment de la mutagènesi, mentre que un augment descontrolat d'aquests disminueix l'eficiència de replicació del DNA, introduint més mutacions i predisposant a la cèl·lula a un augment descontrolat de la proliferació cel·lular i per tant afavorint l'aparició tumoral (Kohnken, Kodigepalli and Wu 2015). A més del paper fonamental dels nucleòsids i nucleòtids a la cèl·lula, alguns anàlegs de nucleòsids s'utilitzen com a teràpia oncològica, d'infeccions virals o de malalties inflammatòries (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015).

2.1 Biosíntesi dels nucleòtids

La biosíntesi dels nucleòtids i nucleòsids es pot donar per dues rutes metabòliques diferents: les vies de síntesi de *novo*, o les vies de recuperació. La primera és més costosa energèticament, mentre que la segona suposa un estalvi energètic per la cèl·lula i és la més emprada.

2.1.1 Síntesi de *novo* de nucleòtids

2.1.1.1 Síntesi de *novo* de les purines

Aquesta és una via altament conservada, que genera com a producte final l'IMP (5-inosina monofosfat) a partir del seu substrat inicial, la fosforibosil pirofosfat (PRPP), la qual prové de la via de les pentoses fosfat. En humans, aquesta ruta es dona al llarg de 10 reaccions mitjançant l'acció de 6 enzims. El primer és la transformació del PRPP a 5-fosporibosilamina (PRA) a través de l'enzim PRPP amidotransferasa (PPAT). La següent reacció està catalitzada per l'enzim fosforibosilglicinamida sintasa (GARS), per donar lloc a la N-formilglicinamida ribonucleotid (FGAR). Aquest és convertit a N-formilglicinamidina ribonucleotid (FGAM) per la fosforibosil formilglicinamidina sintasa (FGAMS). El següent pas en aquesta síntesi és la formació de l'aminoimidazol ribonucleòtid (AIR) a través de l'enzim fosforibosilaminoimidazol sintasa (AIRS). El següent enzim SAICARS o PAICS (succinilaminoimidazolcarboxiamida ribosa-5'-fosfat) utilitza aquest producte per a generar la N-succinocarboxiamida-5-aminoimidazol ribonucleòtid (SAICAR) en dos passos consecutius. SAICAR dona lloc a AICAR (aminoimidazol-4-carboxamid ribonucleòtid) gràcies a l'acció de l'adenilosuccinat liasa

(ADSL). Els dos darrers passos converteixen AICAR en IMP a través de l'acció bifuncional de l'enzim 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid formiltransferasa/ IMP ciclohidrolasa (ATIC) (Figura 7) (Pedley and Benkovic 2017). Aquesta via té un cost global de 5 ATP, 2 glutamines, 1 glicina, 1 aspartat, 1 CO₂ i 2 formiats. Els enzims implicats en aquesta ruta, estan organitzats en un metaboló anomenat purinosoma. Un metaboló és un complex supramolecular d'enzims metabòlics seqüencials i elements cel·lulars estructurals que afavoreix l'eficiència d'una ruta metabòlica. S'ha proposat el fet que la formació del purinosoma sigui un procés reversible, depenent de les condicions extracel·lulars, fet que el posiciona com a diana en malalties del metabolisme o el càncer (Pedley and Benkovic 2017).

2.1.1.2 Síntesi de *novo* de les pirimidines

La síntesi de *novo* de les pirimidines és un procés seqüencial de sis passos catalitzats per tres enzims, dos d'ells multifuncionals. Les tres primeres reaccions estan catalitzades per l'enzim citoplasmàtic CAD, les activitats enzimàtiques d'aquest són la carbamoil fosfat sintetasa II (CPSII), l'aspartat transcarbamilasa (ATC) i la dihidroorotasa (DHOasa), els quals acaben generant dihidroorotat. El següent pas té lloc a la membrana mitocondrial interna per la dihidroorotat deshidrogenasa (DHODH), la qual genera orotat. Els dos darrers passos estan catalitzats per la UMPS (uridina monofosfat sintetasa), catalitzant el pas a uridina monofosfat (UMP) (Figura 7) (Chitrakar et al. 2017).

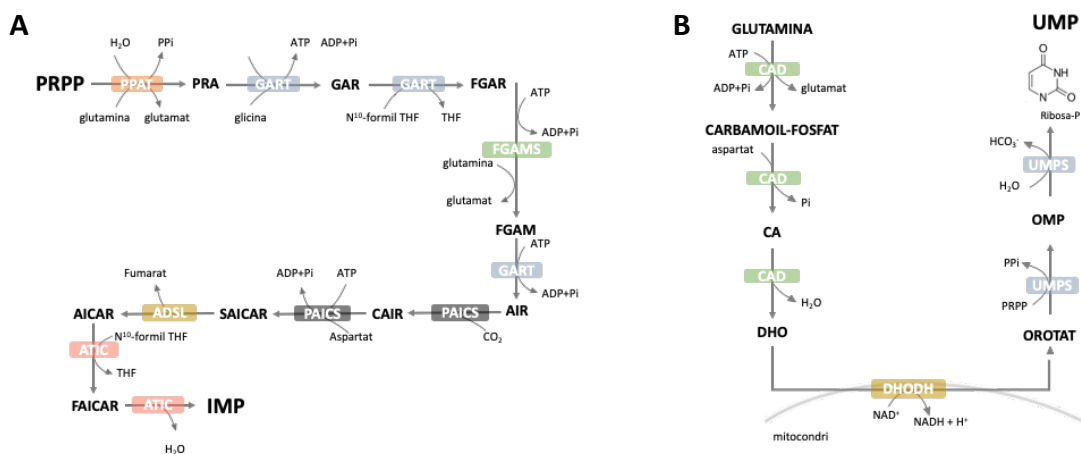


Figura 7. Vies de síntesi *de novo* dels nucleòsids. Via de síntesi de les purines (A). Vies de síntesi *de novo* de les pirimidines (B).

2.1.2 Vies de recuperació de nucleòtids

Les vies de recuperació de nucleòtids suposen un estalvi energètic a la cèl·lula en comparació amb les vies de síntesi de *novo*. Aquestes, recuperen nucleòsids i bases lliures procedents de la degradació del material cel·lular, o bé dels que provenen de la dieta i es reutilitzen per a sintetitzar nous nucleòtids (Lane and Fan 2015).

Aquestes vies consisteixen bàsicament en transferir a la nucleobase reciclada la PRPP per a formar de nou un nucleòsid monofosfat (NMP). Els enzims que poden catalitzar aquesta reacció són la hipoxantina guanosina fosforibosil transferasa (HGPRT) i l'adenina fosforibosil transferasa (APRT) per a les purines. Per a reciclar les pirimidines, són necessàries diverses quinases específiques com la desoxicitidina quinasa (dCK), o la timidina quinasa (TK) (Figura 8). Degut a la naturalesa hidrofílica dels nucleòsids, són essencials els transportadors de nucleòsids (NT). Aquests són proteïnes integrals de membrana que faciliten l'entrada de nucleòsids i nucleobases a la cèl·lula (Molina-Arcas, Casado and Pastor-Anglada 2009, Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015).

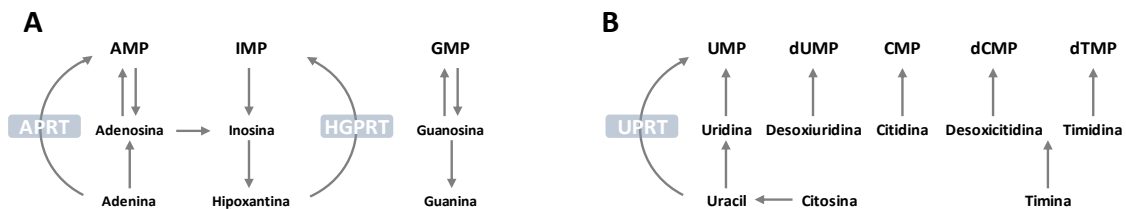


Figura 8. Principals vies de recuperació de nucleòsids. Vies de recuperació de les purines (A) i de les pirimidines (B).

Per tal de mantenir l'homeòstasi dels nucleòsids i nucleòtids, cal tenir en compte també les vies de degradació, les quals també són diferents entre purines i pirimidines. Pel que fa a les purines, són necessàries tres reaccions per a desunir el fosfat i la pentosa de la base, la qual serà oxidada a àcid úric i aquest excretat per l'orina (Maiuolo et al. 2016). Les pirimidines en canvi, poden ser degradades totalment, essent els elements de degradació reaprofitats entrant al cicle de Krebs (Wasternack 1980).

3. Transportadors de nucleòsids

El transportoma està configurat per un conjunt de proteïnes de membrana relacionades amb el transport de molècules de diferent naturalesa. Està compost per membres de la família ATP Binding cassette (ABC), aquaporines, canals iònics i la superfamília dels Solute Carrier (SLC) entre altres. Aquesta darrera codifica per un gran nombre de transportadors de membrana, codificats per més de 400 gens (Hediger et al. 2013). Entre ells, hi ha els transportadors de nucleòsids (NT). Aquests transporten nucleòsids i nucleobases així com els seus anàlegs, els quals s'utilitzen en teràpia oncològica, contra infeccions virals o en malalties inflamatòries (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). Aquests transportadors són, en molts casos, els determinants de la bioassequibilitat dels anàlegs de nucleòsids emprats com a fàrmacs en el tractament de diversos tumors com els de pàncrees i malalties limfoproliferatives diverses. Així doncs, un canvi en el patró d'expressió d'aquests pot condicionar l'aparició de quimioresistència a fàrmacs anàlegs de nucleòsids (Pastor-Anglada and Pérez-Torras 2015). Els transportadors de nucleòsids pertanyen a dos grans famílies gèniques: els *SLC28* i els *SLC29*. La primera filogenèticament més antiga, distribuïnt-se en organismes procariotes i eucariotes, mentre que la segona només es troba a organismes eucariotes (Young et al. 2013). La família gènica *SLC28* codifica per als transportadors concentratius de nucleòsids o hCNTs (*human Concentrative Nucleoside Transporters*) que es caracteritzen per ser transportadors unidireccionals, d'alta afinitat però de selectivitat restringida. La família *SLC29* codifica per als transportadors equilibratius de nucleòsids o hENTs (*human Equilibrative Nucleoside Transporters*), aquests tenen menys afinitat però una selectivitat més àmplia pel seu substrat (Pastor-Anglada et al. 2008, Pastor-Anglada et al. 2009, Young et al. 2013, Molina-Arcas et al. 2009)

3.1 Transportadors concentratius de nucleòsids (*SLC28*)

La família gènica *SLC28* codifica per a tres proteïnes hCNT1 (*SLC28A1*), hCNT2 (*SLC28A2*) i hCNT3 (*SLC28A3*) (Figura 9). Tal i com indica el seu nom, aquests transportadors mitjancen un transport unidireccional i concentratiu depenent de sodi a través de la membrana plasmàtica el qual requereix una despesa energètica indirecta.

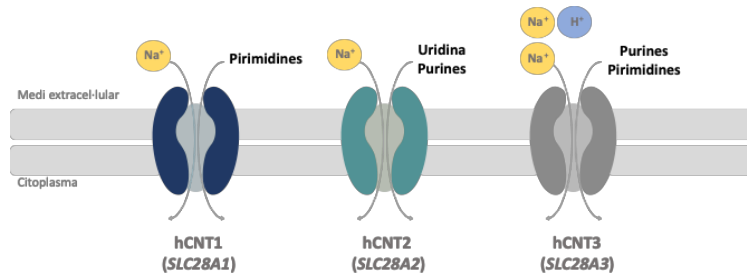


Figura 9. Representació esquemàtica dels transportadors concentratius de nucleòsids en humans (hCNTs). Representació dels tres membres de la família SLC28: hCNT1, hCNT2 i hCNT3 i de la seva selectivitat de substrat.

Es caracteritzen per una alta afinitat pel seu substrat, presentant unes K_M (constant de Michaelis-Menten) al rang micromolar (10-100 μ M) (Pastor-Anglada, Urtasun and Perez-Torras 2018). Els tres membres difereixen en quan a la selectivitat de substrat (Taula 2). El transportador hCNT1 transporta exclusivament pirimidines, encara que pot unir, però no transportar, adenosina (Larrayoz et al. 2004). Per altra banda, hCNT2 transporta específicament purines i uridina. El darrer membre de la família, hCNT3, pot transportar tant purines com pirimidines (Taula 2) (Pastor-Anglada et al. 2018). A més de diferenciar-se per la seva selectivitat de substrat, els tres membres de la família, també difereixen en quant a l'estequiometria necessària per al seu co-transport amb l'ió sodi. En aquest cas els transportadors hCNT1 i hCNT2 necessiten un ió sodi per cada nucleòsid translocat, és a dir tenen una estequiometria equimolar 1:1. En quant a hCNT3, són necessaris dos ions de sodi pel transport. Aquesta relació 2:1 aporta una major capacitat de translocar nucleòsids en contra de gradient (Taula 2). A més, aquest transportador pot mediar el transport acoblat a protons amb estequiometria 1:1 (Smith et al. 2005).

Transportador	Gen	Substrat (Km)	Estequiometria Na:Nucleòsid
hCNT1	<i>SLC28A1</i>	Uridina (30 µM) Timidina (26 µM) Citidina (29 µM)	1:1
hCNT2	<i>SLC28A2</i>	Inosina (4 µM) Adenosina (8 µM) Uridina (40 µM) Guanosina (21 µM)	1:1
hCNT3	<i>SLC28A3</i>	Uridina (22 µM) Timidina (21 µM) Citidina (15 µM) Inosina (52 µM) Adenosina (15 µM) Guanosina (43 µM)	2:1

Taula 2. Estequiometria i selectivitat dels transportadors concentratius de nucleòsids. Adaptada de Pastor-Anglada et al. 2018.

3.1.1 Estructura dels transportadors concentratius de nucleòsids

Les proteïnes hCNT1, hCNT2 i hCNT3 estan formades per 649, 659 i 691 aminoàcids respectivament (Pastor-Anglada et al. 2008). La seva estructura predita inicialment consistia en 13 dominis transmembrana amb un extrem N-Terminal llarg intracel·lular i un C-Terminal extracel·lular (Hamilton et al. 2001). Però l'any 2012, amb la cristal·lització de l'ortòleg procariota de *Vibrio cholerae* (vcCNT), es va determinar que l'estructura dels hCNTs consistia realment en 11 dominis transmembrana enlloc dels 13 predits anteriorment (Johnson, Cheong and Lee 2012). D'aquest estudi també es va despendre que els organismes eucariotes haurien incorporat una cua aminoterminal junt amb tres dominis transmembrana comparat amb el seu ortòleg vcCNT (

Figura 10). Així doncs, el domini TM1 a vcCNT es correspondria al domini TM4 en humans (Mulinta et al. 2017). Aquesta adquisició podria estar dotant als hCNTs d'altres funcions més enllà de la de transport, ja que, en un estudi amb una versió d'hCNT1 truncat al qual li manquen la cua N-Terminal i els tres primers dominis transmembrana, seguia mantenint la seva capacitat transportadora (Hamilton et al. 2001). Pel que fa a l'extrem C-Terminal, s'hi troben diversos elements glicosilables, els quals poden modular la seva activitat i localització (Pastor-Anglada et al. 2008).

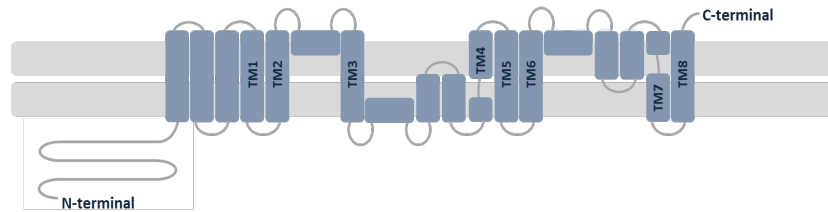


Figura 10. Estructura predita per als transportadors concentratius de nucleòsids (hCNTs) per homologia amb vcCNT. Adaptada de Mulinta et al; 2017.

Segons l'estudi de Johnson et al., també es va aportar informació referent a l'oligomerització dels transportadors, ja que vcCNT es va cristal·litzar com a homotrímer. Els dominis proposats com a responsables d'aquesta oligomerització estan conservats en els hCNTs, per tant, es va suggerir que els transportadors en humans també podien oligomeritzar (Johnson et al. 2012), fet que s'ha demostrat experimentalment per l'altre família de transportadors (Grane-Boladeras et al. 2019).

3.2 Transportadors equilibratius de nucleòsids (SLC29)

La família gènica *SLC29* està formada per quatre membres hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4 (*SLC29A1-4*) essent els dos primers els més estudiats i millor caracteritzats (Molina-Arcas et al. 2009). Tots els membres, excepte hENT4, transporten nucleòsids i els seus anàlegs de manera bidireccional i a favor de gradient (Figura 11). Poden transportar tant purines com pirimidines, però amb menys afinitat que els hCNTs (Baldwin et al. 2004, Yao et al. 2011, Young et al. 2013). hENT1 i hENT2 es localitzen a la membrana plasmàtica. Tenen una especificitat de substrat similar, encara que hENT2 pot translocar nucleobases amb més facilitat que hENT1, el qual només podria amb una eficiència molt baixa (Taula 3). El tret més diferencial, però, entre els dos transportadors és la seva sensibilitat a l'inhibidor NBTI (nitrobenziltionosina), anàleg de l'adenosina. hENT1 és molt més sensible a la inhibició per NBTI, amb una K_i al rang nanomolar, mentre que hENT2 presenta una K_i superior a $10\mu\text{M}$ (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). Ambdós transportadors poden ser inhibits pels vasodilatadors dipiridamol i dilazep, essent hENT1 de nou més sensible que hENT2 (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015).

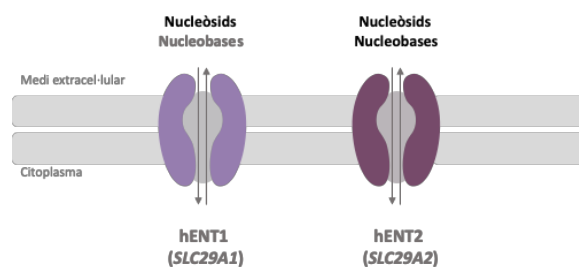


Figura 11. Representació esquemàtica dels transportadors equilibratius de nucleòsids en humans hENT1 i hENT2. Representació dels dos membres de la família *SLC29*: hENT1 i hENT2 i de la seva selectivitat de substrat.

El transportador hENT3, a diferència dels primers dos membres de la família, es localitza a la membrana lisosomal i mitocondrial. A més de transportar purines i pirimidines, és capaç de translocar adenina. El transport que mitjança hENT3 està fortament associat a pH àcid, suggerint per tant, que aquest pot estar acoblat a protons. Possiblement, la funció d'hENT3 estaria associada a l'alliberament de nucleòsids i nucleobases provinents de la hidròlisi dels àcids nucleics a l'interior lisosomal (Baldwin et al. 2004).

El darrer membre de la família, hENT4, no es podria considerar com un transportador de nucleòsids canònic, ja que transporta principalment cations orgànics, encara que a pH àcid podria transportar adenosina (Barnes et al. 2006). Aquest transportador és també conegut com PMAT (*Plasma Membrane Monoamine Transporter*) (Baldwin et al. 2004).

Transportador	Gen	Substrat (Km)
hENT1	<i>SLC29A1</i>	Uridina (260 µM)
		Timidina (300 µM)
		Citidina (580 µM)
		Inosina (170 µM)
		Adenosina (40 µM)
		Guanosina (140 µM)
		Nucleobases (mM)
hENT2	<i>SLC29A2</i>	Uridina (250 µM)
		Timidina (710 µM)
		Citidina (5.6 mM)
		Inosina (50 µM)
		Adenosina (100 µM)
		Guanosina (2.7 mM)
		Nucleobases (mM)
hENT3	<i>SLC29A3</i>	Uridina (2 mM) Adenosina (1.9 µM)
hENT4	<i>SLC2A4</i>	Adenosina (780 µM)

Taula 3. Transportadors equilibratius de nucleòsids, els seus substrats i les seves constants d'afinitat. Adaptada de Pastor-Anglada et al. 2018.

3.2.1 Estructura dels transportadors equilibratius de nucleòsids

Els transportadors equilibratius hENT1 i hENT2 estan formats per 456 aminoàcids. La seva estructura predita a través d'aproximacions *in silico* i diversos assajos de mutagènesi dirigida consta d'onze dominis transmembrana. Recentment s'ha publicat la cristal·lització del transportador hENT1 per Wright i Lee. Aquesta cristal·lització confirma l'estructura de monòmer d'onze dominis transmembrana amb una cua C-Terminal extracel·lular i un domini N-Terminal intracel·lular (Wright and Lee 2019). Aquest treball demostra una pseudo-simetria entre els TM1-6 i el TM7-11, els quals estan units mitjançant regions hidrofíliques curtes, excepte en els dominis transmembrana 1-2 i 6-7, els quals s'uneixen per unes regions més llargues formant uns loops extra- i intra-cel·lulars respectivament (Figura 12) (Young et al. 2008).

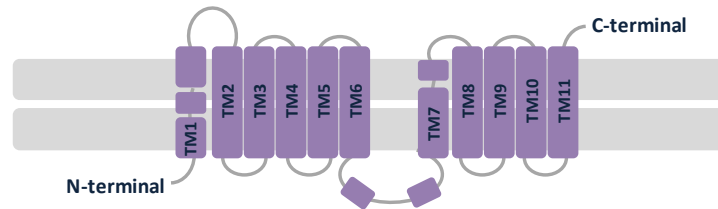


Figura 12. Estructura del transportador equilibratiu de nucleòsids hENT1 Adaptada de Wright and Lee; 2019.

3.3 Distribució tissular i expressió dels transportadors de nucleòsids

Considerant la importància dels hCNTs i hENTs per a l'homeòstasi dels nucleòsids, la seva distribució n'és un factor determinant. Pel que fa als transportadors equilibratius es considera que tenen una distribució ubiqua amb certa variabilitat entre teixits. hENT1 s'expressa de manera elevada a diversos teixits com la placenta, el sistema nerviós central, el fetge, el còlon, l'endoteli vascular o els eritròcits. hENT2 es troba, a més, a placenta, pàncrees, pròstata, tim, ronyó i múscul esquelètic, essent el darrer el que més expressió presenta (Molina-Arcas et al. 2009).

L'expressió dels transportadors concentratius s'havia considerat en un inici exclusiva d'epitelis absortius i reabsortius, expressant-se així en teixits com l'intestí, el ronyó o el fetge, on hCNT1 té una expressió comparativament elevada. Actualment però, es considera que els hCNTs tenen una expressió més àmplia. Per altra banda, hCNT2 s'expressa en teixits com el sistema nerviós central, el sistema immunitari (amb expressió força variable), el múscul cardíac i esquelètic, el pàncrees i la placenta. En

quant a hCNT3 també s'ha detectat a cervell, pàncrees, tràquea, macròfags i monòcits, moll de l'os, i de manera abundant a la glàndula mamària. Tanmateix, si es té en compte l'activitat concentrativa de manera conjunta, tal i com inicialment es creia, es detecta majoritàriament a epitelis (re)absortius (Molina-Arcas et al. 2009, Young et al. 2013).

La localització i distribució subcel·lular dels transportadors, en els teixits que hi ha co-expressió de les dues famílies gèniques, pot determinar un flux vectorial dels nucleòsids que afavoreix l'absorció d'aquests. La distribució dels transportadors ha estat ampliament estudiada en teixits epitelials com el fetge, el ronyó o l'intestí entre d'altres. L'expressió dels transportadors concentratius en epitelis polaritzats es localitzen majoritàriament a la membrana apical (Errasti-Murugarren, Pastor-Anglada and Casado 2007), mentre que, els hENTs es troben principalment a la membrana basolateral, encara que en teixits com el ronyó, s'ha detectat hENT1 a la membrana apical (Mangravite, Badagnani and Giacomini 2003). Tant els hCNTs com els hENTs s'han detectat a compartiments intracel·lulars, en menor mesura. hENT1 s'ha detectat a mitocondri, lisosomes, reticle o membrana nuclear. En el cas dels concentratius, s'ha descrit una variant d'hCNT3 que es troba a reticle endoplasmàtic (Pastor-Anglada et al. 2008, Errasti-Murugarren et al. 2009). La direccionalitat del flux de nucleòtids ve determinada per la distribució asimètrica dels transportadors hCNTs i hENTs. A més, gràcies a la seva disposició, hCNTs a la regió apical i hENTs a la regió basolateral, i a la diferència d'afinitat d'aquests el flux es produeix cap als vasos sanguinis. Per un teixit absortiu com l'intestí prim, aquesta distribució és important per la recuperació dels nucleòsids de la dieta. Els tres transportadors concentratius es troben a la membrana apical dels enteròcits, mentre que els dos equilibratius es localitzen a la membrana basolateral (Figura 14). A més, a l'intestí aquest flux es defineix també segons l'estat de diferenciació de les cèl·lules, és a dir, els hCNTs són més abundants als enteròcits, mentre que els hENTs són més abundants a les cèl·lules de la cripta (les quals estan menys diferenciades). En aquest context, els hCNTs s'associen a enteròcits més diferenciats, mentre que els hENTs s'associen a proliferació (Pastor-Anglada et al. 2018). Això s'observa en l'estudi de l'expressió dels transportadors en cèl·lules individuals a l'intestí prim de ratolins. Segons dades extretes del portal web *Single Cell Portal* procedents d'una anàlisi amb més de 53.193 cèl·lules epitelials individuals obtingudes

d'intestí prim i d'organoides de ratolí han mostrat un perfil d'expressió diferent per a cada membre. Pel que fa als transportadors concentratius, CNT1 mostra una presència molt restringida a alguns tipus cel·lulars concrets, mentre que els altres dos membres CNT2 i CNT3 tenen una distribució més àmplia. L'expressió d'CNT1 es limita als enteròcits, sobretot als més madurs i proximals, (Figura 13). Pel que fa a CNT3, és curiós el fet que la seva distribució és similar a la d'ENT1, ambdós transportadors essent més abundants a enteròcits progenitors. Encara que CNT3 es troba també de manera força substancial a enteròcits progenitors tardans, mentre que ENT1 es troba només a enteròcits progenitors primerencs (Figura 13). Pels equilibratius, la seva distribució és també més ubiqua, encara que ENT2 amb menys expressió (Figura 13). Aquest estudi demostra doncs que CNT1 és el transportador que està més associat a diferenciació, mentre que els equilibratius ho estan a proliferació.

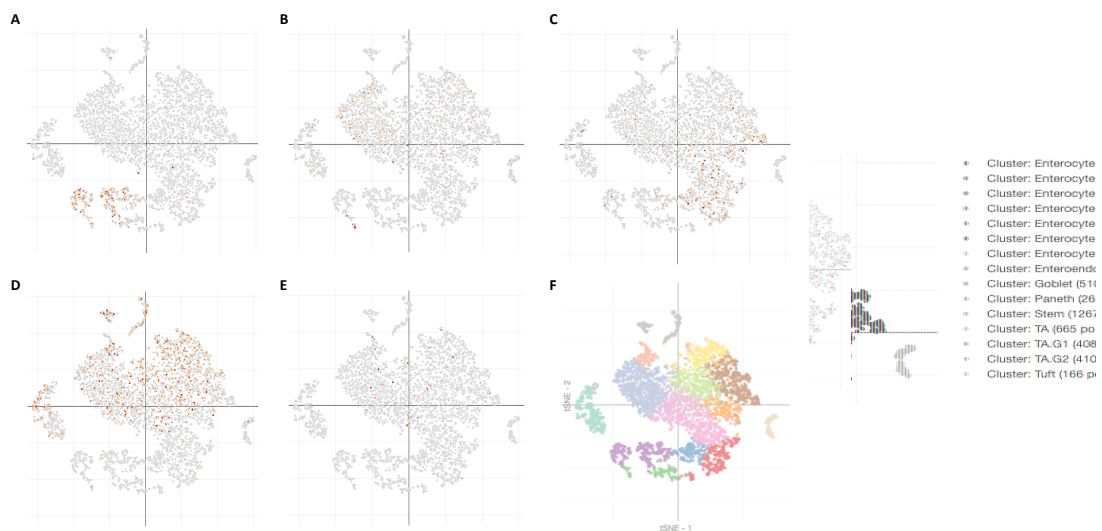


Figura 13. Distribució cel·lular dels transportadors de nucleòsids en l'intestí prim de ratolí. Expressió d'hCNT1 (A) i hENT1 (B) distribució dels clústers cel·lulars (C). Imatges extremitats de *Single Cell Portal. Small intestinal epithelium*.

Al ronyó, els tres transportadors concentratius s'han detectat al túbul contornejat distal i proximal, responsables de l'absorció junt amb ENT1, mentre que ENT2 s'ha detectat a la membrana basal. Els dos equilibratius predominen a la regió distal del túbul de la nefrona (Figura 14) (Young et al. 2013, Errasti-Murugarren, Casado and Pastor-Anglada 2010, Errasti-Murugarren et al. 2007).

La distribució al fetge és més complexa, considerant que és un dels òrgans que contribueix a la síntesi *de novo* dels nucleòtids. Pel que fa als transportadors concentratius, hCNT1 i hCNT2 s'expressen de manera abundant, mentre que hCNT3 s'expressa molt feblement. En quant a la distribució, en aquest cas, s'ha de diferenciar la membrana basal (sinusoïdal) i la membrana apical (canalicular). La membrana canalicular s'encarrega de l'absorció dels nucleòtids a l'interior de l'hepatòcit, per part d'hCNT1 i hCNT2, a més de la reabsorció canalicular de nucleòtids. Mentre que hENT1 també present a aquesta membrana, regularia l'absorció o excreció dels nucleòtids en funció de la seva concentració a l'hepatòcit. Per altra banda, la membrana sinusoïdal s'encarrega de la sortida dels nucleòtids provinents de la síntesi *de novo* generada a aquest teixit, mitjançant hENT1 i hENT2 i de l'absorció de nucleòtids portals en estat absortiu. A més els hENTs podrien estar també facilitant la captació de nucleobases. També s'hi ha detectat els concentratius hCNT1 i hCNT2, els quals podrien ser els responsables de la recaptació de nucleòtids fisiològics (Figura 14) (Govindarajan et al. 2009, Young et al. 2013).

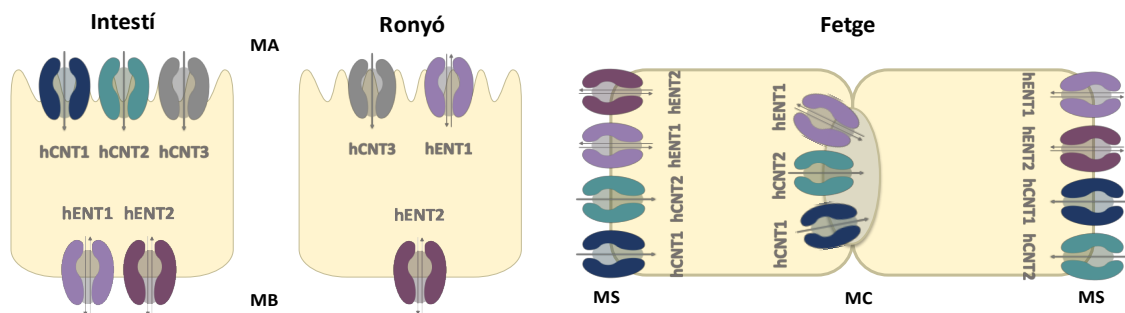


Figura 14. Representació de la distribució subcel·lular dels transportadors de nucleòtids. MB: Membrana Basolateral. MA: Membrana Apical. MS: Membrana Sinusoïdal. MC: Membrana Canicular. Adaptat d'Errasti-Murugarren et al. 2010

Pel que fa al cervell, els transportadors de nucleòtids juguen un paper important degut a la baixa capacitat d'aquest òrgan de realitzar síntesi *de novo* de purines i pirimidines, així doncs, les vies de recuperació, i en conseqüència els transportadors de nucleòtids, són responsables de l'homeòstasi dels nucleòtids i nucleobases a aquest teixit (Parkinson et al. 2011).

3.4 Els transportadors de nucleòsids com a transceptors

La distribució aparentment redundant dels transportadors de nucleòsids en alguns teixits, així com l'adquisició del domini N-Terminal dels transportadors concentratius de nucleòsids en cèl·lules eucariotes, va suggerir la possibilitat que els transportadors tinguessin funcions alternatives a la del transport. D'aquest estudi es va desprendre el fet que hCNT1 fos descrit com a transceptor. Tal i com la paraula indica, un transceptor és un transportador el qual té funcions de receptor més enllà de la de transport (Figura 15) (Pérez-Torras et al. 2013).

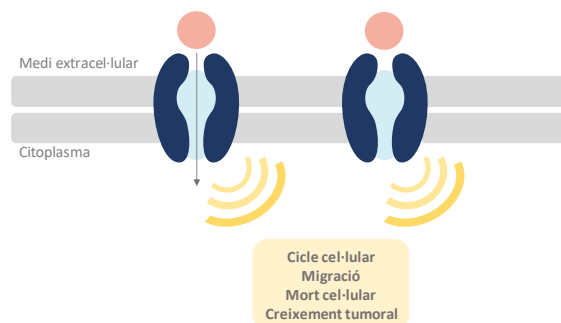


Figura 15. hCNT1 com a transceptor. hCNT1 intervé en la senyalització cel·lular relacionada amb el cicle cel·lular, la migració, la mort cel·lular i el creixement tumoral. Adaptada de Pastor-Anglada, Perez-Torras 2018

L'activitat transceptora d'hCNT1 ve determinada perquè la restitució d'aquest en cèl·lules tumorals promou l'alteració de la fosforilació de diverses quinases com Akt o la hiperactivació de PARP, fets que s'associen a la reducció de la migració cel·lular, la inhibició de la progressió del cicle cel·lular i la inducció de la mort cel·lular. Tots aquests efectes s'han demostrat *in vitro* amb la restitució d'hCNT1 i d'una variant (hCNT1S546P), la qual no té activitat transportadora (Pérez-Torras et al. 2013). S'ha demostrat a més, que la restitució d'hCNT1 redueix el creixement tumoral en ratolins amb tumors xenografts de cèl·lules humanes derivades d'adenocarcinoma pancreàtic (Pérez-Torras et al. 2013).

Els altres dos membres de la família *SLC28* encara no han estat descrits com a transceptors, però hi ha la possibilitat que també tinguin funcions complementàries a la del transport. En el cas d'hCNT2, l'estudi del seu interactoma mostra dues proteïnes relacionades amb el metabolisme energètic que podrien estar dotant a hCNT2 de funcions de transceptor. L'aldolasa B i la GRP58 (*Glucose-Regulated Protein 58*) són proteïnes d'interacció d'hCNT2, que interactuant a través de la cua N-Terminal d'aquest

li conferirien funcions reguladores segons l'assequibilitat de nutrients (Huber-Ruano et al. 2010).

3.5 Implicació clínica dels transportadors de nucleòsids

3.5.1 Patologies associades als transportadors de nucleòsids

Els transportadors de nucleòsids són els responsables, junt amb les vies de síntesi de *novo* i recuperació, de l'homeòstasi dels nucleòsids i nucleobases a les cèl·lules dels diferents teixits. A més, com ja s'ha comentat anteriorment, el transportador hCNT1, descrit com a transceptor té altres funcions les quals afecten la biologia cel·lular. Una alteració del perfil d'expressió dels transportadors, podria afectar la cèl·lula i fins i tot donar lloc a un perfil patològic o tumoral. Fins al moment, l'únic transportador relacionat directament amb una patologia havia estat hENT3, el qual es relaciona amb la síndrome H, una malaltia dermatològica hereditària autosòmica recessiva, la qual és deguda a diverses mutacions a la regió codificant del gen *SLC29A3*. Altres variants d'aquest gen també han estat relacionades amb diverses síndromes com la diabetis mellitus no autoimmune dependent d'insulina (PHID) (Cliffe et al. 2009). Recentment, s'ha descrit per primera vegada la implicació del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 amb una patologia. Dues mutacions del transportador hCNT1 són les responsables de l'uridina-citidinúria detectada en un nadó, el qual també presentava una deficiència en la perforina-1. Dues alteracions que conjuntament haurien causat la severa patologia del pacient i la seva defunció a les 9 setmanes de vida (Pérez-Torras et al. 2019).

3.5.1 Alteració de l'expressió de NTs en cèl·lules tumorals

Durant el procés carcinogènic es donen diverses alteracions cel·lulars que determinen el fenotip tumoral. Com ja s'ha comentat, la carcinogènesi està determinada per les anomenades característiques diferencials del càncer. Una d'elles és l'alteració del cicle cel·lular i la proliferació cel·lular, la qual està incrementada en càncer. En aquest cas, els transportadors equilibratius estan associats a fenotips més proliferatius i serien els responsables de l'abastiment de nucleòsids d'aquestes cèl·lules. Per altra banda, l'expressió dels hCNTs està relacionada amb teixits més diferenciats (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). A més, s'ha observat una pèrdua d'expressió dels

transportadors concentratius en diversos tumors com el ginecològic, l'hepatocarcinoma, el càncer de mama, l'adenocarcinoma ductal pancreàtic i el colangiocarcinoma (Farre et al. 2004, Gloeckner-Hofmann et al. 2006, Lane et al. 2010, Bhutia et al. 2011, Urtasun et al. 2017, Martinez-Becerra et al. 2012). La pèrdua dels transportadors de nucleòsids durant el desenvolupament tumoral podria estar afectant a diversos processos cel·lulars a més del subministrament de nucleòsids, ja que l'activitat d'hCNT1 com a transceptor també es veuria alterada en aquests tumors (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). Un fet important és que molts fàrmacs emprats en teràpia oncològica són anàlegs de nucleòsids, i per tant, són internalitzats per aquests transportadors. Una pèrdua d'expressió d'aquests, doncs, suposaria alhora una resistència a aquests fàrmacs.

3.5.2 Paper farmacològic dels transportadors de nucleòsids

Els transportadors de nucleòsids tenen un paper important en la bioassequibilitat dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids ja que són els responsables d'internalitzar-los a la cèl·lula. Els fàrmacs anàlegs de nucleòsids són compostos sintètics amb modificacions químiques que mimetitzen els nucleòsids naturals. La seva funció és incorporar-se al DNA i inhibir la divisió cel·lular (Jordheim et al. 2013). Aquests s'utilitzen per tractaments oncològics de tumors sòlids, malalties limfoproliferatives, infeccions virals i malalties inflamatòries com la de Crohn (Minuesa et al. 2011, Jordheim et al. 2013, Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). El mecanisme d'acció d'aquests fàrmacs es basa en l'entrada a la cèl·lula a través dels transportadors de nucleòsids, i igual que els nucleòsids, són convertits en aquest cas a anàlegs de nucleòtids per part dels enzims del metabolisme de purines i pirimidines. Tot seguit, aquests es poden incorporar al DNA i degut a les seves modificacions, provocar l'aturada de la síntesi de DNA, o generar-hi un dany, el qual induirà l'apoptosi (Parker 2009).

Els anàlegs de nucleòsids són uns dels fàrmacs més utilitzats en teràpia oncològica. En el cas dels tumors sòlids, són més eficaços els anàlegs de pirimidines, mentre que per a càncers hematològics es solen utilitzar anàlegs de purines (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015) (Taula 4).

Així, al ser determinants en la bioassequibilitat dels fàrmacs, cal destacar també el possible rol dels transportadors de nucleòsids com a biomarcadors en teràpia. El canvi de perfil d'expressió d'aquests durant la carcinogènesi o fins i tot la heterogeneïtat entre individus podria determinar l'eficiència d'aquestes teràpies. Per exemple, estudis *in vitro* suggereixen que hENT1 té un paper important en l'acció de la gemcitabina (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). La sobreexpressió d'aquest potencia l'acció d'aquest fàrmac en el tractament del càncer de pàncrees, mentre que la falta d'expressió d'hENT1 es relaciona amb un increment de la resistència a aquest fàrmac (Perez-Torras et al. 2008, Mori et al. 2007). La modulació dels transportadors podria per tant afectar l'acció d'aquests fàrmacs.

Tipus de tumor	Fàrmac	Anàleg	Transportador	Referència
Malalties limfoproliferatives	Mercaptopurina	Purina	hCNT3, hENT1, hENT2	Fotoohi et al. (2006), Yao et al. (2011)
	Citarabina	Pirimidina	hCNT1, hENT1, hENT2	Smith et al. (2004), Clarke et al. (2006)
	Fludarabina	Purina	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2	King et al. (2006)
	Pentostatina	Purina	hENT1, hENT2	Wiley et al. (1991)
	Cladribina	Purina	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2	King et al. (2006)
	Azacitidina	Pirimidina	hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2, hENT3, hENT4	Rius et al. (2009), Damaraju et al. (2012)
	Clofarabina	Purina	hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2	King et al. (2006)
	Nelarabina (AraG)	Purina	hENT1, hENT2	(Prus et al., 1990)
Tumors sòlids	Decitabina	Pirimidina	hENT1, hENT2	Damaraju et al. (2012), Arimany-Nardi et al. (2014)
	Floxuridina	Pirimidina	hCNT1, hCNT2, hCNT3	Lang et al. (2001), Smith et al. (2004), Hu et al. (2006)
	Gemcitabina	Pirimidina	hCNT1, hCNT3, hENT1, hENT2, hENT3	Mackey et al. (1999), Hu et al. (2006), Govindarajan et al. (2009)
	Capecitabina (5-DFUR)	Pirimidina	hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2	(Lang et al., 2001; Mata et al., 2001; Molina-Arcas et al., 2006; Errasti-Murugarren et al., 2007)
	5-Fluorouracil	Pirimidina	hENT1, hENT2, hOAT2	Kobayashi et al. (2005), Yao et al. (2011)

Taula 4. Fàrmacs anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpia oncològica. Adaptada de Pastor-Anglada i Pérez-Torras 2015.

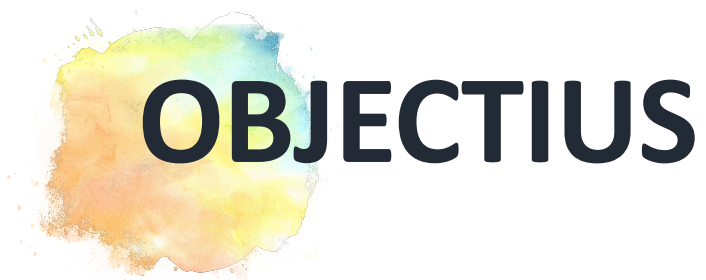
3.6 Regulació dels transportadors de nucleòsids

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la regulació dels transportadors de nucleòsids és molt important. Aquesta regulació es pot donar a diferents nivells. Pel que fa a hCNT1, s'ha vist que està regulat pel cicle cel·lular, acumulant-se la seva expressió en fase S. A més, en estudis realitzats en rata, s'ha observat que tant la dieta com el dejuni poden afectar l'expressió de CNT1 (Valdes, Casado and Pastor-Anglada 2002). A nivell transcripcional, diversos factors poden influir en els transportadors, ho fan per exemple els factors TNF α i interleucina-6 (IL-6) regulant l'expressió del gen *SLC28A1* (Fernandez-

Veledo et al. 2004). A nivell d'estudi de promotor s'ha demostrat que HNF4 α és un factor que regula l'expressió d'hCNT1 (Fernandez-Veledo et al. 2007, Klein et al. 2009). En aquest sentit, s'està treballant dins el grup en la possible regulació dels promotors de *SLC28A1* i *SLC28A2* per altres factors de transcripció. La relació d'alguns ja s'ha demostrat en el marc de la tesi doctoral de la Dra. Aida Mata-Ventosa. Pel que fa a la regulació de CNT2, models d'hepatoma de rata mostren una implicació del factor TGF β i IFN α en l'augment de la seva expressió (Valdes et al. 2006, Pinilla-Macua et al. 2014). En aquest cas, la hipòxia també estaria afectant l'expressió de CNT2 tant *in vitro* com *in vivo* (Medina-Pulido et al. 2013). En quant als transportadors equilibratius, també s'ha determinat la relació d'hENT1 i hENT2 amb el cicle cel·lular (Valdes et al. 2002, Baldwin et al. 2004, Grane-Boladeras et al. 2016). Existeix una relació d'aquests transportadors també per part de diversos factors com EGF i TNF α , els quals s'ha descrit que en models de rata poden incrementar l'expressió dels transportadors equilibratius (Aymerich, Pastor-Anglada and Casado 2004).

A nivell post-traducciona, s'ha descrit, que per molts transportadors de membrana, les glicosilacions són importants. En el cas d'hENT1 i hENT2 i d'hCNT1, s'ha demostrat que aquestes serien fonamentals per l'activitat de transport (Grane-Boladeras et al. 2019, Pérez-Torras et al. 2019).

Tanmateix els mecanismes de regulació dels transportadors són molt poc coneguts, especialment aquells que condicionen alteracions de la seva expressió en patologia. La més que probable regulació epigenètica d'aquests transportadors és totalment desconeguda.



OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

El perfil d'expressió dels transportadors de nucleòsids té un paper clau en la regulació dels nivells fisiològics dels nucleòsids. La seva desregulació, per tant, pot modificar els nivells intracel·lulars dels nucleòsids i originar alteracions patològiques. De fet, modificacions en els nivells de nucleòsids han estat directament associades amb el procés carcinogènic. A més, la bioassequibilitat de fàrmacs anàlegs de nucleòsids utilitzats en teràpia oncològica també estarà condicionada per l'expressió relativa dels transportadors de nucleòsids. Per altra banda, hCNT1 ha estat identificat com un transceptor amb funcions addicionals rellevants en la progressió tumoral, mentre que algunes evidències suggereixen que hCNT2 podria estar contribuint a la regulació del metabolisme energètic. Així, la pèrdua d'expressió d'hCNT1 i hCNT2 en alguns tipus de tumors, junt amb els antecedents que els vinculen amb el procés carcinogènic fan que l'estudi dels mecanismes que podrien estar regulant la seva expressió sigui de gran rellevància. Encara que aquests mecanismes són poc coneguts, sembla força probable que les modificacions epigenètiques en puguin estar afectant directament la seva expressió. Una possibilitat és que els miRNAs, que sovint es troben desregulats en càncer puguin estar contribuint a aquesta regulació.

La hipòtesi de treball és que els miRNAs poden influir en l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1 i hCNT2. Concretament, poden ser els responsables de la pèrdua de la seva expressió en el procés carcinogènic.

L'objectiu del treball es centra en avaluar l'expressió de diversos miRNAs que podrien estar alterats en càncer de còlon, pàncrees i hepatocarcinoma per validar l'associació d'aquests amb la pèrdua d'expressió d'hCNT1 i hCNT2 en aquests tipus de tumors. Per tal d'observar, en un futur, com aquest fet afecta a l'aparició del fenotip tumoral, així com poder definir noves dianes terapèutiques per a millorar les teràpies actuals del càncer colorectal, l'adenocarcinoma pancreàtic i l'hepatocarcinoma. Els objectius concrets del projecte són:

1. Determinar *in silico* els miRNA candidats a regular l'expressió de les proteïnes hCNT1 i hCNT2 en càncer colorectal, adenocarcinoma ductal pancreàtic i hepatocarcinoma.

2. Avaluar l'expressió dels miRNAs i dels transportadors hCNT1 i hCNT2 en línies cel·lulars tumorals humanes i en mostres aparellades de teixit sà i tumoral en tumors colorectals, pancreàtics i hepatocarcinoma.
3. Validar la implicació dels miRNAs candidats en la pèrdua d'expressió dels transportadors.
4. Analitzar l'efecte de la restitució dels transportadors, mitjançant la modulació dels miRNAs candidats, en models preclínic de les neoplàsies estudiades.

A watercolor splash graphic with a mix of yellow, orange, and light blue colors, positioned to the left of the text.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. Cultius cel·lulars

El cultiu cel·lular consisteix en el manteniment de cèl·lules *in vitro* sota unes condicions controlades per tal de preservar les condicions fisiològiques, bioquímiques i genètiques originals. Per treballar amb cultius cel·lulars, es imprescindible l'esterilitat. Per aquest motiu, es treballa amb cabines de flux laminar vertical amb filtre HEPA i tot el material és esterilitzat, així com el material líquid autoclavat o filtrat. Per treballar dins la campana s'ha d'utilitzar sempre bata i guants específics per aquest treball.

1.1. Línies cel·lulars

Les línies cel·lulars utilitzades en aquesta tesi són totes derivades de tumors, excepte les HEK293 que són d'origen embrionari. Les línies HT29 i CaCo2 són línies comercials derivades d'adenocarcinoma colorectal. Les cèl·lules CP15T van ser establertes al laboratori i són derivades d'adenocarcinoma ductal pancreàtic humà (Perez-Torras et al. 2011). La línia cel·lular NP9 va ser cedida des del Servei de Digestiu de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona on van ser generades a partir d'adenocarcinoma pancreàtic humà implantat en ratolins atímics i perpetuats com a xenografts (Villanueva et al. 1998). Les línies BCLC3, BCLC5 i BCLC12 van ser generades al IDIBAPS Hospital clínic de Barcelona i cedides pel Dr. Jordi Bruix. Deriven d'hepatocarcinoma humà (BCLC3 i 5) i de colangiocarcinoma (BCLC12), generades a partir de reseccions quirúrgiques d'aquests tumors. Les línies EGI-1 i TFK1 són línies comercials derivades també de colangiocarcinoma. Les HEK293 són cèl·lules comercials, derivades de ronyó embrionari. A partir d'aquest model el laboratori va generar la línia HEK293-hCNT1 mitjançant el sistema Flp-In™ integrant l'expressió estable del gen hCNT1 en un lloc específic del genoma.

1.2. Manteniment i criopreservació

Totes les línies cel·lulars utilitzades tenen un creixement en monocapa, en un suport sòlid tractat per a què s'adhereixin (normalment plaques de 10mm). Es mantenen en un incubador amb atmosfera humida controlada a 37°C i amb 5% de CO₂. Els medis de cultiu utilitzats en cada línia estan suplementats en tots els casos amb FBS 10% en totes les línies excepte CaCo2 (20%), 2mM de glutamina, i una combinació d'antibiòtics de

penicil·lina i estreptomocina, 20 U/mL i 20 µg/mL respectivament. Els tipus de medi i suplementes addicionals per cada línia cel·lular es detallen a la (Taula 5).

Tumor	Línia	Origen	Medi	Dilució
CRC	CaCo2	ATCC	EMEM 20% FBS	1:5-1:6
	HT29	ATCC	DMEM	1:8-1:10
PDAC	CP15T	Pérez-Torras et al., 2011	DMEM F-12	1:5-1:6
	NP9	Villanueva et al., 1998		1:4-1:5
HCC	BCLC3	IDIBAPS Dr. Jordi Bruix	DMEM F-12 +1% NEAA +1% sodi piruvat	1:5-1:6
	BCLC5			1:4-1:5
	Huh7	JCRB	DMEM	1:6-1:8
CCA	BCLC12	IDIBAPS Dr. Jordi Bruix	DMEM F-12 +1% NEAA +1% sodi piruvat	1:5-1:6
	EGI-1	DMSZ	DMEM	1:4-1:5
	TFK1	DMSZ	RPMI 1640	1:5-1:6
Ronyó embrionari	Hek293	ATCC	DMEM	1:10-
	Hek293-hCNT1	Establertes al laboratori	DMEM	1:10

Taula 5. Descripció de les línies cel·lulars utilitzades. Origen, tumor del qual deriven, medi de cultiu i dilució. CRC (càncer colorectal), PDAC (adenocarcinoma ductal pancreàtic), HCC (hepatocarcinoma), CCA (colangiocarcinoma), NEAA (aminoàcids no essencials), ATCC (*American Type Culture Collection*), JCRB (*Japanese Collection of Research Bioresources*), DMSZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*). Tots els medis estan adquirits a Thermo Fisher Scientific.

Per mantenir el creixement cel·lular sense afectar a la diferenciació i al cicle cel·lular, els cultius s'han de replaquejar quan les cèl·lules arriben a una confluència d'un 80-90%. Aquest replaqueig o passatge es fa mitjançant la tripsinització; un procés enzimàtic i mecànic que desadhereix les cèl·lules. Una vegada disgregades s'atura aquest procés amb medi amb FBS i es realitza la dilució adequada per passar a una placa nova i que les cèl·lules es mantinguin fins a créixer de nou a la confluència de 80-90% en un termini de 3-5 dies. La dilució per a cada línia cel·lular es detalla a la (Taula 5).

Entre cada passatge es realitza un canvi de medi, retirant el medi de la placa i afegint el mateix volum de medi nou.

Per tal de poder disposar de cèl·lules sense acumulació d'errors adquirits durant el manteniment, cal criopreservar estocs cel·lulars dels passatges més baixos possibles. Aquest estoc s'obté a partir del cultiu cel·lular, i s'inicia amb la tripsinització de les cèl·lules, una vegada disgregades, es centrifuguen 4 minuts a 1200 rpm, i es retira el medi sobrenedant. Les cèl·lules són resuspeses en 1 mL/placa de medi de congelació (90% FBS + 10% DMSO), aquest es guarda en criotubs els quals s'introdueixen en un

dipòsit de congelació gradual d'isopropanol a -80°C , el qual va disminuint gradualment la temperatura $1^{\circ}\text{C}/\text{minut}$, evitant la formació de cristalls i assegurant-ne la viabilitat. L'estoratge d'aquests criotubs una vegada congelats es fa amb nitrogen líquid. Per al procés invers, l'obtenció de cultiu cel·lular a partir de cèl·lules congelades, ha de ser un procés ràpid, considerant que el DMSO a temperatura ambient és tòxic per les cèl·lules. El criotub es descongela en un bany a 37°C , la solució es centrifugada en un tub adequat durant 4 minuts a 1200 rpm. Es retira el medi de congelació i es plaquejen les cèl·lules en un medi fresc amb 20% de FBS fins que la confluència arribi al 80-90%.

1.3. Test de micoplasma

El micoplasma és un bacteri de mida molt petita sense paret cel·lular, aquest fet fa que sigui resistent a antibiòtics com la penicil·lina o l'estreptomicina. Els cultius cel·lulars infectats de micoplasma pot ser que no mostrin senyals d'infecció visible amb el manteniment normal de les cèl·lules, però la seva presència en cultiu pot alterar les condicions i els resultats experimentals. Per tal de controlar aquesta infecció es realitza el test de micoplasma cada 15 dies. Aquest test es basa en l'amplificació per PCR d'un fragment d'uns 500 parells de bases del genoma del micoplasma amb *primers* específics utilitzant com a motlle el medi de cultiu que hagi estat en contacte amb les cèl·lules de 48 a 72h escalfat a 95°C . Si el test és positiu les cèl·lules s'han de tractar durant 15 dies amb Plasmocin (Invivogen) a $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$.

1.4. Tractaments amb fàrmacs

Els fàrmacs es dilueixen amb el mateix medi de cultiu a la concentració corresponent i s'afegeixen al cultiu i es deixaran el temps necessari en contacte amb les cèl·lules depenent de l'experiment. Els fàrmacs utilitzats i les concentracions utilitzades són les següents:

Fàrmac	Nom	Casa comercial	Concentracions
Vorinostat (SAHA)	Àcid hidroxàmic suberoïlanilida	Sigma-Aldrich	2 μ M i 4 μ M
Gemcitabina (dFdC)	2',2'-difluoro 2'desoxicitidina	MedChem Express	10 μ M, 20 μ M i 50 μ M
Capecitabina (5-DFur)	5'-Desoxi-5-fluoro-N-(pentiloxi-carbonil)citidina	Sigma-Aldrich	20 μ M i 50 μ M
Cisplatí (CDDP)	(SP-4-2)-diaminodicloroplatí(II)	Sigma-Aldrich	IC20, IC50, 2mg/Kg i 4mg/Kg

Taula 6. Fàrmacs utilitzats a la tesi.

En quant al tractament amb SAHA, es realitza a les 24h post-sembra a les dues concentracions esmentades i durant 48h. Posteriorment es realitza l'assaig corresponent o es congelen les plaques. Pel que fa al tractament de gemcitabina i 5-DFur, es realitza als esferoides a dia 7 de creixement, afegint el fàrmac directament al medi (s'ha de tenir en compte que afegim volum, per tant és important considerar el volum final), i és manté el tractament durant 72h. Pel que fa al tractament amb cisplatí, es realitza també a les 24h de la sembra cel·lular i es manté durant 24, 48, o 72h. En quant als tractaments amb cisplatí i gemcitabina *in vivo*, es van realitzar mitjançant injecció intraperitoneal, segons els cicles de tractament esmentats a l'apartat de resultats.

1.5. Modulació dels microRNAs

Per tal d'estudiar la implicació dels microRNAs, se n'ha modulada la seva expressió, ja sigui amb el silenciament, la sobreexpressió o el bloqueig dels microRNAs. Per realitzar aquesta modulació s'han utilitzat diferents mètodes de transfecció. El Transit-siQuest (Mirus) s'utilitza per la transfecció de siRNAs i miRNA mítics. Per tal de silenciar una placa MW6, es prepara la solució de transfecció que conté 250 μ L d'OptiMEM, 7,5 μ L de Transit-siQuest i el volum necessari per a les concentracions desitjades de miRNA mítics o siRNA, aquesta reacció s'afegeix al cultiu. En quant a les transfeccions amb Lipofectamina 2000 i Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific), la solució de transfecció es correspon a 1/10 part del volum final, mentre que la resta (9/10) és medi fresc el qual s'ha canviat just abans de la transfecció. La solució de transfecció consisteix per una banda en l'OptiMEM i la lipofectamina i per l'altre l'OptiMEM i el DNA. Aquests dos tubs es barregen i s'incuben durant 5 minuts i s'afegeix al cultiu gota a gota. Per la

Lipofectamina 2000 a les 5 hores es canvia el medi. Els volums i les quantitats de les solucions de transfecció utilitzades són les següents:

Reactiu	MW96	MW6	Placa 60mm
OptiMEM	5 µL	100µL	150µL
Lipofectamina	0,5 µL	8-12µL	12-18µL
OptiMEM	5µL	100µL	150µL
DNA	µg	2µg	4µg
Volum Final	10µL	200µL	300µL

Taula 7. Condicions de transfecció amb Lipofectamina 2000 i Lipofectamina 3000 (Termofisher Scientific).

1.5.1. Sobreexpressió miRNAs

La sobreexpressió dels miRNAs es realitza mitjançant els miRNA míemics miRIDIAN™ de Dharmacon. Es transfecten 50nM de miRNA míemics utilitzant Transit-siQuest seguint les indicacions del fabricant i amb lipofectamina 3000 per als esferoides. En el cultiu en monocapa es transfecten 48h post-sembrada i en el cultiu d'esferoides a dia 5 de creixement. En ambdós casos es deixen durant 48h.

1.5.2. Silenciament miRNAs

El silenciament dels miRNAs es realitza mitjançant els anatagomirs miRCury LNA microRNA inhibidors d'Exiqon corresponents així com el control negatiu. Les cèl·lules es transfecten amb 30nM de cada siRNA utilitzant Transit-siQuest seguint les indicacions del fabricant per al cultiu en monocapa i amb lipofectamina 3000 per als esferoides. Igual que en la sobreexpressió, els siRNAs són transfectats 48h post-sembrada i a dia 5 en esferoides i es realitza l'assaig corresponent 48h posteriors al silenciament.

1.5.3. Bloqueig miRNAs

Per bloquejar l'efecte del miR-106a s'ha utilitzat el vector miRZip-106a de SBI-System Bioscience. Com a control negatiu s'ha generat un nou vector utilitzant el miRZip-106a, al qual se li ha extret l'shRNA que bloqueja el miR-106a i s'ha introduït un shRNA control que no bloqueja cap miRNA candidat de la tesi. Els primers utilitzats per la generació del miRZip control són

GATCCCGTACGCGGAATACTTCGACTTCCTGTCAGATCGAAGTATTCCGCGTACGTTTTG i
AATTCAAAAACGTACGCGGAATACTTCGATCTGACAGGAAGTCGAAGTATTCCGCGTACGG.

S'han introduït al vector miRZip amb les dianes de restricció BamHI i EcoRI (Veure procediment de la generació del vector a l'apartat 3. Generació de vectors). Els vectors miRZip-106a i miRZip-C es transfecten a la cèl·lula amb la utilització de la lipofectamina 2000 pel cultiu en monocapa i la lipofectamina 3000 per al cultiu d'esferoides seguint les recomanacions del fabricant. Pel cultiu en monocapa la transfecció es realitza a les 48h post-sembrada i per als esferoides a dia 5 de creixement. Les anàlisis es realitzen 48h post-transfecció.

2. Generació d'esferoides

Pel cultiu d'esferoides s'utilitzen les mateixes condicions de manteniment esmentades anteriorment així com els mateixos medis de cultiu. Les cèl·lules en aquest cas són sembrades a una densitat de 5000 cèl·lules/pou en 100 µL en una placa MW96 ULA (*ultra low adhesion*) de (Corning Cat.7007). Es centrifuguen les plaques 7 minuts a 1200 rpm sense frens. Es deixen créixer els esferoides durant 10 dies. Es realitza un canvi de medi als 5 dies, retirant la meitat del volum (50µL) i afegint el mateix volum de medi fresc.

2.1. Control del creixement dels esferoides

Per tal de valorar el creixement dels esferoides es realitzen fotografies diàries a cada esferoide amb el microscopi AE2000 a un augment de 10x connectat a la càmera (Motic Camera 5.0). Aquestes es processen mitjançant el programa ImageJ (*Fiji Package*) gràcies a un macro generat el qual prepara les imatges per tal de convertir-les en blanc i negre, descartar el fons i qualsevol artefacte de la imatge i emplenar l'àrea del perímetre de l'esferoide per tal de calcular l'àrea, el percentatge d'àrea i el diàmetre de l'esferoide, dades que es recullen en un excel generat pel mateix macro. Amb les dades obtingudes es calcula el percentatge de creixement segons la diferència entre el dia 10 i el dia 2 segons la següent fórmula: % creixement=(àrea dia 10-àrea dia 2)x100. El macro està basat i adaptat de (Ivanov et al. 2014).

```

run("Set Scale...", "distance=178 known=100 pixel=1 unit=µm global");

run("16-bit");

//run("Brightness/Contrast...");

setAutoThreshold("Huang");

setOption("BlackBackground", false);

run("Convert to Mask");

run("Maximum...", "radius=3");

run("Fill Holes");

run("Minimum...", "radius=3");

run("Remove Outliers...", "radius=50 threshold=0 which=Dark");

    run("Minimum...", "radius=30");

    run("Maximum...", "radius=30");

    run("Watershed");

    run("Analyze Particles...", "size=50000-Infinity circularity=0.20-1.00 show=[Overlay Outlines]
display include summarize");

run("Set Measurements...", "area centroid shape feret's display add redirect=None decimal=1");

```

Taula 8. Macro Generat per la mesura del creixement dels esferoides. Adaptat de (Ivanov et al. 2014)

3. Generació de vectors

3.1 PCR

La PCR (*Polymerase chain reaction*) consisteix en l'amplificació del DNA *in vitro*, es basa en un seguit de cicles repetitius d'oscil·lació tèrmica els quals permeten la desnaturalització del DNA, la unió dels *primers* (o encebadors) i la replicació enzimàtica del DNA. El material necessari per a dur-la a terme consta de DNA motlle, un enzim termoestable amb activitat DNA polimerasa, dNTPs, un parell de *primers* dirigits a la seqüència diana i el tampó de reacció. Excepte per la seqüenciació (apartat 3.5) i per la

prova de micoplasma (apartat 1.3), la polimerasa emprada en aquesta tesi és la *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific).

La preparació de la reacció ha de ser en gel. L'ordre d'addició dels reactius també és important, ja que la *Phusion* té també activitat 3'-5' exonucleasa i podria degradar els *primers* en absència de dNTPs. Components:

- H₂O: fins a 20 o 50µL, segons el volum final de reacció.
- Tampó de reacció 5X. Per defecte, HF.
- 200µM de cadascun dels dNTPs.
- 0,5µM de *primer forward* i 0,5µM de *primer reverse*.
- DNA motlle (50-250ng). Si el motlle és el cDNA, el volum no pot excedir el 10% del volum final de PCR; en el nostre cas, hi posem 2µL, que són 100ng de cDNA (50ng/µL).
- 0,02U/µL de *Phusion*.

La reacció consisteix en 25-35 cicles, a més d'una desnaturalització inicial (30" a 98°C) i una extensió final (5-10min a 72°C). Els cicles comprenen per desnaturalització (10" a 98°C), anellament (30") i extensió (72°C). La temperatura d'anellament depèn de la parella de *primers*; per calcular-la s'empra l'eina *Tm calculator* de Thermo Fisher. El temps d'extensió depèn de la llargada i la complexitat del fragment a amplificar; generalment, 30 segons/kb.

En el cas d'aquesta tesi, la PCR estàndard s'ha emprat per clonar el 3'UTR d'hCNT1 i clonar la variant 2 d'hCNT1.

3.2 Gels d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa permet separar els fragments de DNA per mida. S'empra per comprovar si un producte de PCR presenta el pes adequat, si els plasmidis lligats han incorporat l'insert (i per tant pesen més que els plasmidis buits) i també per purificar DNA.

El tampó TBE 0,5X (dilució 1/10 de TBE 5X: Tris-base 0,5M, àcid bòric 0,45M, EDTA 5mM) s'utilitza tant per la preparació del gel d'agarosa com de medi aquós per tal que el gel corri adequadament. Per fer un gel d'1% d'agarosa calen 0,6g d'agarosa i 60mL TBE 0,5X

i s'afegeix el SYBR *Safe* (Invitrogen). Cal afegir el tampó de càrrega 6X a les mostres a carregar. A més, s'ha de córrer en paral·lel un marcador de pesos moleculars adequat a la mida del DNA a analitzar (1kb o 100bp *DNA ladder*, Promega). L'electroforesi es fa a un voltatge de 60-120V. Per tal d'obtenir imatges del DNA, cal excitar el gel amb llum UV i registrar les emissions consegüents amb una càmera.

3.3 Clonació de vectors

Depenent de la tècnica o el disseny experimental, s'han utilitzat diferents vectors; en tots els casos es tracta de vectors que repliquen en bacteris:

Vectors plasmídics	Tipus de vector	Casa comercial	Mida	Subclonació	Dianes de restricció
pcDNA3.1	Vector d'expressió	Clontech	5,4kb	hCNT1, hCNT1 V2	EcoRI (V1)EcoRI i XbaI (V2)
pcDNA3.1-HA	Vector d'expressió	Genscript	5,4kb	hCNT1, hCNT1 V2	EcoRI i XbaI (V2)
PGL3-promoter	Vector reporter	Promega	5kb	3'UTR hCNT1	XbaI (3UTR)
pEGFP-N3	Vector reporter	Clontech	4,7kb	hCNT1, hCNT1 V2	EcoRI, SacII
pRFP-C1	Vector reporter	Clontech	4,7kb	hCNT1, hCNT1 V2	
miRZip	Vector reporter	SBI-System Bioscience	7,8kb	shRNA control	BamHI-EcoRI

Taula 9. Vectors plasmídics utilitzats i subclonació per la que s'han utilitzat.

3.1.1 Digestió

El primer pas per la subclonació de vectors és la digestió d'aquest mitjançant els enzims de restricció corresponents per a introduir l'insert d'interès, el qual es digerirà també amb els mateixos enzims. Generalment en aquesta tesi s'han digerit 1,5µg de DNA durant 2-3 hores a 37°C. Per la seva realització s'incuba el DNA amb 5-10U de cada enzim, tenint en compte que la quantitat final d'enzim no pot superar el 10% del volum final (VF) de la reacció, i el tampó 10X adient per a cada combinació d'enzims, la compatibilitat dels quals es pot consultar a <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11082035001bul.pdf>. Una vegada s'ha linealitzat el vector, cal eliminar el fosfat 5' del vector amb fosfatasa alcalina (Roche) amb la incubació d'una hora 1U enzim/1µg de vector. Per tal de prosseguir amb la lligació del vector i l'insert, abans s'ha de purificar el DNA. Aquesta purificació es realitza mitjançant el kit de

purificació de DNA *DNA Clean&Concentrator* de Zymo Research, seguint les indicacions del kit.

3.1.2 Lligació

Per tal de lligar el vector digerit amb l'insert digerit amb els mateixos enzims, cal tenir en compte la següent fórmula, per calcular la quantitat d'insert respecte a la del vector en la relació 1:1:

$$\text{ng insert} = \text{ng vector} \frac{\text{Kb insert}}{\text{Kb vector}}$$

Les lligacions que s'han generat, han estat amb 50ng de vector. Per comprovar que el procediment de lligació sigui correcte, i no hi hagi autolligació del vector es realitza la proporció 1:0 com a control, la 1:1 i la 1:3 ja que així augmenta l'eficiència de la lligació. La reacció té un volum final de 10µL, la qual conté el tampó lligasa 10X, 50ng de vector, els ng corresponents d'insert, de 0,1 a 1 unitat de T4 lligasa (Promega) i aigua per arribar al VF de 10µL. S'incuba aquesta reacció durant 3 hores a temperatura ambient. Després d'aquesta incubació, ja es pot procedir a la transformació mitjançant bacteris competents per a amplificar aquest DNA.

3.1.3 Transformació de bacteris competents

Per l'obtenció de DNA plasmídic mitjançant la transformació en bacteris competents, s'utilitzen els bacteris *E.Coli XL1-blue*, i es fa mitjançant xoc tèrmic. Aquest consisteix en primer lloc en mesclar els bacteris (100µL) i el DNA procedent de la lligació (10µL) sota la flama. La mescla s'incuba 15 minuts en gel. Tot seguit es fa el xoc tèrmic amb una incubació d'1 hora i 30 minuts a 42°C, seguit d'un minut en gel. S'afegeix 1mL d'LB a cada transformació i s'incuba 1 hora a 37°C en agitació horitzontal. Posteriorment, es centrifuga el producte 5 minuts a 3400rpm, i es descarta uns 800µL de sobrenedant. Es resuspen el pellet amb el volum restant i es plaqueja a una placa d'agar. Es realitza el creixement de les colònies de bacteris en plaques d'agar que contenen ampicil·lina (30µg/mL), ja que aquesta és la resistència que codifiquen els vectors utilitzats, i per tant, només creixeran els bacteris que hagin estat transformats. El creixement s'incuba tota la nit a 37°C de manera que l'agar quedi a la part superior de la placa per evitar que la condensació provoqui gotes sobre el creixement.

3.1.4 Obtenció de DNA plasmídic de bacteris competents

Per tal d'obtenir el DNA a partir del creixement de bacteris competents s'utilitza el kit de Mini-prep *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segons les indicacions del protocol. Aquest procediment permet l'obtenció ràpida d'una petita quantitat de DNA plasmídic. En aquest cas s'ha utilitzat per a realitzar comprovacions de creixement o de clonació de vectors. En primer lloc, cal créixer una colònia de bacteris competents transformats amb 3mL d'LB amb l'antibiòtic corresponent a 100µg/mL durant la nit a 37°C i en agitació horitzontal, tot seguit es segueixen les instruccions del fabricant del kit.

Per realitzar creixements de més quantitat de DNA s'utilitza el kit Midi-preps *NucleoBond Xtra Midi/Maxi* (Macherey-Nagel) segons especificacions del protocol. En aquest cas el creixement prèvi es realitza amb 150µL de creixement d'una colònia en 3mL en 50µL amb 100µg/mL de l'antibiòtic.

La mesura de la concentració de DNA es realitza mitjançant espectrofotometria amb l'aparell Nanodrop ND-1000, el qual mesura la quantitat de DNA a la longitud d'ona 260nm.

3.4 Mutagènesi dirigida

3.4.1 Deleció del lloc d'unió del miRNA al 3'UTR del transportador

Per tal de deletar el lloc d'unió dels miRNAs (BS) a l'extrem 3'UTR del transportador, es parteix del vector generat del 3'UTR d'hCNT1. En primer lloc es determinen les seqüències dels BS a eliminar, mitjançant les eines informàtiques RNAHybrid, PITA i miRmap. A partir d'aquestes seqüències es generen els *primers* per tal que s'amplifiqui tot el vector excepte el fragment que es vol deletar. D'aquesta manera el *primer* RV amplificarà des de l'inici del fragment a deletar cap a les parts 5' del vector, mentre que el FW amplificarà des del final del fragment a eliminar cap a les parts 3' del vector (Figura 16). Al tractar-se d'un vector circular es generarà un nou vector sense el fragment en qüestió.

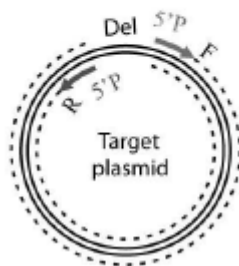


Figura 16. Esquema de l'estratègia d'amplificació i disseny dels primers per la deleció dels BS dels miRNAs al vector 3'UTR d'hcNT1.

Per tal que es pugui generar aquest de manera correcta, els *primers* s'han de fosforilar prèviament al seu extrem 5'. Per realitzar aquesta fosforilació s'utilitza la T4 *Polynucleotide Kinase* (PNK4, New England Biolabs). Cada *primer* és fosforilat per separat. Es calcula la quantitat de mols de *primer* corresponents a 50pmol de 5'termini mitjançant les següents fórmules:

$$1\mu\text{g } 20\text{mer}=150 \text{ pmol } 5' \text{ termini}$$

$$\text{pmol ssDNA} = \frac{\mu\text{g ssDNA}}{\text{Nb}(\text{n}^\circ \text{ de bases del primer})} \times \frac{10^3 \text{ ng}}{1\mu\text{g}} \times 3030$$

La reacció consisteix en una incubació de 20 minuts a 37°C, seguida de 10 minuts a 75°C per inactivar l'enzim. Es prepara amb un volum final de 20µL, al qual s'hi afegeixen també A 10X, ATP a concentració final 1mM, el corresponent volum de *primer*, 10 U de PNK i la resta, aigua. Els *primers* són utilitzats directament per la PCR subseqüent. Aquesta PCR presenta algun canvi respecte les convencionals, ja que s'utilitzen només 10pmol de cada *primer*, i la mescla de dNTPs només conté dTTP, dCTP i dGTP, ja que el dATP estarà inclòs en el volum dels *primers* i un excés podria impedir la PCR.

3.5 Seqüenciació

Per realitzar les seqüenciacions s'ha utilitzat el mètode Sanger. S'utilitza el kit de seqüenciació *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1* (Applied Biosystems). La reacció es fa a un volum final de 20µL, la qual conté *Big dye sequencing buffer 5X*, 1,25µM de *primer* (Taula 10), 100ng/kb DNA motlle i 1µL de *Ready reaction mix*.

La reacció consta de 25 cicles, a més de les fases de desnaturalització inicial (5 minuts a 96°C) i extensió final (15 minuts a 60°C). Els cicles presenten desnaturalització (10" a

96°C), anellament (5" a 50°C) i extensió (4 minuts a 60°C). El producte de PCR és enviat a la unitat de Genòmica del Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona. Els resultats obtinguts són comparats amb la seqüència original mitjançant l'eina bioinformàtica *Emboss Needle Pairwise sequence alignment* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

Primers	Seqüència
3'UTR hCNT1 V1	FW-CTAGTCTAGAGGACAGAACATGCTTGTGC RV-CTAGTCTAGATAAACAGCCCTCTCTAAG
3'UTR hCNT1 V2	FW-CTAGTCTAGAGACAAAAAGCCGAGGGACC RV-CTAGTCTAGAGAAAATGAGAACTGAGATGGG
Deleció BS miR-106a/17	FW-CTGAGGGCTGTTCTCCCCGGGAAC RV-TGTTCTGTCCTCTAGAATTACACGGCGA
Deleció BS miR-18a	FW-CCCTTTCCAGAGCC RV-GGGACAGATGGTCC
Deleció BS miR-9	FW-CCTCTCCCTCCCCACTTCTCTAG RV-GTGCAGCCCAACAGAAGGGAAGG
Clon hCNT1 V2	FW-CGGAATTCATGGAGAACGACCCCTCGAGAC RV-GCTCTAGATCACACTGTCCAGGTGATCTGA
hCNT1 HA	RV-GCTCTAGATGCCACTGTCCAGGTGATCTGA
hCNT1 GFPN3	RV-TTCCGCGGcTGCCACTGTCCAGGTGATCTGA
SEQ miRZipvector SH	TGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGA
SEQ 3'UTR hCNT1 V1	FW-CACGCAAGAAAAATCAGAGAG RV-CATGCATTCTAGTTGTGGT
SEQ 3'UTR hCNT1 V2	RV-AATGGAATATTATTAGCCA
SEQ CMV (pcDNA3.1)	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
SEQ BGH (pcDNA3.1)	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Taula 10. Primers utilitzats.

4. Assaig Luciferasa

L'assaig luciferasa es realitza mitjançant el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Aquest assaig es basa en la mesura de la luminescència de la proteïna luciferasa.

Per realitzar aquest assaig es sembren les cèl·lules en una placa de 24 pous (MW24), realitzant triplicats per cada condició, les quals es co-transfecten amb un 10 % del DNA total amb el vector pRL-TK, el qual expressa la proteïna renilla sota el control de la regió promotora del gen timidina quinasa del virus *Herpes simplex* i s'utilitza com a control de transfecció. Com a condició control de l'assaig s'inclou el vector PGL3-*promoter*, el qual

té un promotor fort per expressar la luciferasa. Després de les transfeccions i quan es vulgui realitzar l'assaig, es realitza un rentat amb PBS 1X i es lisen les cèl·lules amb el tampó PLB 1X del kit durant 20 minuts a temperatura ambient en agitació. Passats els 20 minuts es recullen les cèl·lules de cada pou per separat i es vortejen 10 segons. Tot seguit es centrifuguen a màximes rpm durant dos minuts a 4°C. Es recupera el sobrenedant i es llegeixen les mostres, tot i que en aquest punt es poden guardar a -80°C. Per la lectura es dipositen 20µL de sobrenedant en una placa blanca MW96 (Biogen) i mitjançant el luminòmetre i el software Glomax es realitza la lectura. Per aquest procediment s'han d'afegir els dos reactius corresponents als injectors, LARII per detectar la luciferasa i *Stop&Glo* per detectar la renilla. El software genera un Excel amb les mesures de luminiscència, les quals s'han de processar. En primer lloc, cal calcular la ratio entre luminiscència de la luciferasa i de la renilla com a control de transfecció. Amb aquests valors, es calcula l'activitat luciferasa de cada vector. En aquest cas, es realitzen els càlculs normalitzant l'activitat de cada vector amb el 3'UTR deletat respecte el 3'UTR WT, establint aquest com a valor igual a 1. Per l'activitat luciferasa amb els silenciaments s'ha relativitzat (C=1) al control negatiu de silenciament.

5. Anàlisi de l'expressió d'RNA

5.1. Extracció d'RNA

Per a l'extracció d'RNA de totes les mostres s'ha utilitzat el kit miRNeasy Mini kit (Qiagen). Les extraccions s'han realitzat seguint les instruccions del fabricant. La quantificació de l'RNA es mesura mitjançant espectrofotometria, amb l'aparell Nanodrop ND-1000.

Per a les mostres de les línies derivades de CCA amb el tractament de cisplatí es va utilitzar el kit d'extracció d'RNA total *SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguint el protocol facilitat pel fabricant.

5.2. Síntesi de cDNA

La síntesi de cDNA consisteix en un procés de retrotranscripció per obtenir una doble cadena de DNA a partir d'una cadena d'mRNA. La primera part del procés consisteix en sintetitzar una cadena complementaria al motlle, creant un híbrid RNA:DNA, a continuació s'elimina la cadena d'RNA i es sintetitza la doble cadena d'RNA. Per a

realitzar aquest procés, els protocols són diferents per als RNAs dels gens que codifiquen per proteïnes i els dels microRNAs.

Tots els processos des de la síntesi de cDNA fins al muntatge de la placa de *Real-Time* PCR es realitzen amb material estèril i puntes de filtre, dins una cabina de flux vertical.

5.2.1. Síntesi de cDNA pels transportadors

Per a la síntesi de cDNA, es retrotranscriu 1µg d'RNA, el qual es dilueix segons la seva quantificació amb aigua estèril fins a un volum de 10µL. Aquests s'incuben 5 minuts a 65°C al termociclador en un programa ja preestablert amb tots els passos del procés. A continuació es posen les mostres en gel per a baixar ràpidament la temperatura, tot seguit i amb les mostres ja a temperatura ambient, s'afegeix a cada mostra una mescla de 10 µL que conté 10µL de cDNA mix (4µL de tampó 5X *first strand*, 2µL DTT 0.1M, 1µL dNTPs 10mM, 240ng *random primers* i H₂O estèril fins 10µL) i 1 µL de M-MLV (Thermo Fisher Scientific) i 1 µL de RNAsin (Promega). Aquesta mescla s'incuba al termociclador durant 50 minuts a 37°C per que es realitzi el procés de retrotranscripció i 10 minuts a 70°C per inactivar els enzims.

5.2.2. Síntesi de cDNA pels microRNAs

El procés de retrotranscripció dels microRNAs és més complex que pels transportadors. Es retrotranscriuen 4ng d'RNA, el qual es dilueix segons la seva quantificació amb aigua estèril. S'utilitza el kit TaqMan Advanced miRNA cDNA *synthesis kit* de Thermo Fisher Scientific. Aquest protocol consta de 4 passos, el primer es basa en les reaccions necessàries per l'adició d'una cua de Poli-A al motlle, el segon és el procés de lligació, seguit de la transcripció reversa i el darrer l'amplificació. Aquests passos es realitzen un a un, afegint en cada un d'ells les solucions de reacció de cada pas i amb els programes del termociclador per a cada un d'ells. Tot el protocol es realitza segons les instruccions del fabricant. El primer pas consisteix en una poliadenilació a 37°C, durant 45 minuts, seguida de l'aturada de la reacció a 65°C durant 10 minuts. Per la reacció de lligació s'incuben les mostres al termociclador a 16°C durant una hora. Tot seguit es realitza el procés de transcripció reversa en un primer pas de 15 minuts a 42°C i l'aturada de la reacció a 85°C durant 5 minuts. Finalment per l'amplificació, es realitza una primera activació dels enzims a 95°C durant 5 minuts, seguits de 14 cicles de destanuralització a

95°C durant 3 segons i extensió a 60°C durant 30 segons. Finalment hi ha el pas d'aturada de les reaccions amb una incubació a 99°C durant 10 minuts.

5.3. *Real-time* PCR (RT-PCR)

La PCR a temps real (RT-PCR) és la tècnica per mesurar l'RNA missatger dels gens. En aquest cas s'ha utilitzat el sistema *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). Aquest mètode es basa en l'amplificació per PCR del cDNA d'interès mitjançant els *primers* específics. Els cicles d'aquesta PCR estan establerts i són els següents: un cicle de 2 minuts a 50°C, un cicle de 10 minuts a 95°C i finalment 40 cicles de 15 segons a 95°C i 60 segons a 60°C. Per a aquestes reaccions s'utilitzen plaques òptiques de 96 pous (Applied Biosystems), en què en cada pou té lloc una reacció. Per realitzar aquesta PCR es prepara una mescla amb Taqman Universal PCR MasterMix 2x (Applied Biosystems), 1µL de mescla de sonda i *primers* específics per cada gen que es vol analitzar, i 50ng de cDNA. Es fan duplicats de cada condició. L'expressió de missatger s'analitza mitjançant l'ús de sondes fluorogèniques de TaqMan (Applied Biosystems), les quals contenen els *primers* específics i un fluorocrom a l'extrem 5' (*reporter*) i un inhibidor de l'emissió a l'extrem 3' (*quencher*). Quan aquests *primers* s'uneixen a la seqüència i aquesta és amplificada, l'activitat 5' nucleasa de la polimerasa Taq produeix una ruptura de la sonda, de forma que el fluorocrom és alliberat i deixa d'estar inhibit pel *quencher*, i per tant pot ser detectat. Conforme van avançant els cicles, la senyal s'anirà amplificant. Per a l'anàlisi de les dades, es fixa un llindar o *Threshold*, el qual determina els nivells basals sota els quals no s'observen canvis. Aquest *Threshold* determinarà el cicle límit inicial (C_T) del qual es començarà a determinar l'expressió, de manera que com més baix sigui el valor de C_T més presència del gen en qüestió hi haurà per mostra. Per realitzar els càlculs de quantificació relativa del missatger, s'utilitza el mètode $2^{-\Delta\Delta C_T}$, el qual es basa en la comparació del gen d'interès amb un gen endogen (*housekeeping*) que no es vegi alterat per les condicions experimentals. L'endogen utilitzat per l'anàlisi de les dades d'RNA dels transportadors ha estat hGAPDH, mentre que pels microRNAs ha estat RNUB48. Els resultats es representen com a unitats arbitràries indicant el nombre de vegades que canvia la condició analitzada respecte el control.

5.4. Real-time PCR absoluta

En alguns casos és necessària la utilització de la RT-PCR absoluta, aquesta es basa en el mateix mètode que la RT-PCR però incorporant una recta patró del gen d'interès amb concentracions conegudes de DNA. Aquesta recta patró s'ha obtingut a partir de la linealització del vector d'expressió que contingui el gen d'interès. A partir d'aquesta concentració coneguda i de les dades de C_T obtingudes, es calcula el nombre de còpies per microlitre (μL) mitjançant els següents càlculs: $1 \text{ mol DNA} = 6,02 \cdot 10^{23}$ còpies de DNA; $1 \text{ pmol dsDNA} = 660 \text{ pg dsDNA}$

La recta patró es prepara de tal manera que en $9\mu\text{L}$ hi hagi el nombre de còpies de DNA de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 . En aquest cas els resultats no estan normalitzats a cap endogen, sinó que directament s'obtenen els valors de nanograms de DNA per mostra.

Sondes generades al laboratori				
Gen		Seqüència/Primers	Fluoròfor	Quencher
hCNT1-101T	sonda	AAGGCCAGCTCCCTAGGAGTGACTTGAG	FAM	TAMRA
	hCNT1-78F	TGATTTCTTGAAAGCCTGGA		
	hCNT1-149R	CTGCTCCTGATCTCTGCGG		
hCNT2-109T	sonda	AGGACTGACGCACAAGGACACAGCC	FAM	TAMRA
	hCNT2-86F	AAGTAGAGCCTGAGGGAAGCAA		
	hCNT2-150R	GCCCAGTCCATCCCCC		
hCNT3-109T	Sonda	CACACAAACACCAAACAGGATGAAGAACAGG	FAM	TAMRA
	hCNT3-119F	GAGCTGTGCAAAGCAGGGA		
	hCNT3-192R	TGGAGAATCCTGCTCAACTGTG		
hENT1-77T	Sonda	CAGGCAAAGAGGAATCTG GAGTTTCAGTCTC	FAM	TAMRA
	hENT1-F	GCAAAGGAGAGGAGCCAAGA		
	hENT1-R	TTCATTGGTGGGCTGAGAGTT		
hENT2-131T	Sonda	AGGAGCCGGAATCAGAGC CAGATGA	FAM	TAMRA
	hENT2-F	CCCTGGATCTTGACCTGGAG		
	hENT2-R	GGTTTTCTGGCTTCTGGG		
hCNT1 V2	sonda	TCTTAAACCAGAGCAGCAGGCGG	FAM	NFQ
	hCNT1V2-F	GGTTTCTCAAGCCTCAGGG		
	hCNT1V2-R	AGGGAGGTAATGATTCGGG		

Taula 11. Sondes TaqMan generades al laboratori utilitzades per l'anàlisi RT-PCR.

Sondes comercials			
Gen	ID comercial	Floròfor	Quencher
hGAPDH	4310884E	VIC	TAMRA
hOCT1	4331182	FAM	NFQ
miR-106a	478225_mir / 002169	FAM	NFQ
miR-17	478447_mir / 000393	FAM	NFQ
miR-18a	477944_mir / 002422	FAM	NFQ
miR-10b	002218	FAM	NFQ
miR-15b	000390	FAM	NFQ
miR-150	000473	FAM	NFQ
miR-122	002245	FAM	NFQ
miR-93	478210_mir	FAM	NFQ
miR-424	000604	FAM	NFQ
miR-106b	000442	FAM	NFQ
miR-9	478214_mir	FAM	NFQ
miR-20a	000580	FAM	NFQ
RNUB48	Hs04931161_g1	FAM	NFQ

Taula 12. Sondes TaqMan comercials utilitzades per l'anàlisi RT-PCR.

6. Anàlisi de l'expressió de proteïnes

6.1. Obtenció d'extractes proteics totals

L'extracció proteica es realitza a partir del cultiu cel·lular del qual s'ha realitzat dos rentats amb PBS 1X i s'ha congelat amb nitrogen líquid. S'utilitza el tampó de fosforilats, el qual preserva els residus de fosforilació (20mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 10mM EDTA, 10mM pirofosfat sòdic, 2mM ortovanadat, 100mM NaF i 1mM β -glicerofosfat), suplementat amb inhibidors de proteases 1X i inhibidor de fosfatases 1X. Tot el procés d'extracció es fa amb gel per tal d'evitar possibles degradacions de les proteïnes. S'afegeix 60 μ L del tampó de lisi sobre la placa i es recullen les cèl·lules amb ajuda d'un *scraper*. Es passa la mostra per una xeringa de 25G i es centrifuguen 15 minuts a 4°C a 13200rpm. Es traspasa el sobrenedant obtingut a un tub nou, el qual es pot emmagatzemar a -20°C o es pot utilitzar per a realitzar la quantificació i preparació de les mostres per l'anàlisi per Western Blot (WB).

6.2. Valoració de la concentració de proteïna

Per tal de determinar la concentració de proteïna de les mostres s'utilitza el mètode Bradford, amb la solució comercial *Protein Assay Kit* (Bio-Rad) amb una dilució 1:5 amb aigua destil·lada. Aquest mètode es basa en el canvi colorimètric del blau de *Coomassie* quan s'uneix a les proteïnes provocant un canvi d'absorbància de 465 a 595nm. Aquest canvi és proporcional a la quantitat de proteïnes de la mostra. Per tal de poder realitzar

els càlculs de la quantitat de proteïna, en la mateixa lectura s'afegeix una recta patró feta a partir de dilucions d'albumina sèrica bovina 2mg/mL del rang de 0-500µg/mL. A partir d'aquesta recta i de les dades d'absorbància es calcula la concentració proteica de les mostres. Per realitzar aquesta mesura, les mostres es dilueixen 1:15 i 1:30, i es carreguen duplicats de 10µL en la placa MW96 on també s'hi ha carregat la recta patró, en aquest cas en triplicats. S'afegeixen 200µL de la solució de Bradford diluïda i es mesura l'absorbància a 595nm.

6.3. Anàlisi de proteïnes per Western Blot

6.3.1 Electroforesi en SDS-PAGE

Per l'anàlisi de proteïnes, aquestes s'han de separar segons el seu pes molecular degut a l'acció d'un camp elèctric. Per realitzar aquest procediment s'utilitzen els gels de poliacrilamida (PAGE) en presència de SDS (dodecil sulfat sòdic). Aquests gels estan formats per un gel concentrador el qual serveix per que les mostres entrin en el mateix moment al següent gel, el gel resolutiu. Per preparar 4mL de gel concentrador calen 2,7mL d'aigua miliQ, 0,67mL de 30% acrilamida/Bis 37,5:1 (Bio-Rad), 0,5mL de Tris 1M pH 6,8, 40µL d' SDS 10%, 40µL d' amoni persulfat (APS, Sigma) 10% i 4µL de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED, Sigma).

El gel resolutiu és el responsable de la separació de les proteïnes en funció del seu pes molecular, per aquest motiu es poden preparar gels de percentatges diferents d'acrilamida segons el pes que es vulgui separar, en aquest cas s'utilitzaran gels del 10% per hCNT1 i del 8% per separar les proteïnes AKT, pAKT, ERK i pERK. Per a 10mL de gel, s'afegeix 2,7mL o 3,3mL d'acrilamida segons si el gel és del 8 o del 10% respectivament; 2,5mL Tris 1,5M pH 8,8, 100µL SDS 10%, 100µL APS 10%, 4µL TEMED i la resta d'aigua. Primer es prepara el gel resolutiu i, un cop polimeritzat, s'afegeix el gel concentrador damunt amb una pinta dels pous que siguin necessaris. Quan estiguin preparats, els gels es munten al sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), el qual s'introdueix a una cubeta d'electroforesi, i s'omplen amb tampó d'electroforesi (Tris-Base 25mM, Glicina 191mM, SDS 0,1%). Un cop retirada la pinta, ja es poden carregar les mostres que prèviament s'hauran preparat. En aquesta tesi s'han preparat les mostres a 100µg de proteïna, preparats a un volum final de 20 a 40µL segons la concentració proteica per analitzar hCNT1 i de 20µg en un volum de 20 µL per les demés. La preparació de la mostra conté

aigua miliQ i tampó de càrrega 5X (2% % SDS, 20% glicerol, 0,01% blau de bromofenol i 2,5 mM Tris-HCL pH 6,8 i un 5% de β -mercaptoetanol). Les mostres s'han d'escalfar a 37°C durant 30 minuts per l'anàlisi dels transportadors, o bé 7 minuts a 95°C per la resta de proteïnes solubles. Es carrega el total de volum als pous corresponents, juntament amb l'estàndard de pesos molecular *Precision Plus Protein Standard Dual Color* (Bio-Rad). L'electroforesi es produeix a amperatge constant de 40mA en cas de tenir un gel.

6.3.2 Transferència de proteïnes i bloqueig

Per poder detectar les proteïnes separades mitjançant anticossos cal transferir-les primer a una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF Inmobilon-P, Millipore). La membrana (6x9cm), s'ha d'activar prèviament amb un cicle de 15 segons en metanol, 2 minuts en aigua miliQ i temps indefinit en tampó de transferència. El tampó de transferència es prepara amb un 20% de metanol, 10% de tampó de transferència 10X (Tris base 250mM, glicina 1,92M) i aigua destil·lada.

Un cop acabada l'electroforesi, s'incuba breument el gel en tampó de transferència per tal d'equilibrar els ions i es procedeix al muntatge en un sistema Mini Protean (Bio-Rad). Es fa un sandvitx amb el següent ordre: (càtode) esponja, 3 membranes Whatman de 3mm, gel (només el resolutiu), membrana, 3 membranes Whatman i esponja (ànode). S'afegeix a la cubeta de transferència un suport amb gel, i s'omple amb tampó de transferència. La transferència es produeix a amperatge constant de 180mA durant 70 minuts, ja que el pes que es vol diferenciar és un pes al voltant dels 60-70kDa. Per comprovar que la transferència hagi estat adequada, es tenyeix reversiblement la membrana amb solució de *Ponceau*, la qual s'uneix a les proteïnes.

Abans de la immunodetecció, cal bloquejar la membrana per evitar les unions inespecífiques. La solució de bloqueig es prepara amb TBS (Tris base 20mM, NaCl 150mM a pH 7,6) Tween 20 al 0,1%, a la qual s'afegeix 5% de llet en pols desnatada (p/v). S'incuba la membrana durant mínim 1 hora a temperatura ambient, en agitació.

6.3.3 Immunodetecció i revelat

Per tal de immunodetectar les proteïnes desitjades, s'incuba la membrana amb l'anticòs primari corresponent (Taula 13) els quals es preparen amb solució de bloqueig anteriorment esmentada principalment. Aquesta és una incubació de tota la nit a 4°C

en rotació, excepte l'actina que es pot incubar 1 hora a temperatura ambient. Aquests anticossos, es recuperen i es guarden per a més usos. Un cop finalitzada la incubació, es renta 3 vegades la membrana durant 10 minuts amb TBS-Tween 20 en agitació per eliminar l'excés d'anticòs i a continuació s'incuba amb l'anticòs secundari corresponent. Aquest es dilueix en tampó de bloqueig i la incubació es fa a temperatura ambient, en rotació durant dues hores. Finalment, es repeteixen els 3 rentats de 10 minuts i ja es pot revelar la membrana. Aquest procés es basa en l'addició del reactiu de revelat ECL (*Enhanced Chemoluminescent Method*, Biological Industries), el qual conté peròxid d'hidrogen i luminol, la peroxidasa (que contenen els anticossos secundaris) catalitza una reacció que produeix llum, la qual pot ser detectada mitjançant una càmera fotogràfica d'elevada sensibilitat (Fujifilm), i enregistrada mitjançant el software Las-3000 (Fujifilm) en forma de fotografia. Aquestes són analitzades amb el programa PhotoShop (*Adobe Systems*).

6.4. Localització subcel·lular de proteïnes per immunofluorescència

La immunofluorescència és una tècnica que permet l'observació de l'expressió i la localització de proteïnes mitjançant la seva unió a anticossos específics units a un fluoròfor, els qual s'observen al microscopi confocal de fluorescència. Els anticossos utilitzats, junt amb les dilucions corresponents es recullen a la (Taula 13).

6.4.1 Immunofluorescència de cèl·lules en monocapa

Per a realitzar la immunolocalització de cèl·lules en monocapa, abans de la sembra i tractaments o transfeccions corresponents de les cèl·lules s'han de col·locar els cobreobjectes a cada pou de la placa MW24 i esterilitzar-los de 10 a 15 minuts amb raigs UV. Per preparar les mostres s'han de fer dos rentats amb PBS de 5 minuts, i s'incuben les mostres amb una solució de fixació (paraformaldehid al 4% en PBS) durant 15 minuts. De nou es realitzen dos rentats amb PBS, en aquest cas de 10 minuts i es permeabilitza la membrana durant 10 minuts amb una solució de Tween al 0.05% en PBS durant 10 minuts. Finalment es fan dos rentats de 5 minuts amb PBS. Posteriorment es bloquegen les mostres durant 20 minuts amb una solució de bloqueig (BSA 1% en PBS) i s'incuba amb l'anticòs primari 1h a temperatura ambient. Es realitzen dos rentats de 5 minuts amb PBS i s'incuba amb l'anticòs secundari durant una hora a temperatura ambient i protegit de la llum. Finalment es realitzen dos rentats iguals de nou i es procedeix al

muntatge de la mostra amb el medi de muntatge (Prolong® Gold antifade reagent) en un portaobjectes. Es deixa assecar la mostra 24h a temperatura ambient i protegida de la llum i es conserven les mostres a 4°C o es procedeix a l'observació de les imatges mitjançant el microscopi confocal LEICA SPE. L'anàlisi de les imatges obtingudes es realitza mitjançant el programa informàtic ImageJ (*Fiji Package*).

6.4.2 Immunofluorescència en esferoides

Per realitzar la immunofluorescència en els esferoides, el procediment varia del protocol en monocapa. En primer lloc, els esferoides es generen igual que el descrit a l'apartat 2 i a dia 7 es procedeix a la seva fixació. Aquest procés es realitza en un suport plàstic (Shandon base mold de Thermo Fisher Scientific), en el qual es diposita una petita quantitat d'OCT (Tissue-Tek Sakura) es recull l'esferoide de la placa i es col·loca sobre l'OCT, es poden col·locar més d'un esferoide de la mateixa condició experimental al mateix motlle. Tot seguit, es diposita el motlle sobre neu carbònica per tal que l'OCT es congeli de manera ràpida i es cobreix l'esferoide fins a omplir el motlle amb més OCT, es deixa que s'acabi de congelar tot el motlle i es guarden les mostres a -80°C. El següent pas és la realització de talls amb el criòstat. Es desemmotlla la mostra i s'enganxa amb una mica d'OCT al suport del criòstat, s'adapta el bisturí a la mida de la mostra i es realitzen els talls a 10µm, els quals s'enganxen als portaobjectes i es guarden a -80°C. En aquest moment les mostres ja estan preparades per realitzar la immunofluorescència. En aquest cas, cal deixar descongelar els portaobjectes de 20-30 minuts a temperatura ambient. Es fa un primer rentat amb H₂O miliQ directament sobre el portaobjectes. Amb el retolador Dako Pen (Dako) el qual no permet que els líquids s'escampin més enllà de la seva marca, es delimita l'esferoide. El protocol és el mateix que pels cultius en monocapa, tot i que tots els procediments es realitzen amb la disposició de les solucions en forma de gota sobre l'esferoide dins els límits marcats. La única variació, és que no es bloqueja la mostra. Després de la permeabilització es procedeix directament a la incubació de l'anticòs primari hCNT1-G7 i el secundari (alexa-488 o alexa-546). Finalment es realitza una tinció dels nuclis cel·lulars amb Hoechst (Sigma) fent una dilució 1:1000 a partir de l'estoc 1mg/mL durant 15 minuts.

Per realitzar la immunofluorescència en els esferoides sencers, es realitza el mateix protocol que amb les cèl·lules en monocapa, sense bloquejar la mostra. En aquest cas,

a dia 7 de creixement, els esferoides es recullen en un eppendorf, on es realitzarà tot el protocol de fixació, permeabilització i incubació dels anticossos. Finalment, per al muntatge d'aquestes mostres, es preparen els portaobjectes delimitant la zona amb esmalt per tal que al posar l'esferoide i el medi de muntatge no quedi xafat pel cobreobjectes.

6.4.3 Immunofluorescència en mostres clíniques de tumor

La detecció d'hCNT1 mitjançant les imatges d'immunofluorescència en les mostres clíniques de tumor, es va realitzar a partir de la resecció dels tumors de CRC i PDAC. La seva realització es fa seguint el mateix procediment descrit per a les mostres d'esferoides. Les mostres de teixit s'han fixat amb OCT i s'han congelat, posteriorment s'han realitzat talls amb el criòstat de 10µm i s'ha procedit a la immunodetecció amb l'anticòs primari hCNT1-policlonal, i secundari alexa-488, i la tinció de nuclis amb Hoechst.

Anticòs	Casa comercial	Dilució	Espècie	Pes molecular (kDa)
Anticòs primari				
AKT	Santa Biotechnology	Cruz 1:1000	Cabra	62
pAKT	Cell Signaling	1:1000	Conill	62
ERK	Cell Signaling	1:1000	Conill	44
pERK	Cell Signaling	1:1000	Conill	44
hCNT1 N17	Santa Biotechnology	Cruz 1:500	Cabra	60
hCNT1-G7	Santa Biotechnology	Cruz 1:500 WB 1:100 ICC	Ratolí	60
hCNT1-policlonal	Generat al laboratori	1:100	Conill	60
Actina	Sigma	1:2000	Conill	42
Anticòs secundari				
Anti-rabbit	BioRad	1:2000	Cabra	-
Anti-mouse	BioRad	1:2000	Conill	-
Anti-goat	Dako	1:5000	Conill	-
Alexa-488	Invitrogen	1:300	Cabra	-
Alexa-546	Invitrogen	1:300	Cabra	-

Taula 13. Anticossos utilitzats. Indicades les dilucions, l'espècie de secundari i el pes molecular detectat.

7. Anàlisi del perfil de cicle cel·lular

L'anàlisi del perfil de cicle cel·lular es realitza mitjançant citometria de flux, la qual permet detectar el DNA mitjançant la tinció de les cèl·lules. Per tal de realitzar aquesta tinció s'utilitza el iodur de propidi, que és un fluorocrom que s'intercala entre les bases

del DNA i l'RNA i que emet fluorescència a 617nm quan s'excita amb un làser de 538nm. En primer lloc, es tripsinitzen les cèl·lules i es centrifuguen 5 minuts a 1500rpm. Tot seguit es fa un rentat amb PBS 1X i després de tornar-les a centrifugar es resuspèn el pellet de cèl·lules amb 300µL de PBS 1X. El següent pas és la fixació de les mostres, la qual es realitza afegint 700µL d'etanol fred gota a gota, en agitació suau i constant. Les mostres es deixen en fixació a -20°C durant mínim 24 hores i màxim 15 dies. En el moment d'analitzar-les, es centrifuguen i es renten una vegada amb PBS 1X. Es resuspèn les cèl·lules amb 300µL de iodur de propidi (Sigma) 50µg/mL i RNasa (Roche) 10µg/mL. Després d'incubar 1 hora en foscor, es dipositen 200µL per pou en una placa MW96 i es processen en el citòmetre. Les dades s'analitzen mitjançant el software Summit® V3.1 Build844.

8. Assaig de viabilitat cel·lular

Els assajos de viabilitat en cultiu en monocapa es van realitzar sembrant les cèl·lules 24h abans del tractament amb cisplatí. 48 i 72 hores després es van tractar les cèl·lules amb concentracions creixents de gemcitabina. La viabilitat cel·lular es va determinar mitjançant el mètode MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) de Sigma-Aldrich. Es va calcular la IC50 mitjançant el software GraphPad Prism (La Jolla). Es va calcular també el coeficient d'interacció entre fàrmacs (CDI) per analitzar l'efecte combinat dels dos tractaments. Un CDI inferior a 1 determina sinergia entre els fàrmacs (menor de 0,7 és significatiu), mentre que un valor superior a 1 indica antagonisme.

La viabilitat cel·lular dels esferoides s'ha mesurat mitjançant el CellTiter-Glo® 3D *Cell Viability Assay* de Promega. Aquest mètode es basa en la mesura de l'ATP com a indicador de la viabilitat cel·lular, el qual genera una mesura de luminescència. Aquesta és mesurada pel lector. Per tal de realitzar l'assaig, s'afegeix un 10% del volum del pou de reactiu de CellTiter-Glo 3D i es deixa en agitació durant 20 minuts. Posteriorment s'incuba 10 minuts sense agitació i es passen 90µL a una placa MW96 blanca per tal de procedir a la lectura de la luminescència mitjançant el luminòmetre amb el protocol designat per promega per aquest kit.

9. Transport de nucleòsids

Per tal d'analitzar l'activitat específica dels transportadors, es realitza l'assaig de transport de nucleòsids radioactius. S'utilitza una mescla de substrats no radioactiu de concentració coneguda i una proporció de substrat marcat radioactivament, la incorporació d'aquest substrat radioactiu a les cèl·lules indicarà la quantitat de radioactivitat captat durant el temps de l'assaig. Les mesures de radioactivitat es mesuren amb la posterior lisi de les cèl·lules i la solubilització en líquid de centelleig. El temps de l'assaig emprat en aquesta tesi és d'un minut, ja que es un temps proper al rang de velocitat inicial dels transportadors de nucleòsids, en que la quantitat de substrat és directament proporcional al temps d'incubació. La concentració de substrat utilitzada és de $1\mu\text{Ci}$ i $1\mu\text{M}$ en cada cas.

9.1. Medis i reactius

Els transportadors concentratius de nucleòsids són dependents de sodi, per això per a realitzar l'assaig s'utilitzen dos tipus de medi, un de sodi i un que no en contingui, en aquest cas és un medi de colina. Per tal d'aturar l'assaig, s'utilitza un medi de parada o *stop*, el qual ha d'estar fred per afavorir l'aturada del transport. La composició d'aquests medis són:

- Medi sodi: NaCl 137mM, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄ i 10mM HEPES, a pH 7.4 ajustat amb Tris base 1M.
- Medi colina: 137mM clorur de colina, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄ i 10mM HEPES, a pH 7.4 ajustat amb Tris base 1M.
- Medi *stop*: NaCl 137mM i 10mM HEPES, a pH 7.4 ajustat amb Tris base 1M.

Els medis sodi i colina es suplementen amb el nucleòsid corresponent a analitzar, tant el fred (no radioactiu) com el radioactiu. Amb el nucleòsid fred (Sigma; estoc 1mM) s'aconsegueix la concentració final de $1\mu\text{M}$, mentre que el nucleòsid radioactiu permetrà que els nivells de radioactivitat siguin $1\mu\text{Ci}$. La radioactivitat utilitzada per marcar els nucleòsids és el triti (Moravek Inc), citidina; *Cytidine [5-³H(N)]*- amb concentració 1mCi/mL i en solució 1:1 d'etanol i aigua.

9.2. Assaig de transport en cèl·lules en monocapa

Per realitzar l'assaig de transport en monocapa es sembren les cèl·lules en plaques MW24, de cada condició es fan quadruplicats. El primer pas es un rentat amb 1mL de medi sodi o colina, corresponent a cada condició. L'assaig de transport s'inicia quan s'incuben les cèl·lules amb el medi que conté els nucleòsids radioactius. Per cada pou, s'afegeixen 250µL d'aquest medi, el qual es deixa durant un minut. Passat el temps d'incubació s'atura el transport retirant el medi radioactiu i afegint la solució *stop* freda. S'acaben d'aspirar les restes de medi que pugui quedar a la placa i en aquest punt es pot congelar la placa a -20°C o es pot procedir a la lisi cel·lular. Per a lisar les cèl·lules s'afegeixen 100µL de tampó de lisi (tritó X-100 0.5%, 100mM NaOH) i s'incuba en agitació durant una hora a temperatura ambient. Passat el temps d'incubació s'homogeneïtza cada pou amb l'ajuda d'una pipeta multicanal i es traspassen 90µL del volum en un tub amb 3mL de líquid de cintil·lació (EcoscintTMH, National Diagnostics) pel comptatge radioactiu, els 10µL restants s'utilitzen per determinar la concentració proteica. Per tal de calcular els valors de radioactivitat cal diluir 5µL de medi radioactiu (per triplicat) en líquid de cintil·lació per tal de valorar l'activitat específica de la radioactivitat emprada. La mesura de la radioactivitat es realitza mitjançant un comptador beta que proporciona les desintegracions per minut (dpm) de l'isòtop radioactiu.

9.3. Valoració proteica pel mètode BCA

Per tal de corregir els valors de transport per la concentració proteica de cada punt, es realitza la valoració proteica pel mètode BCA (àcid bicinconínic), Pierce i així s'obtenen els valors de transport per microgram de proteïna. Els 10µL recollits de cada pou es dipositen a una placa MW96, juntament amb un patró de dilucions d'albumina sèrica de 0 a 2 mg/mL, la qual s'emprarà per extrapolar les concentracions proteiques de cada punt. El BCA utilitzat conté dues solucions que es mesclen a proporció 50:1 dels quals s'afegeixen 200µL a cada pou. S'incuba la placa durant 30 minuts a 37°C i posteriorment 10 minuts a temperatura ambient. Es llegeix l'absorbància a 550nm.

9.4. Càlculs d'activitat específica

Els càlculs d'activitat específica i d'activitat de transport es realitzen amb les següents fórmules:

$$AE \left(\frac{\text{dpm}}{\text{pmol}} \right) = \frac{\text{dpm estàndard}}{\text{volum estàndard} \times [\text{substrat}]}$$

$$\text{Activitat} \left(\frac{\text{pmol}}{\text{mg prot}} \right) \times \text{min} = \frac{\text{dpm mostra} \times 10^3}{AE \times \text{volum mostra} \times [\text{proteïna}] \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right)} \times \text{min}$$

10. Estudis del creixement tumoral

Els tumors xenografts s'han desenvolupat mitjançant la injecció subcutànea de 6×10^6 cèl·lules per la línia BCLC12 o 4×10^6 cèl·lules EGI-1 al flanc posterior dels ratolins atòmics (Charles River France, France). El volum del tumor es mesura tres vegades a la setmana i es calcula mitjançant la següent fórmula $V(\text{mm}^3) = \pi/6 \times W \times L^2$ on L i W es corresponen a la llargada i a l'amplada del tumor respectivament. Una vegada els tumors arriben a mesurar 100 mm^3 , els ratolins es separen de manera aleatòria en grups de 6 i es tracten mitjançant injecció intraperitoneal de salí, 2mg/kg de cisplatí o 4 mg/kg de cisplatí. Per la combinació de fàrmacs s'han desenvolupat només tumors a partir de la línia EGI-1, els ratolins han estat dividits en grups de 4 ratolins i quan els tumors mesuren 70 mm^3 es tracten amb cisplatí (4mg/kg) i 48h després amb gemcitabina (100mg/kg) mitjançant injecció subcutània. La mesura dels tumors s'ha realitzat durant 15 dies fins al final del segon cicle de tractament. Tots els procediments amb animals han seguit les guies del *European Community Directive 86/609/EEC* i van ser prèviament aprovades pel Comitè Ètic Local.

11. Estadística

L'anàlisi estadístic de les dades obtingudes s'ha realitzat mitjançant el programa GraphPad Prism (La Jolla). El test estadístic utilitzat depèn del disseny experimental. En els dissenys on es comparen un grup amb el seu corresponent control s'ha utilitzat el test t-Student, determinant el p valor: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.005$ (***), $p < 0.001$ (****). En el disseny experimental per a comparació de més grups s'ha utilitzat el test de multivariants ANOVA, amb correcció del test post-hoc Tukey. Determinant les mateixes condicions del p valor.

A watercolor splash graphic with a mix of yellow, orange, and light blue colors, positioned to the left of the text.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. Determinar *in silico* els miRNA candidats a regular l'expressió de les proteïnes hCNT1 i hCNT2 en càncer colorectal, adenocarcinoma ductal pancreàtic i hepatocarcinoma

El mecanisme d'acció dels miRNAs es basa en la seva unió a l'extrem 3'UTR del seu gen diana per tal de regular-ne la seva expressió, ja sigui reprimint l'mRNA del gen transitòriament o bé degradant-lo. El primer pas per tal de desenvolupar la hipòtesi i els objectius del projecte, va ser determinar quins miRNAs es podien estar unint a l'extrem 3'UTR dels mRNAs dels transportadors hCNT1 i hCNT2. Per realitzar aquest anàlisi, es van utilitzar diferents eines bioinformàtiques de predicció de possibles dianes dels miRNAs. A més d'utilitzar aquests programes bioinformàtics, també es va tenir en compte l'expressió descrita dels miRNAs en els teixits tumorals a estudiar: càncer colorectal (CRC), adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) i hepatocarcinoma (HCC). Aquesta informació es va generar amb dades pròpies i amb una cerca bibliogràfica de l'expressió dels miRNAs que tenien llocs putatius d'unió al 3'UTR dels missatgers dels transportadors.

1.1 Variants gèniques d'hCNT1

L'anàlisi dels mRNAs descrits en bases de dades va posar en evidència que existien diverses variants gèniques del transportador hCNT1. Així al procedir a l'anàlisi dels miRNAs amb diversos programes bioinformàtics de predicció, es va posar de manifest que cada programa utilitzava alguna d'aquestes variants per determinar els microRNAs candidats i aquestes no sempre eren coincidents. Es van analitzar les variants presents tant a Ensembl com a Genbank. A la primera hi havia quatre transcrits descrits per *SLC28A1*. hCNT1 no és l'únic transportador de la família *SLC28* que presenta més d'un transcrit. Pel que fa als altres transportadors concentratius, s'han descrit també diverses variants. hCNT2 té descrites dues seqüències que codificarien per proteïnes, encara que només s'ha descrit un 3'UTR per aquest transportador. Un fet a destacar, és que segons Ensembl, també hi hauria un transcrit, el qual seria un lncRNA (*long non-coding RNA*) de 1567bp, el qual podria tenir algun paper regulador. Pel que fa a hCNT3, s'hauria descrit només una proteïna, i un transcrit independentment de 514bp, però de nou només un

únic 3'UTR. Pel que fa a la família *SLC29*, tant per hENT1 com per hENT2 també s'han descrit diversos transcrits diferents, en el darrer, a més s'han observat dos extrems 3'UTR diferencials tal i com succeeix a hCNT1. Els extrems 3'UTR d'hENT2 de 1120 i 969bp tot i ser bastant llargs comparant-los amb els d'hCNT1 gairebé no tindrien llocs d'unió putatius a miRNAs, per tant es posa de manifest la importància de la regulació, en aquest cas, d'hCNT1. Pel que fa a aquest transportador, el primer transcrit descrit (ENST00000394573.6/NM_004213.5) és el que es correspon a la proteïna canònica d'hCNT1, amb 19 exons i que codifica per a una proteïna de 649 aminoàcids d'onze dominis transmembrana, un extrem C-Terminal extracel·lular i un N-Terminal llarg intracel·lular (Figura 17). La segona variant (ENST00000338602.6) es correspon a un transcrit de 7 exons (Figura 17), el qual si es traduís codificaria per una proteïna de 175 aminoàcids, i només tindria els dos primers dominis transmembrana, fet que permet anticipar que l'activitat transportadora estaria limitada. Aquesta possible proteïna també li mancava l'extrem extracel·lular C-Terminal (Figura 17). Una tercera variant, codificaria per una proteïna de 483 aminoàcids igual, però amb un transcrit de 15 exons. Finalment la darrera variant es correspon a un transcrit que li manca un exó i que codificaria una proteïna de 649 aminoàcids igual que la canònica.

Es van analitzar també les variants descrites, en aquest cas a la base de dades Genbank, segons la qual, hi ha 6 variants d'hCNT1. Amb la seqüència procedent del Genbank es van analitzar les diferències entre cada transcrit descrit. La primera, tal i com s'havia observat a l'Ensembl, es correspondria al transportador concentrariu de nucleòsids hCNT1 canònic, la qual s'anomenarà en aquesta tesi com hCNT1 variant 1 (hCNT1 V1). La variant 2, també es correspondria amb la descrita a Ensembl amb només 7 exons. La variant 3, li mancava l'exó 2, el 13, el 15 i el 16, quedant-se així amb 15 exons en total. La variant 4 li mancava l'exó 2, però codificaria per la mateixa proteïna que la variant 1. Les variants 5 i 6 descrites a Genbank tindrien una seqüència diferencial al final de la regió codificant. Les diferències entre les variants s'estén també al seu extrem 3'UTR ja que aquestes es caracteritzen per tenir un 3'UTR diferent, amb llocs d'unió de miRNAs no coincident, encara que algunes d'elles comparteixen el mateix. L'extrem 3'UTR d'hCNT1 V1 té 596 parells de bases, i és el mateix que les variant 3 i 4. Mentre que les variants 5 i 6 tenen un 3'UTR més curt, de 183bp la variant 5, mentre que la variant 6 tindria els darrers 104bp del 3'UTR de la variant 5. Curiosament, l'extrem 3'UTR de la

variant 2 és força més llarg que totes les altres, amb 2862 parells de bases. Fet que permetria la unió de més quantitat de miRNAs degut a la seva llargada. Aquesta variant doncs, seria la que més diferències presentaria amb el transcrit de la proteïna hCNT1 canònica. Per tant, la variant 2 codificaria per una proteïna molt més curta, amb només el domini N-Terminal fins als dos primers dominis transmembrana, i amb un 3'UTR molt més llarg que el de la variant 1.



Figura 17. Esquema representatiu dels transcrits de les dues variants d'hCNT1. Representació dels exons i introns, i l'extrem 3'UTR.

Aquests dos fets, la presenten de manera interessant, en primer lloc, perquè la proteïna que codificaria li mancarien els dominis necessaris per realitzar l'activitat de transportador, però no es pot descartar que aquesta pugui realitzar la funció de transceptor. S'anticiparia doncs un possible paper d'aquesta variant en la regulació d'altres proteïnes o inclús de la proteïna hCNT1 canònica a nivell transcripcional. En segon lloc, considerant també el llarg extrem 3'UTR, podria haver-hi un accés a la regulació per miRNAs més extensa, o inclús la capacitat de segrestar diversos miRNAs, provocant així una regulació sobre l'acció d'aquests en altres transcrits. La manca d'informació descrita referent a la variant 2 d'hCNT1 va generar la necessitat de caracteritzar aquesta variant, així com determinar el paper que tindrien les dues en el procés carcinogènic i de com podria estar afectant la presència d'una variant sobre l'altre. La primera aproximació va ser realitzar una recerca d'informació sobre l'expressió d'aquesta variant en teixit tumoral. Per això es van cercar estudis amb dades públiques i accessibles de teixit tumoral versus teixit sa de tumors gastrointestinals on es pogués analitzar l'expressió d'aquesta variant d'hCNT1. Es va analitzar l'expressió de les dues variants d'hCNT1 en teixit sa i teixit tumoral aparellat de colangiocarcinoma. Segons les dades públiques del GEO (*Gene Expression Omnibus*) es va observar una clara disminució de les dues variants en teixit tumoral de colangiocarcinoma (CCA), essent més evident per a hCNT1 V2 (Figura 18).

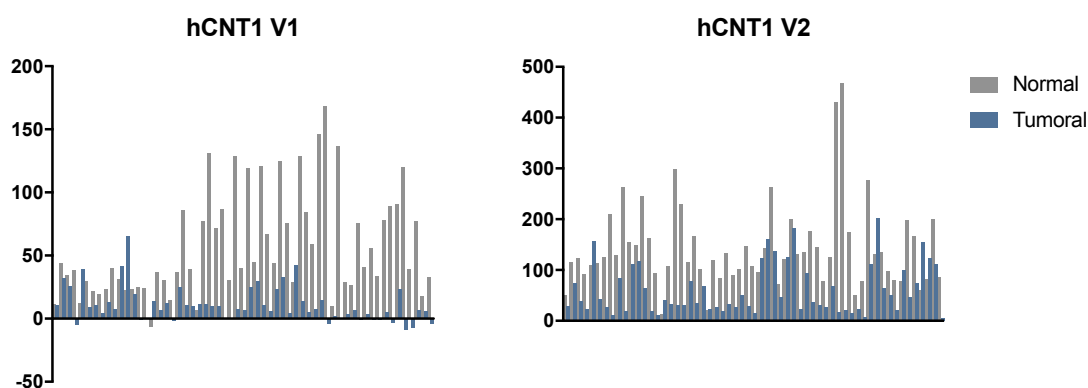


Figura 18. Expressió de les dues variants d'hCNT1 a colangiocarcinoma. Disminució de l'expressió de les dues variants d'hCNT1 en teixit tumoral de colangiocarcinoma hCNT1 V1 (A), hCNT1 V2 (B). Dades extretes de GSE45001 Sulpice *et al*; Genomics Data, 2016.

En base a aquests resultats, es va voler determinar si en cèl·lules no tumorals on se sap que s'expressa hCNT1 hi ha també expressió de la variant 2. Està descrit que els hepatòcits expressen el transportador hCNT1, per tant, es va analitzar també els nivells d'expressió de la variant 2 d'hCNT1 en mostres d'hepatòcits humans a diferents temps per tal d'analitzar quina expressió tenia la variant 2. L'expressió d'hCNT1 en hepatòcits a diferents temps, ja s'havia mostrat més abundant en els hepatòcits acabats d'aïllar i s'observava una pèrdua d'expressió en els dies posteriors, la qual es recuperava als temps més tardans, a partir del dia 4. Pel que fa als resultats d'expressió de la variant 2, van mostrar una menor expressió d'aquesta a tots els temps analitzats en comparació amb la variant 1, essent aquesta diferència més evident a l'inici, però en tots els casos, va seguir el mateix perfil de canvi d'expressió que la variant 1 (Figura 19).

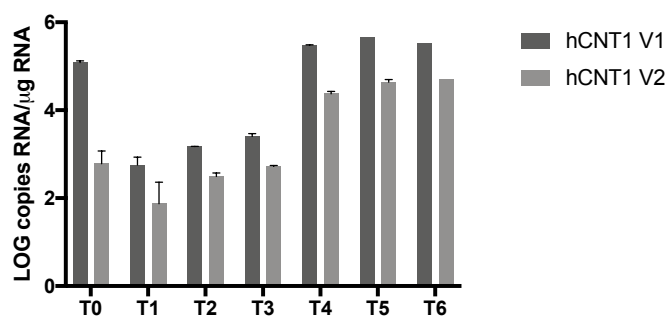


Figura 19. Expressió de les variants d'hCNT1 en hepatòcits humans determinats per RT-PCR absoluta. Expressió del mRNA endogen d'hCNT1 V1 i V2 en hepatòcits humans a diferents temps, essent T0 els hepatòcits extrets del pacient i aïllats i els dies posteriors que els hepatòcits van estar en cultiu. Valors representats com la mitjana de triplicats \pm DS (n=1).

Amb l'evidència que aquesta variant s'expressava a teixits com el fetge, i que també estava alterada en tumors com el CCA, en primer lloc es va determinar l'expressió d'hCNT1 V2 en les línies tumorals derivades de CCA mitjançant el mètode de RT-PCR, ja que s'havia observat aquesta variant en aquest tipus de tumor. Es va observar aquesta variant en les tres línies analitzades (EGI-1, BCLC12 i TFK1) i es va seleccionar la línia BCLC12, ja que retenia més l'expressió d'hCNT1 V2 (Figura 20), per tal de procedir a la clonació d'aquesta variant i així disposar de l'eina necessària per a caracteritzar-la.

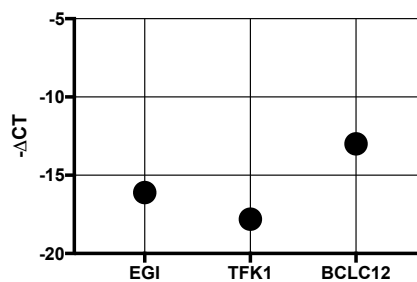


Figura 20. Expressió basal de l'mRNA d'hCNT1 V2 en línies derivades de CCA. Expressió de l'mRNA endogen d'hCNT1 V2 en les línies derivades de CCA EGI, TFK1 i BCLC12 analitzades per RT-PCR. Valors representats com la mitjana de les replicacions \pm DS d'una sola mostra per línia cel·lular.

Mitjançant la tècnica de PCR es va clonar la seqüència d'hCNT1 V2 a partir de cDNA de la línia BCLC12 tal i com s'indica a l'apartat de Materials i Mètodes d'aquesta tesi i es va inserir als vectors pcDNA 3.1, pcDNA 3.1+C-HA i pEGFP-N3 amb els enzims de restricció corresponents. D'aquesta manera es disposa de la variant en un vector control, un amb el tag HA i un amb la proteïna fluorescent GFP, tres eines que en faciliten la detecció amb diverses tècniques.

Per tal d'analitzar el paper de la variant 2 en la carcinogènesi, es va escollir una línia derivada de CRC, HT29 ja que és un dels models tumorals més ben estudiats al laboratori en la regulació de l'expressió d'hCNT1, i es van transfectar les dues variants d'hCNT1, considerant el possible efecte regulador de la variant 2. Per tal d'avaluar l'expressió de les dues variants, tant amb la transfecció corresponent, com amb la transfecció de l'altra variant, es van realitzar transfeccions a diferents temps: 6, 12, 24, 36 i 48 hores, i es van analitzar els nivells d'expressió mitjançant RT-PCR quantitativa de les dues variants. D'aquesta manera, es volia observar quin paper jugava l'expressió d'una variant sobre l'altra, i determinar així si hi podia haver algun tipus de regulació entre les dues. Els

resultats van mostrar un increment de les variants amb les respectives transfeccions a tots els temps analitzats (Figura 21).

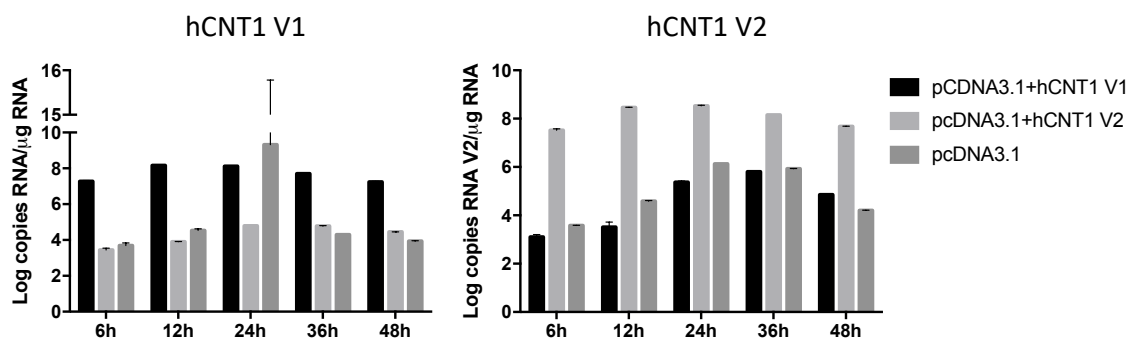


Figura 21. Expressió de les variants d'hCNT1 amb les corresponents transfeccions a diferents temps. Anàlisi de l'mRNA d'hCNT1 V1 i V2 per RT-PCR absoluta. Les transfeccions es van realitzar 24h post-sembra de les cèl·lules i es van analitzar a diferents temps post-transfecció (6, 12, 24, 36 i 48h). Expressió d'hCNT1 V1 (A) i d'hCNT1 V2 (B). Valors representats com les rèpliques d'un sol experiment ± DS.

Tot i que hi va haver algun problema amb la transfecció del vector control pCDNA3.1 a les 24h en el cas de V1, en general es pot afirmar que les transfeccions de les dues variants són eficients augmentant l'expressió d'aquestes. Per altra banda, la hipòtesi d'un possible joc de regulació entre variants no es va confirmar amb aquests resultats, ja que no es van observar efectes sobre la variant 2 amb la transfecció de la variant 1 ni a la inversa. Aquest, però, és una anàlisi preliminar que s'hauria de repetir per confirmar aquests resultats.

La següent anàlisi per la caracterització de la variant 2 d'hCNT1, va ser comprovar l'expressió de les dues variants a nivell proteic. Per això es van realitzar dues validacions, la comprovació mitjançant WB i la transfecció amb marcatge fluorescent per determinar-ne la localització subcel·lular. En quant a l'anàlisi per WB, es va efectuar a la línia HT29 amb la transfecció de la variant 2 d'hCNT1 tant amb el vector pCDNA3.1 com amb el que conté el tag HA. Els resultats van mostrar que al transfectar hCNT1 V2 amb els dos vectors s'obtenia un increment de la seva expressió (Figura 22).

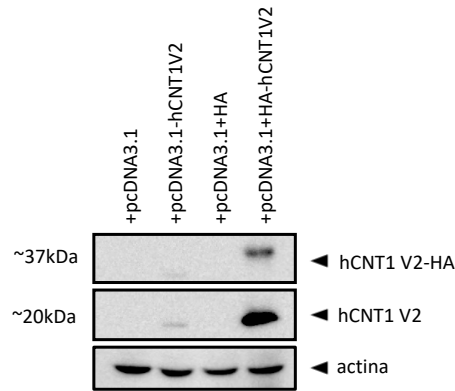


Figura 22. Expressió de la variant 2 d'hCNT1 amb la seva transfecció en el vector pcDNA3.1 i amb el vector pcDNA3.1+C-HA. Les cèl·lules es van transfectar amb els vectors que contenen hCNT1 V2 i es van analitzar per WB 48h després a la línia HT29. Imatge de WB d'un sol experiment. Revelat amb l'anticòs d'hCNT1-N17.

Per tal de determinar la localització cel·lular de les dues variants, aquestes es van transfectar mitjançant els vectors amb el marcatge fluorescent, RFP per variant 1 i GFP per variant 2, en la línia HEK293. Els resultats van mostrar una localització molt dispersa en quant a la variant 1, mentre que per variant 2 es podria intuir més a membrana tot i que també es troba a citoplasma (Figura 23). Caldria valorar la localització de les dues amb el marcatge específic de membrana.

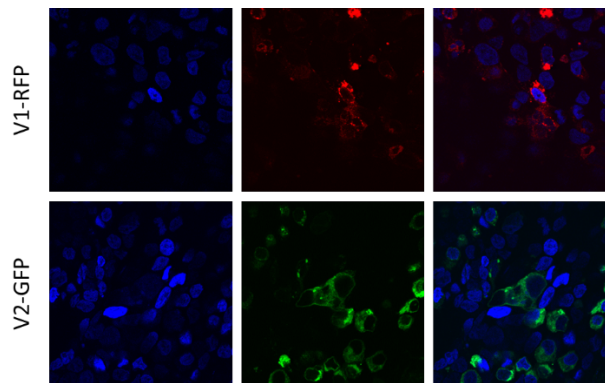


Figura 23. Localització subcel·lular de les variants d'hCNT1. Les imatges es van captar a les 48h posteriors a la transfecció dels vectors amb les corresponents variants d'hCNT1 i el marcatge RFP per V1 i GFP per V2 a la línia HEK293. Imatges d'immunofluorescència representatives de tres experiments independents. Marcatge d'hCNT1 V1 amb vermell (RFP) i hCNT1 V2 amb verd (GFP). Magnificació x63.

Amb la confirmació que hCNT1 V2 s'expressava correctament al transfectar-la, es va analitzar si aquesta variant podria tenir activitat de transport. Segons la seqüència del transcrit d'aquesta variant, la proteïna de 175 aminoàcids, tindria només els dos primers dominis transmembrana. Degut que l'activitat de transport s'atribueix, en part, als dominis transmembrana 4-7, ja que en aquests dominis hi ha els llocs de reconeixement

de substrat i de l'ió sodi, s'esperaria que la variant 2 no tingués activitat transportadora. A més, els dos primers dominis transmembrana formarien part del anomenat domini N-Terminal, el qual s'ha demostrat que no és essencial per la funció de transport, ja que els ortòlegs procarïotes no el tenen i segueixen mantenint l'activitat transportadora dels CNTs. A més, es va demostrar que una proteïna truncada per aquest domini seguia mantenint l'activitat de transport (Hamilton et al. 2001). En aquest cas, l'anàlisi del transport es va realitzar a les línies cel·lulars HEK293 i Huh7, considerant que la línia HT29 havia presentat anteriorment alguns problemes en la detecció de l'increment d'activitat de transport. Es van transfectar les dues variants del transportador i es va mesurar el transport de citidina. Els resultats van mostrar un increment de l'activitat transportadora amb la transfecció de la variant 1 d'hCNT1 a les dues línies cel·lulars analitzades, mentre que la transfecció de la variant 2 es mantenia sense activitat de transport també a les dues línies emprades (Figura 24). Per tant, es pot dir que la variant 2 d'hCNT1 no tindria activitat de transport si s'expressés la proteïna d'aquesta variant.

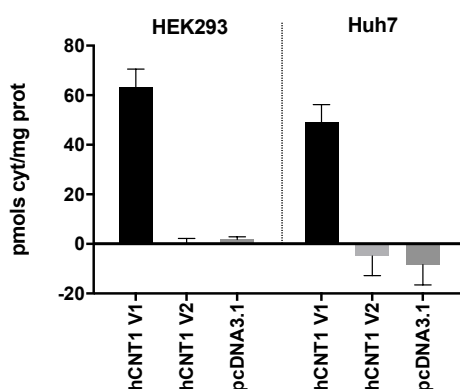


Figura 24. Activitat de transport de les variants d'hCNT1 a les línies cel·lulars HEK293 i Huh7. L'activitat de transport es va valorar a les 48h post-transfecció amb els vectors corresponents a cada variant d'hCNT1 i el control del vector buit pcDNA3.1. L'assaig de transport va valorar l'entrada de citidina tritiada, calculada a partir de la diferència de valors en medi sodi o colina. Valors representats com la mitjana de les replicues \pm ES d'un sol experiment.

Amb aquestes primeres aproximacions, es va començar a caracteritzar la variant 2 d'hCNT1. Tot i que es desconeix encara quina funció tindria aquesta variant del transportador, la hipòtesi seria que estes exercint les funcions de transceptor o algun altre tipus de regulació. Ja que els dominis pels quals codificaria aquest transcrit, són part dels tres dominis addicionals adquirits en humans, els quals s'ha vist que són necessaris per realitzar altres funcions més enllà de la del transport com la interacció intracel·lular amb altres proteïnes, el tràfic del transportador fins la membrana o fins i

tot la senyalització cel·lular (Errasti-Murugarren et al. 2010, Pinilla-Macua, Casado and Pastor-Anglada 2012, Huber-Ruano et al. 2010).

Les característiques i les possibles funcions d'aquesta variant d'hCNT1 s'haurien de seguir estudiant i validant. Tot i que pel que fa a la determinació de la regulació d'hCNT1 mitjançant els miRNAs, es va seguir l'estudi preferiblement amb la variant canònica d'hCNT1, ja que és la que té capacitat transportadora i està totalment caracteritzada. No es descarta el fet de prosseguir l'estudi de la regulació pels microRNAs en la variant 2 d'hCNT1 una vegada s'hagi validat aquesta regulació per la proteïna descrita d'hCNT1 (variant 1), i s'hagi caracteritzat completament la variant 2. Considerant que l'extrem 3'UTR de la variant 2 d'hCNT1 és més llarg que la del transportador canònic i per tant està subjecta a tenir força regulació per part dels microRNAs, es va determinar aquesta possible regulació per part dels miRNAs, mesurant l'activitat luciferasa de l'extrem 3'UTR de les dues variants. L'assaig luciferasa consisteix en la clonació del 3'UTR del transportador en un vector d'expressió a l'extrem 3'UTR del gen de la luciferasa per tal de valorar l'activitat luciferasa mitjançant l'anàlisi de la luminescència en diferents condicions. El primer pas, va ser la clonació dels 3'UTR d'hCNT1 de les dues variants en l'esmentat vector amb el gen de la luciferasa i una vegada clonat es va procedir a realitzar l'assaig 48 hores post transfecció amb cadascun dels dos extrems 3'UTR clonats. L'anàlisi de l'assaig luciferasa es basa en que si els miRNAs s'estan unint al 3'UTR d'hCNT1, hi haurà una disminució de la luminescència emesa comparada amb el vector utilitzat com a control positiu (PGL3-promoter), el qual conté un promotor fort que farà que sempre es tradueixi el gen de la luciferasa i per tant emeti luminescència. Els resultats amb aquesta primera aproximació, van mostrar una disminució de l'activitat luciferasa respecte el PGL3-promoter, tot i que va ser molt evident amb la variant 2 (Figura 25). Aquests resultats van confirmar que les dues variants podrien estar subjectes a la regulació per miRNAs al seu extrem 3'UTR. A més, van evidenciar que el llarg extrem 3'UTR de la variant 2 està sotmès a una forta repressió, fet rellevant a tenir en compte.

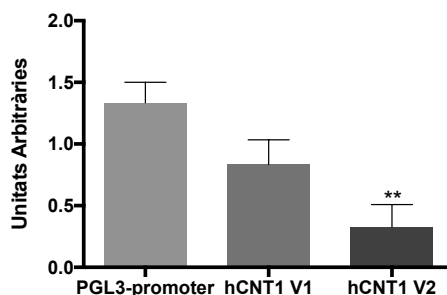


Figura 25. Activitat luciferasa del 3'UTR de les dues variants d'hCNT1 respecte el vector PGL3-promoter. Les cèl·lules es van co-transfectar amb el vector luciferasa PGL3-promoter i el que conté el 3'UTR d'hCNT1 V1 i hCNT1 V2 i el vector pRL-TK (renilla), que és el control endogen de transfecció. L'assaig luciferasa es va realitzar a les 48h post transfecció mesurant l'activitat luciferasa del vector i de la renilla. Els resultats es mostren com el quocient entre les dues activitats. Valors representats com a mitjana ± ES de quatre experiments independents.

Aquestes observacions, van portar a pensar que un possible rol alternatiu d'aquesta variant seria actuar d'*sponge* d'alguns miRNAs i així poder regular indirectament l'expressió d'altres gens, o fins i tot del mateix hCNT1 V1. Existeixen molts lncRNA (*long non-coding RNA*), RNAs que no s'arriben a traduir, que actuen com a *sponge* de miRNAs, i regulen així l'expressió d'altres gens. Aquests poden tenir efectes sobre molts processos, com és el cas del lncRNA FGD5-AS1 que intervé en la proliferació i migració cel·lular segrestant el miR-302e en CRC (Li et al. 2019). En el cas de PDAC, també s'han descrit diversos *sponges* de lncRNA com el RNA SNHG1 que en aquest cas, segresta el let-7b-5p (Li et al. 2020). A més, la regulació d'aquests sobre els miRNAs no es limita al bloqueig de l'acció d'un miRNA individual, sinó que els *sponges* poden bloquejar més d'un miRNA alhora, i per tant actuar sobre diverses dianes. La utilització d'aquests lncRNA podrien suposar una eina per la regulació de l'expressió dels miRNAs en carcinogènesi, modulant així aquests nivells en tumor i controlant d'aquesta manera els gens diana dels miRNAs (de Melo Maia et al. 2015).

1.2 Determinar els microRNAs candidats

L'expressió aberrant dels microRNAs en teixit tumoral, s'ha relacionat amb possibles efectes en la carcinogènesi, com alteracions en la proliferació cel·lular, o en la transició EMT, entre altres (Chi and Zhou 2016). Alguns miRNAs s'expressen menys en teixit tumoral, deixant de reprimir així l'mRNA d'alguns dels seus gens diana, mentre que altres estan sobreexpressats i poden suprimir l'acció d'alguns gens. L'alteració de l'expressió dels miRNAs en càncer pot provocar que aquests afavoreixin el procés carcinogènic, en

funció de la diana que tinguin i de com estigui alterada la seva expressió. En aquest sentit, poden actuar com a oncomiRs o com a supressors tumorals.

Per tal de determinar els microRNAs candidats a regular l'expressió d'hCNT1, es van analitzar diverses bases de dades i programes de predicció de dianes dels microRNAs, així com la cerca bibliogràfica d'expressió dels miRNAs en els tres tipus de tumors (Li et al. 2012, Sun et al. 2014, He, Zhang and Wei 2015a).

La primera selecció es va realitzar a través de la base de dades miRWalk, la qual considera diverses bases de dades públiques de predicció de dianes de microRNAs. Entre elles hi ha el TargetScan, RNA22, Pictar, Microcosm, TarBase, Diana, miR-Path, Ingenuity, PITA i RNAHybrid. D'entre tots els candidats obtinguts en més de tres bases de dades, es va fer una primera selecció tenint en compte que aquests miRNAs estiguessin sobreexpressats en CRC, PDAC i HCC segons dades pròpies i bibliogràfiques. Com que la hipòtesi del treball és que hCNT1 i hCNT2 es perden durant el procés carcinogènic, també es va considerar que la seva unió fos comú als dos extrems 3'UTR dels transportadors.

Degut a que algunes de les bases de dades utilitzades no especificaven quin extrem 3'UTR s'estava considerant, es van re-analitzar aquests candidats amb aquelles que permeten la predicció introduint directament la seqüència 3'UTR a analitzar. En aquest cas es van utilitzar les eines RNAHybrid, PITA i miRmap. Es va utilitzar la seqüència de l'extrem 3'UTR d'hCNT1 i hCNT2 procedent d'*Ensembl* amb referència NM_001287762.1 i NM_004212.4 respectivament i les seqüències dels miRNAs candidats es van extreure de la base de dades miRBase. En tots els casos es van confirmar els miRNAs identificats prèviament. Amb aquesta anàlisi es van generar els següents candidats:

Transportador	miRNA	Posició 3'UTR	Seqüència d'unió
SLC28A1	miR-10b	550	UAGGUUUGG C AC GGGU GUUUUAGCC G UG CCCA
	miR-106a	10	UGCUUGUGCU GCGCUU AUGGACGUGA CGUGAA
	miR-106b	20	UCUGCGC UG GGC UU AGACGUG AC UCG AA
	miR-122	183	GGACA UGUC CACUCCA UUUGU ACAG GUGAGGU
	miR-15b	4	AGA CAUG UGUGCU CUG UUU GUAC ACACGA GAU
	miR-150	129	AUUGG AAGGGUU GGAG UGACC UGCCAA CCUC
	miR-17	10	UGCUUGUGCU GCGCUU AUGGACGUGA CGUGAA
	miR-18a	64	CCCCACUUCCC GGGUGGAAGGG
	miR-20a	10	UGCUUGUGCU GCGCUU AUGGACGUGA CGUGAA
	miR-424	3	CAGAACAUG UGCU CUG GUUUUGUAC ACGA GAC
	miR-9	365	CACCAAAGC GUGGUUUCG
SLC28A2	miR-10b	2172	ACGAGUUUGGG CU GGGGUG UGUUUAGCCU GA UCCCAU
	miR-106a	159	UGCCUGUA AGCACUUU AUGGACGU UCGUGAAA
	miR-106b	156	UC UGC CUGU CAGCACUUUG AG ACG GACA GUCGUGAAU
	miR-122	725	CAAACACCA UGUU CACUC GUUUGUGGU ACAG GUGAG
	miR-15b	1117	UGUGA CA GUGUGCU ACAUU GU UACACGA
	miR-150	813	U UGG UGAGGG GGGAGG G ACC GUUCCC CCCUCU
	miR-17	159	UGCCUGUA AGCACUUUG AUGGACGU UCGUGAAC
	miR-18a	58	UGUU UGUACU GGGUGC CC AUAG ACGUGA UCUACG GG
	miR-20a	159	UGCCUGUA AGCACUUUG AUGGACGU UCGUGAAU
	miR-424	1637	AAACGU AAUUG UGCUG UUUGUA UUAAC ACGAC
	miR-93	159	UGCCUGUA CAGCACUUUG AUGGACGU UCGUGAAC

Taula 14. miRNA candidats a regular hCNT1 (SLC28A1) i hCNT1 (SLC28A2) als tumors de CRC, PDAC i HCC. La seqüència de dalt es correspon a la del miRNA i la de baix a la del 3'UTR del transportador corresponent. Els espais en blanc es corresponen a parells de bases no coincidents entre els miRNAs i el 3'UTR.

Tots els miRNAs es van considerar per a la validació als tres tipus de tumor, excepte el miR-9 i el miR-93 que van ser candidats exclusius d'HCC. En aquest cas per HCC no es van considerar el miR-15b, el miR-150, el miR-122 ni el miR-424 en aquests tipus de tumor.

Amb aquestes dades, es va procedir a l'anàlisi d'expressió i validació d'hCNT1 i hCNT2 com a dianes dels microRNAs candidats per a CRC, PDAC i HCC.

2. Avaluar l'expressió dels miRNA i d'hCNT1 i hCNT2 en mostres aparellades de teixit sa i tumoral en càncer colorectal, pancreàtic i hepatocarcinoma

La primera aproximació després de determinar *in silico* els diversos microRNAs candidats a unir-se a l'extrem 3'UTR dels transportadors concentratius de nucleòsids, va ser avaluar l'expressió tant dels miRNAs candidats com dels transportadors. Aquesta anàlisi es va fer en mostres clíniques aparellades de teixit tumoral i teixit no tumoral adjacent de CRC, PDAC i HCC. Les mostres van ser facilitades des del Biobanc de l'IDIBAPS-Hospital Clínic. Les reseccions tumorals es van obtenir a partir de cirurgies rutinàries a l'Hospital Clínic. Totes les mostres tenien el corresponent informe previ de consentiment dels pacients. Amb els resultats obtinguts, es van calcular les correlacions entre els nivells d'expressió de miRNAs de cada mostra i els nivells d'mRNA dels transportadors. Considerant el mecanisme d'acció dels miRNAs, així com l'increment aberrant d'aquests en càncer, per tal de valorar una possible regulació dels transportadors per part dels miRNAs, s'esperaria una correlació negativa entre els dos, ja que a més expressió del microRNA, hi hauria una repressió de l'mRNA del transportador i per tant una menor expressió d'aquest.

2.1 Expressió en mostres aparellades de teixit sa i tumoral

2.1.1 Expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hCNT3

La pèrdua d'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids durant el procés carcinogènic, ha estat observada en diferents tipus de tumors, com els ginecològics o el colangiocarcinoma (Farre et al. 2004, Urtasun et al. 2017). Per tal de validar aquesta pèrdua en les neoplàsies estudiades, es van analitzar l'expressió dels tres transportadors concentratius de nucleòsids en mostres aparellades de teixit tumoral i teixit no tumoral adjacent en CRC, PDAC i HCC. En tots els casos les mostres es corresponien a tumors reseccables no tractats. Es va analitzar els nivells de missatger dels transportadors concentratius mitjançant *Real Time*-PCR (RT-PCR) en 17 mostres aparellades de CRC, 10 de PDAC i 22 d'HCC. L'expressió a nivell de missatger d'hCNT1 va mostrar una disminució en tumor a les mostres clíniques dels tres tipus de càncer analitzats, essent significativa

en les mostres d'adenocarcinoma ductal pancreàtic i en les d'hepatocarcinoma (Figura 26). Pel que fa al transportador hCNT2, els resultats van mostrar una disminució de la seva expressió en les mostres tumorals de càncer colorectal, però es va observar una tendència a incrementar en les mostres tumorals de PDAC i HCC (Figura 26). Finalment, pel transportador concentratiu de nucleòsids hCNT3 no es van obtenir resultats significatius, ja que els tres tipus de tumor van presentar una tendència a incrementar la seva expressió, però de manera poc clara (Figura 26). Amb aquests resultats, es va evidenciar la caiguda dels nivells d'mRNA del transportador hCNT1 en els tres tipus de tumor.

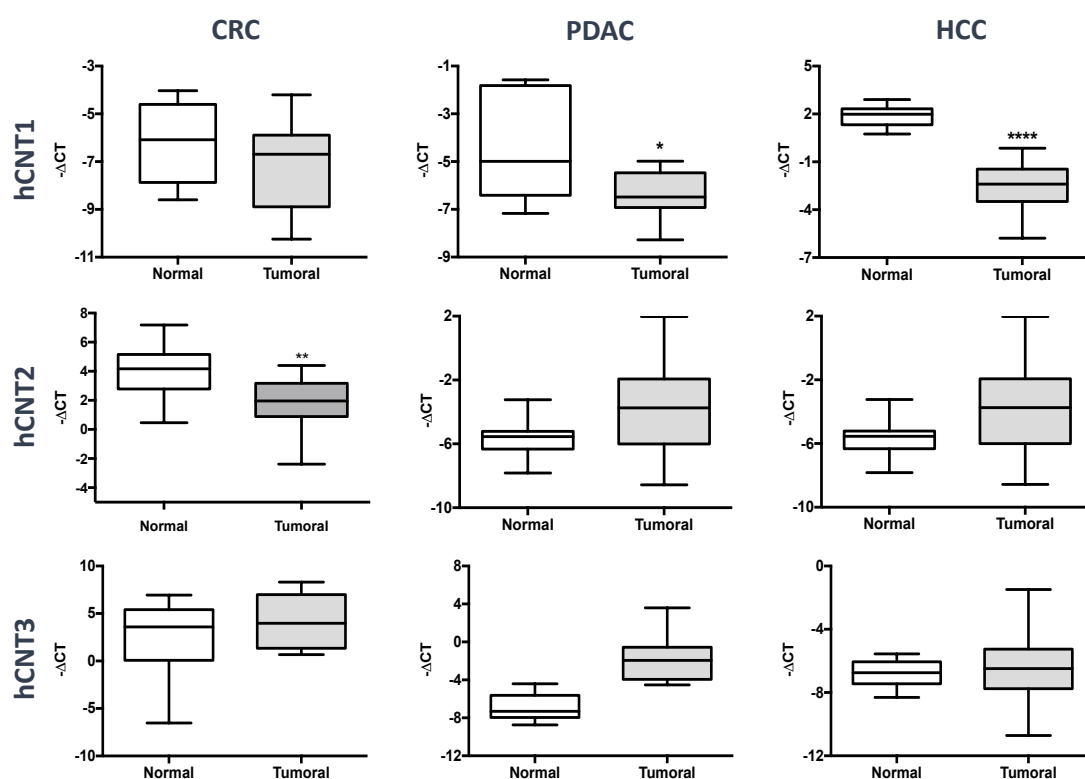


Figura 26. Expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids en mostres clíniques de càncer colorectal (CRC), adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) i hepatocarcinoma (HCC). Determinació de l'expressió per RT-PCR dels transportadors hCNT1, hCNT2 i hCNT3 en mostres aparellades de tumors i teixit no tumoral adjacent (n=17 en CRC, n=10 en PDAC i n=22 en HCC). La significança estadística es va determinar mitjançant el test de la t de Student; p<0.05*, p<0.01**, p<0.005***, p<0.001****.

Considerant doncs el descens dels nivells de missatger d'hCNT1, es va voler validar aquesta disminució a nivell proteic. Es va fer mitjançant l'obtenció d'imatges d'immunofluorescència de les mostres aparellades de teixit tumoral i teixit sa adjacent per aquest transportador. En aquest cas, només es va tenir accés a mostres de CRC i PDAC. Els resultats van confirmar la pèrdua, també a nivell proteic, del transportador

hCNT1 en teixit tumoral dels dos tipus de neoplàsies, essent molt evident, en aquest cas, per a les mostres de CRC (Figura 27). En conjunt, amb aquests resultats es pot confirmar que hi ha una pèrdua de l'expressió del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 en CRC, PDAC i HCC (Figura 26, Figura 27). En quant a les mostres aparellades de CRC el marcatge és de l'epiteli luminal i les glàndules (criptes), mentre que les mostres de PDAC es corresponen als conductes intercal·lars i a ductes més grans. Tot i que les imatges en aquest cas no mostraven una disminució clara, es van quantificar i si que es va observar disminució d'hCNT1. L'anàlisi i quantificació d'aquestes mostres va ser facilitat per l'anatomopatòloga Dra. Mireia Martín Satué.

De tota manera, en els tres casos, seria interessant poder fer una anàlisi de mostres clíniques a diferents estadis de la malaltia per tal d'establir en quin punt del procés carcinogènic es dona la caiguda d'expressió del transportador, i així poder establir l'expressió d'hCNT1 com a possible biomarcador de l'estadi de la malaltia.

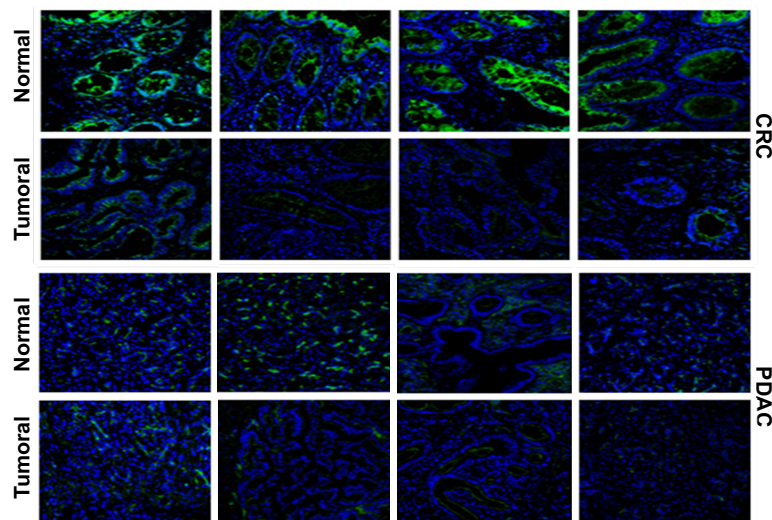


Figura 27. Disminució de l'expressió de la proteïna hCNT1 en teixit tumoral de CRC i PDAC. Imatges d'immunofluorescència de la proteïna hCNT1 en mostres clíniques aparellades de teixit tumoral i sa adjacent de tumors de CRC i PDAC de 4 tumors independents en cada cas. Marcatge de la proteïna hCNT1 en verd.

Un fet destacable, és que la pèrdua dels transportadors concentratius en aquests tipus de tumors es limiti al transportador hCNT1. S'ha de considerar doncs, que hCNT1 s'ha descrit com a transceptor, i que per aquest motiu, podria ser que la seva pèrdua en el teixit tumoral fos més rellevant. Aquest fet indica que la desregulació d'aquest transportador en càncer podria estar afectant a diversos processos cel·lulars,

independentment de la seva activitat transportadora, com la migració o el creixement tumoral (Pérez-Torras et al. 2013). En aquest sentit, el coneixement sobre els mecanismes de pèrdua d'expressió d'hCNT1 podria aportar noves explicacions en el desenvolupament del CRC, PDAC i HCC. A més, la disminució d'aquest transportador podria estar afectant la sensibilitat de fàrmacs anàlegs de nucleòsids, incrementant la quimioresistència a aquests, especialment de la gemcitabina la qual s'internalitza entre altres, per hCNT1. Aquest fàrmac és un dels més utilitzats en teràpia del càncer de pàncrees.

L'evidència de la pèrdua d'aquest transportador obre la porta a l'estudi dels mecanismes que regulen l'expressió dels transportadors de nucleòsids de manera general, així com les alteracions en aquestes regulacions que es poden donar durant el procés carcinogènic i també en altres processos patològics on s'estan descrivint alteracions en l'expressió dels gens *SLC28*.

2.1.2 Expressió dels miRNAs candidats

L'expressió alterada dels miRNAs s'ha relacionat amb la carcinogènesi, ja que molts tipus de càncer presenten un increment en la seva expressió, com és el cas dels miRNAs seleccionats. Per això, es van avaluar els seus nivells a les mostres clíniques de teixit tumoral i teixit no tumoral adjacent dels tres tipus de càncer: càncer colorectal, adenocarcinoma ductal pancreàtic i hepatocarcinoma on ja s'havia validat la pèrdua del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1.

2.1.2.1 Expressió dels miRNAs candidats a CRC

A les mostres de CRC es va observar un augment significatiu del miR-424 i del miR-18a. Per altra banda hi havia una disminució significativa del miR-15b. Els miRNAs miR-17, miR-20a, miR-106a, miR-106b i miR-122 mostraven una tendència al augment de la seva expressió sense arribar a ser significativa (Figura 28). L'anàlisi es va fer en 17 mostres aparellades de pacients de càncer colorectal.

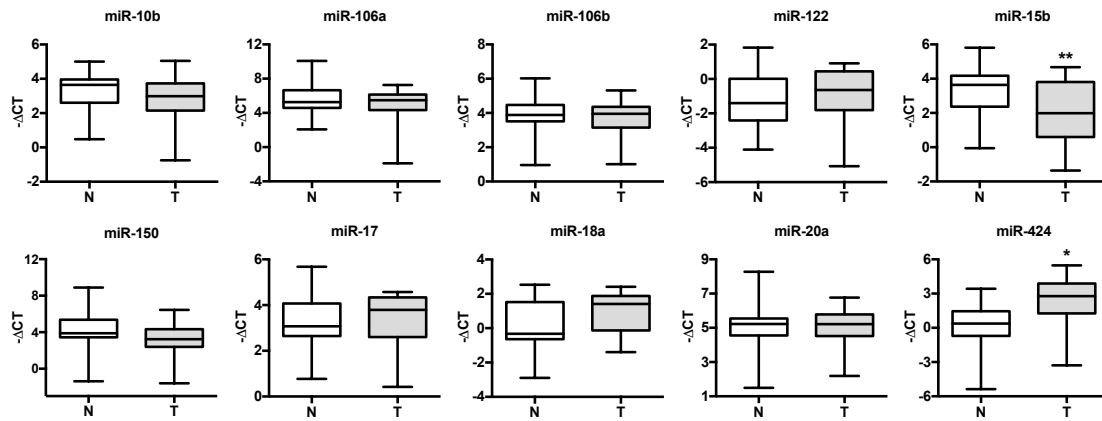


Figura 28. Expressió dels miRNAs candidats a les mostres clíniques de CRC. Determinació de l'expressió per RT-PCR dels miRNAs en mostres aparellades de tumors (T) i teixit sa adjacent (N) de tumors de CRC (n=17). La significança estadística es va determinar mitjançant el test de la t de Student; $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$.

Aquests resultats van mostrar gran variabilitat entre mostres, i fins i tot algunes d'elles van presentar nivells no detectables dels microRNAs.

2.1.2.2 Expressió dels miRNAs candidats a PDAC

Pel que fa les mostres d'adenocarcinoma ductal pancreàtic, no es va observar cap canvi significatiu, tot i que hi havia una tendència a incrementar dels miRNAs miR-18a i miR-150, així com de disminuir del miR-20a i el miR-122 (Figura 29). L'anàlisi es va realitzar en 10 mostres aparellades de teixit tumoral de PDAC i teixit sa adjacent.

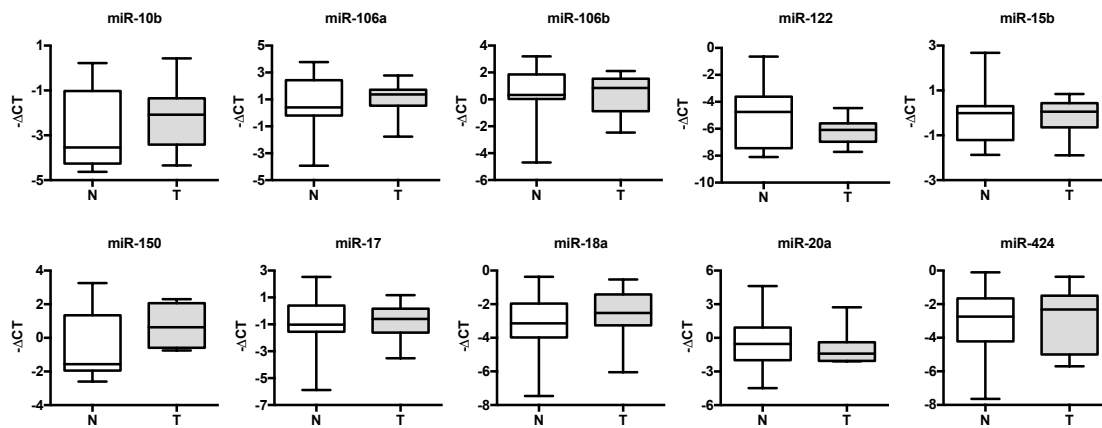


Figura 29. Expressió dels miRNAs candidats a les mostres clíniques de PDAC. Determinació de l'expressió per RT-PCR dels miRNAs en mostres aparellades de tumors (T) i teixit sa adjacent (N) de PDAC (n=10). La significança estadística es va determinar mitjançant el test de la t de Student; $p < 0.05^*$.

Tot i que no es va observar ningun augment significatiu de cap microRNA, s'ha de considerar que aquesta anàlisi es va realitzar en només 10 mostres aparellades. Segurament si es pogués incrementar el nombre de mostres, alguna d'aquestes

tendències a incrementar hauria esdevingut significativa. De nou, però, les mostres van presentar gran variabilitat d'expressió entre elles.

2.1.2.3 Expressió dels miRNAs candidats a HCC

L'anàlisi de les mostres clíniques d'HCC, es va realitzar en 22 mostres aparellades de teixit d'hepatocarcinoma i teixit no tumoral adjacent. Els resultats van mostrar un augment significatiu del miR-10b, el miR-18a i del miR-106a. Els miRNAs miR-17 i miR-93 estaven disminuïts significativament (Figura 30).

En aquest cas, els resultats són més sòlids, ja que es va disposar d'un nombre més elevat de mostres clíniques. Un resultat rellevant, és el fet que el miR-93 estava disminuït significativament, i tot i que la nostra hipòtesi contemplava el fet que els transportadors estessin disminuïts i els microRNAs augmentats. Cal destacar que el miR-93 era candidat exclusiu d'hCNT2 i aquest transportador presentava una tendència a augmentar en HCC (Figura 27), mentre que el miR-93 està disminuït en aquest tipus de tumor. En aquest sentit no es pot descartar que també hi hagi una relació entre hCNT2 i miR-93.

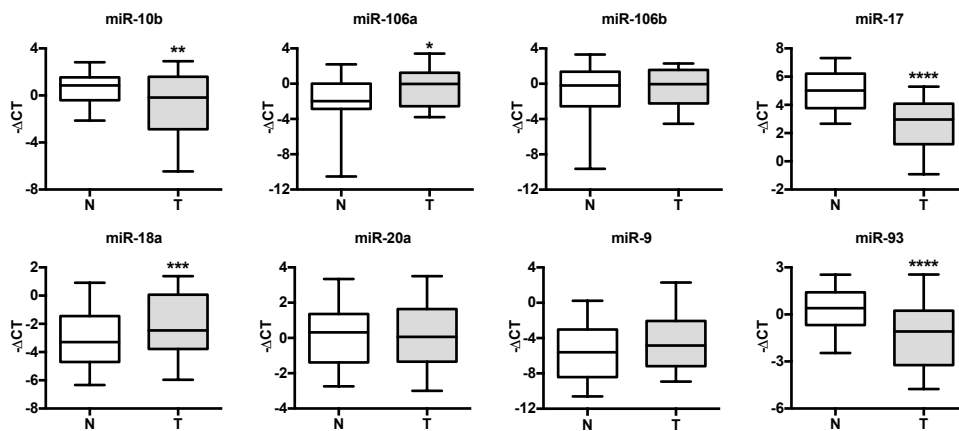


Figura 30. Expressió dels miRNAs candidats a les mostres clíniques d'HCC. Determinació de l'expressió per RT-PCR dels miRNAs en mostres aparellades de tumors (T) i teixit no tumoral (N) (n=22). La significança estadística es va determinar mitjançant el test de la t de Student; $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** , $p < 0.005$ ***, $p < 0.001$ ****.

2.2 Correlacions miRNA-hCNTs

Tot i considerant que en alguns casos el nombre de mostres era reduït, els resultats obtinguts van permetre detectar l'increment significatiu en alguns casos o tendència a augmentar. En aquests casos els resultats van ser els esperats, ja que un dels criteris de selecció va ser que la seva expressió es trobés incrementada en aquests tumors. De manera que els candidats escollits poguessin tenir funcions oncogèniques en relació

amb els transportadors. Tot i que la nostra hipòtesi inicial no contemplava la disminució dels miRNAs seleccionats, no es pot obviar la possibilitat d'alguna regulació indirecta o altres interaccions en la regulació dels hCNTs.

Així una vegada analitzats tots els nivells tant de miRNAs com dels transportadors, es van calcular les correlacions entre els dos elements. D'aquesta manera, es volia veure si hi havia algun tipus de relació entre el canvi d'expressió dels transportadors hCNT1 i hCNT2 i l'expressió aberrant dels miRNAs en les mostres clíniques. Segons la hipòtesi del projecte, s'esperarien unes correlacions negatives i significatives entre els miRNAs i els transportadors per a poder suposar una possible regulació de l'expressió d'hCNT1 i hCNT2 per part dels miRNAs. Considerant un augment en tumor dels miRNAs, aquests podrien estar degradant o inhibint l'mRNA dels transportadors.

2.2.1 Correlacions a CRC

L'anàlisi de les correlacions entre els microRNAs candidats i el missatger del transportador concentrariu de nucleòsids hCNT1 en CRC només va generar una correlació negativa significativa amb el miR-106a (Figura 31).

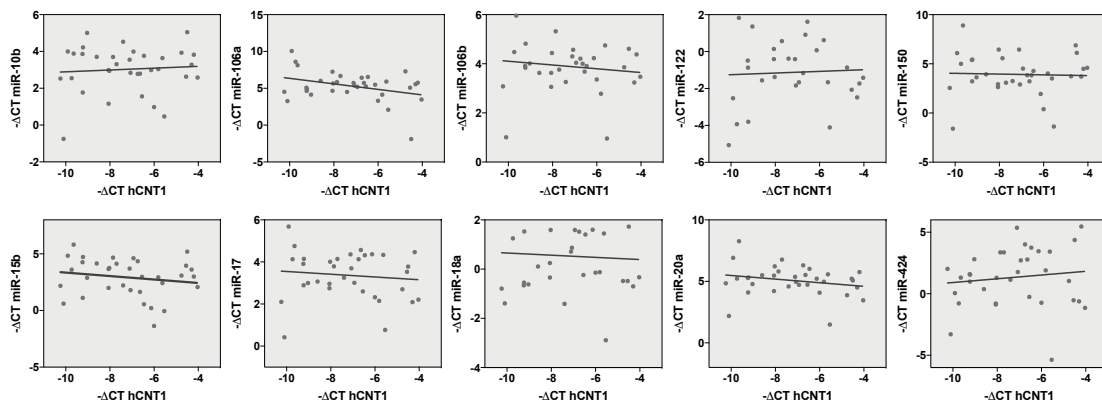


Figura 31. Correlació de l'expressió del transportador hCNT1 i els miRNAs candidats a CRC. Correlació negativa i significativa entre hCNT1 i miR-106a (p valor=0.043). La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

El càncer colorectal va ser l'únic tipus de tumor analitzat que va presentar disminució significativa del transportador concentrariu hCNT2, per tant, s'esperaria també alguna correlació significativa negativa amb algun dels miRNA analitzats que presentaven tendència a incrementar en les mostres d'aquest tumor. En aquest cas, però, no es va observar cap correlació negativa (Figura 32). Alguns dels miRNAs van presentar

correlacions positives, fet que no va permetre determinar cap candidat a regular directament l'expressió d'aquest transportador a CRC.

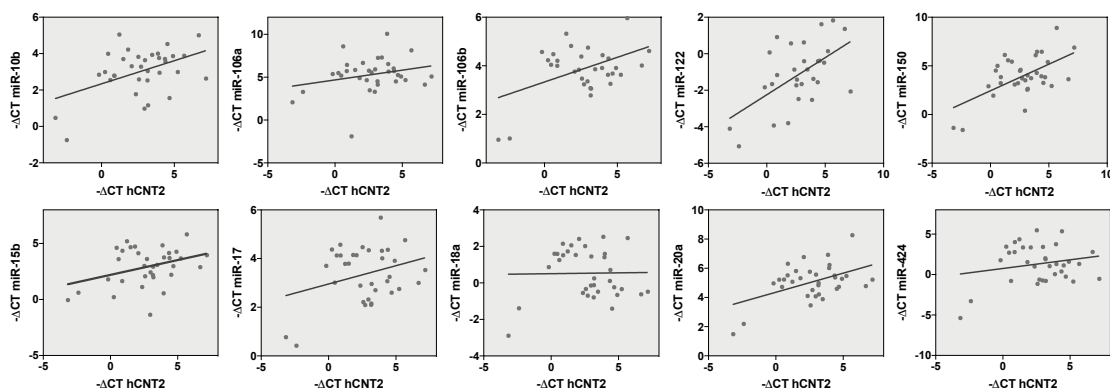


Figura 32. Correlació de l'expressió del transportador hCNT2 i els miRNAs candidats a CRC. La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

Amb aquests resultats es va decidir prosseguir l'estudi amb el miR-106a com a miRNA candidat a regular l'expressió, en aquest cas, del transportador hCNT1 a càncer colorectal i es va descartar cap regulació entre els miRNAs i hCNT2 en aquest tipus de tumor.

2.2.2 Correlacions a PDAC

L'anàlisi de les correlacions en PDAC va mostrar tres miRNAs candidats amb correlacions negatives significatives amb hCNT1. Aquestes són amb els miRNAs miR-106a, miR-17 i miR-18a (Figura 33).

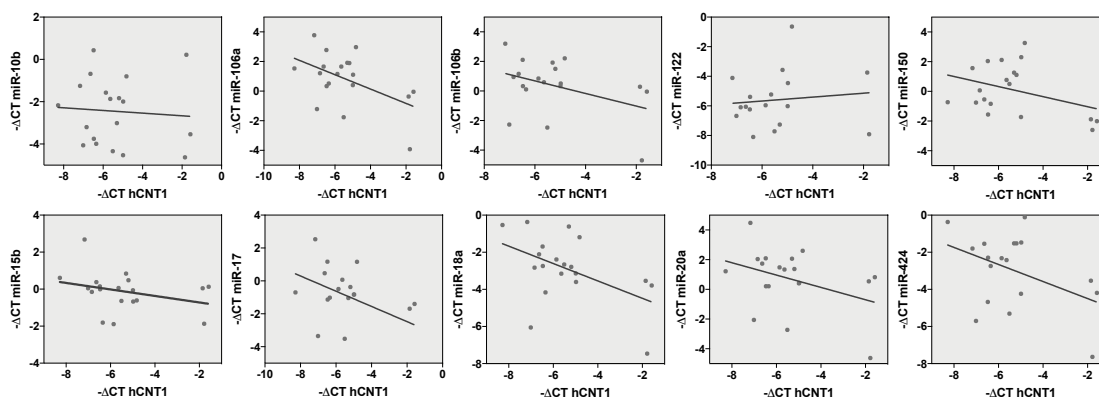


Figura 33. Correlació de l'expressió del transportador hCNT1 i els miRNAs candidats a PDAC. Correlacions negatives significatives entre hCNT1 i miR-106a (p valor=0.008), miR-17 (p valor=0.045) i miR-18a (p valor=0.033). La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

En aquest cas, tot i que no es va observar cap increment significatiu dels miRNAs en les mostres d'aquest tumor, si que es van obtenir correlacions negatives significatives amb tres miRNAs que presentaven tendència a augmentar en aquest tumor. Possiblement la falta d'aquest augment significatiu dels miRNAs seria degut al baix nombre de mostres, però de fet, ja havia estat descrit que augmentaven en PDAC (Sun et al. 2014, Li et al. 2014). Aquest fet determina doncs la possible relació entre miR-106a, miR-17 i miR-18a i hCNT1, considerant que les mostres amb més expressió d'aquests presenten nivells més baixos d'expressió del transportador hCNT1.

Pel que fa l'anàlisi amb el transportador hCNT2, tampoc es va observar cap correlació negativa significativa en aquest tipus de tumor (Figura 34).

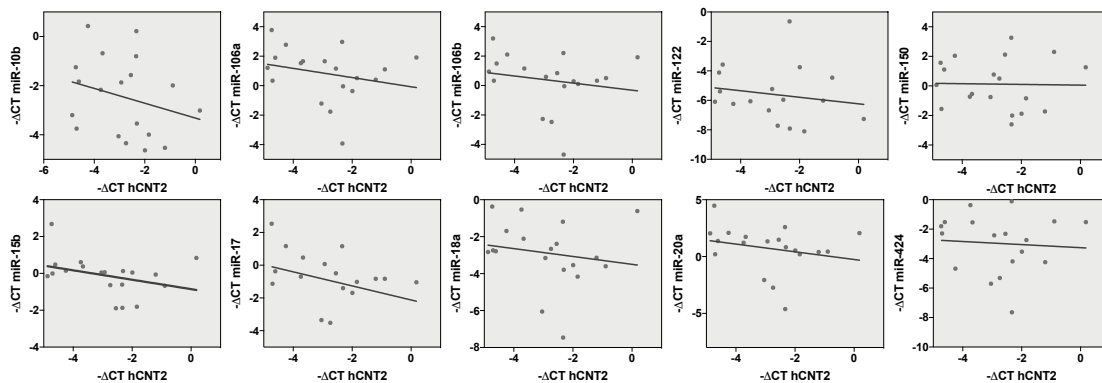


Figura 34. Correlació de l'expressió del transportador hCNT2 i els miRNAs candidats a PDAC. La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

Algunes de les correlacions presentaven certa tendència a ser negatives, però cap va resultar significativa. Aquestes dades es podrien relacionar amb la manca de pèrdua d'expressió del transportador hCNT2 observada en aquest tipus de tumor. De fet, la seva expressió presentava fins i tot una tendència a augmentar en les mostres clíniques de PDAC.

Per tant, per PDAC es van escollir tres miRNAs candidats (miR-106a, miR-17 i miR-18a) per tal de prosseguir la validació de la regulació d'hCNT1.

2.2.3 Correlacions a HCC

La mateixa aproximació es va realitzar a hepatocarcinoma. De l'anàlisi de les correlacions amb hCNT1 en HCC es van desprendre dos candidats amb correlacions

negatives significatives, essent de nou miR-106a i miR-18a, mentre que miR-9, tot i no ser significativa presentava una certa tendència de correlació negativa (Figura 35). En aquest tipus de tumor, es va observar una correlació positiva amb miR-17, fet que es podria relacionar amb la disminució de la seva expressió a les mostres clíniques (Figura 30).

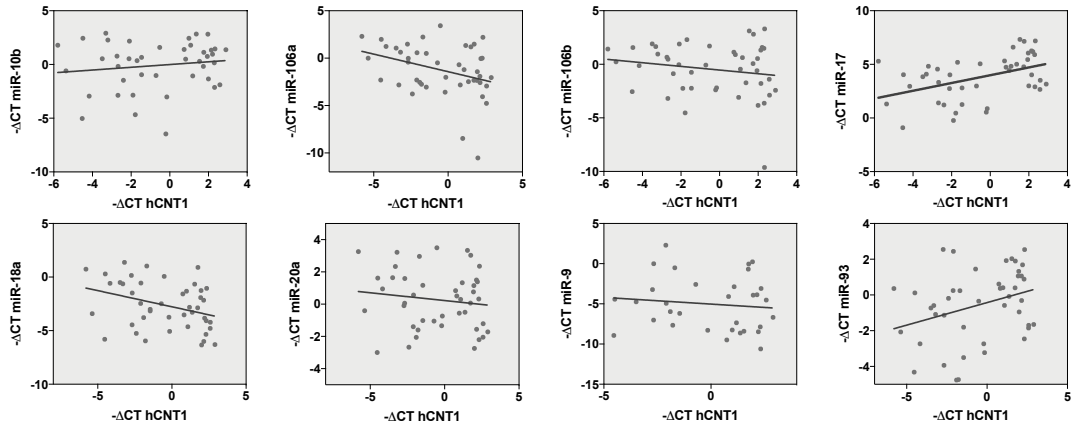


Figura 35. Correlació de l'expressió del transportador hCNT1 i els miRNAs candidats a HCC. Correlacions negatives significatives entre hCNT1 i miR-106a (p valor=0.022) i miR-18a (p valor=0.021). La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

De nou, les correlacions amb hCNT2 no van mostrar cap correlació negativa i significativa (Figura 36). Igual que a les mostres de PDAC, aquest tumor va presentar una tendència a incrementar l'expressió del transportador hCNT2 i per tant es va descartar la regulació d'aquest per part dels miRNAs candidats.

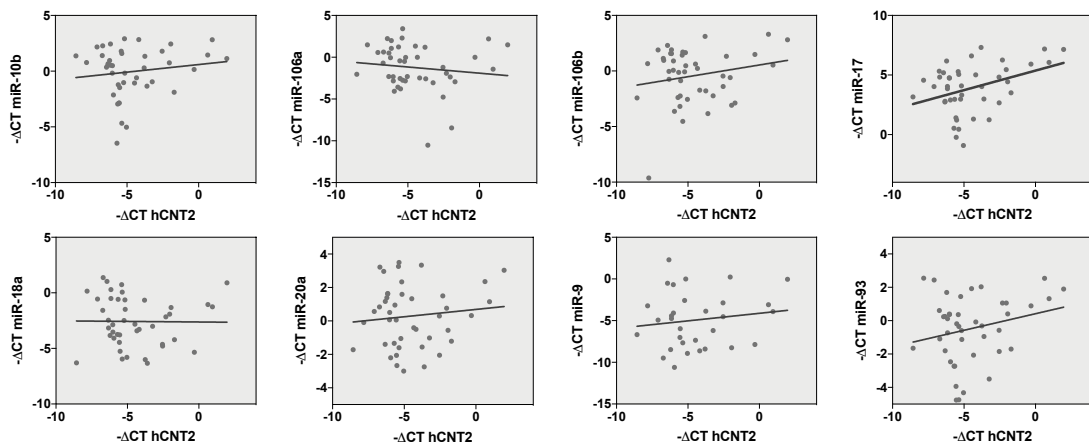


Figura 36. Correlació de l'expressió del transportador hCNT2 i els miRNAs candidats a HCC. La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

Les correlacions positives significatives van ser resultats inesperats, però que podrien suggerir l'existència de mecanismes alterats durant el procés carcinogènic que podrien interferir en la regulació dels miRNAs sobre els hCNTs.

En el cas d'hepatocarcinoma, cal destacar que el teixit adjacent dels tumors no es pot considerar teixit sa, ja que aquest teixit presenta una patologia anterior al tumor, considerant que generalment el pas previ a l'HCC és la cirrosi hepàtica. Aquest fet pot estar influint en els resultats d'expressió dels miRNAs, així com la dels transportadors. La cirrosi produeix un estat d'inflamació al fetge, i per tant la presència d'altres tipus cel·lulars relacionats amb la inflamació com els macròfags. Així, si tenim en compte que ha estat descrit que hCNT2 està sobreexpressat en macròfags, aquests podrien estar enmascarant l'expressió real del transportador en les cèl·lules tumorals de les mostres clíniques analitzades. Aquest fet podria relacionar-se amb l'increment de l'expressió d'aquest transportador en les mostres aparellades d'aquest tumor (Figura 26). Per tant, en aquest cas seria més interessant poder analitzar l'expressió per immunohistoquímica però fins el moment no hem trobat un anticòs que ho permeti de forma fiable.

2.2.4 Correlacions a les línies cel·lulars

Abans de procedir als estudis més moleculars, es va voler analitzar quin era el basal d'expressió tant de transportadors com dels miRNAs candidats i si es podrien establir el mateix tipus de correlacions en les línies cel·lulars. Per això es van utilitzar 7 línies derivades de CRC i 9 línies de PDAC. Pel que fa a HCC no es van poder considerar, ja que es disposaven de molt poques línies, amb les quals no es podien calcular les correlacions. Tal i com era d'esperar, l'expressió dels transportadors, sobretot d'hCNT1 era molt baixa, considerant que aquest transportador es perd amb la transformació tumoral. Ja s'havia descrit al laboratori anteriorment, que l'expressió basal d'aquest transportador, a totes les línies tumorals presenta valors molt baixos, fet que va limitar aquesta anàlisi. Cap de les correlacions aparentment negatives obtingudes a les línies de CRC va ser significativa (Figura 37), però si que es va determinar una correlació significativa positiva amb el miR-106b (Figura 37). En quant a les línies derivades de PDAC, l'única correlació negativa significativa va ser entre hCNT1 i el miR-106a (Figura 37). També es va observar una correlació significativa positiva, en aquest cas amb el miR-18a (Figura 37). S'ha de tenir en compte que aquest estudi està limitat a un baix nombre de línies cel·lulars, per això,

també es van analitzar les correlacions de manera conjunta a les línies de CRC i PDAC i tot i que alguna correlació va esdevenir significativa (miR-10b, miR-106b i miR-18a), no n'hi havia cap de negativa (Figura 37). A més, l'anàlisi de correlacions en les línies cel·lulars mostra dues poblacions diferenciades en quant a l'expressió de miRNAs (Figura 37).

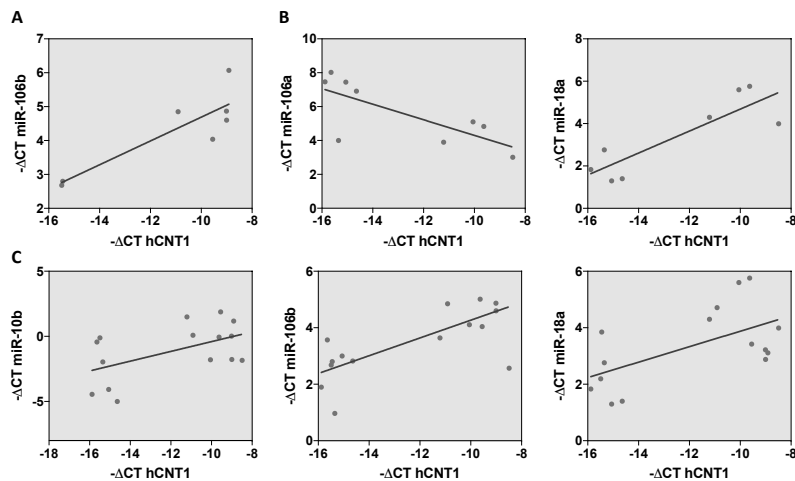


Figura 37. Correlacions significatives entre els miRNAs i els transportadors hCNT1 en línies derivades de CRC (A) i PDAC (B) i l'anàlisi en conjunt de les línies de CRC i PDAC (C). La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

L'anàlisi de les correlacions entre els miRNAs i el transportador hCNT2 no va mostrar cap correlació significativa en les línies derivades de CRC (Figura 38), mentre que a les línies derivades de PDAC es va observar una correlació significativa, però positiva entre hCNT2 i el miR-18a (Figura 38). Pel que fa a l'anàlisi en conjunt de les línies derivades de CRC i PDAC es van trobar tres correlacions significatives positives; de nou amb el miR-18a i el miR106b, i en aquest cas també el miR-17 (Figura 38).

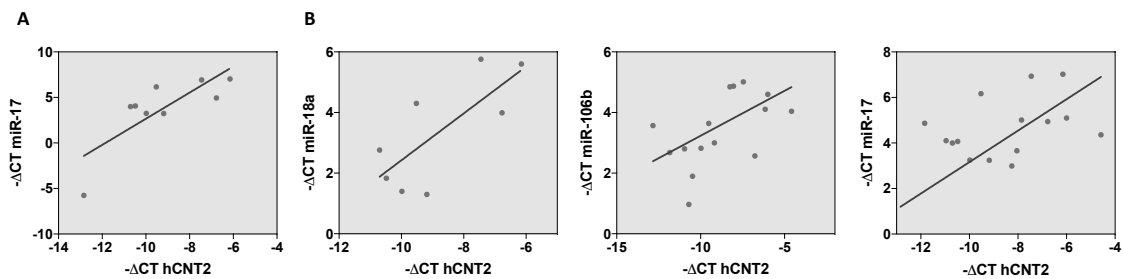


Figura 38. Correlacions significatives entre els miRNAs i els transportadors hCNT2 en línies derivades de PDAC (A) i l'anàlisi en conjunt de les línies de CRC i PDAC (B). La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

De tots aquests resultats, junt amb el de pèrdua d'expressió d'hCNT1 en tumors, es van escollir els miRNAs candidats a seguir l'estudi per tal de validar la seva implicació en la regulació d'aquest transportador. Aquests candidats van ser el miR-106a, el miR-17 i el miR-18a i també es va incloure el miR-9. Tot i que aquest darrer no va presentar correlació significativa, es va considerar un possible candidat, ja que era l'únic que en un principi era exclusiu d'hepatocarcinoma i semblava que podria arribar a tenir una correlació negativa amb hCNT1. Encara que les correlacions van determinar diferents candidats pels diferents tipus tumorals, per la següent validació, es van analitzar tots els miRNAs escollits per als tres tipus de tumor.

3. Validar la implicació dels miRNAs alterats en la pèrdua d'expressió dels transportadors

Com ja s'ha vist en l'anàlisi prèvi, les mostres clíniques de CRC, PDAC i HCC van mostrar una expressió incrementada d'alguns miRNAs, així com una clara disminució del transportador hCNT1. Molts dels miRNAs candidats curiosament pertanyen a la família del miR-17, i a més dos dels tres miRNAs amb els quals es van obtenir correlacions negatives significatives, miR-106a i miR-17, són d'aquesta família. Els miRNAs de la família del miR-17, junt amb miRNAs d'altres famílies estan organitzats en tres clústers parèlegs, que es localitzen en cromosomes diferents (Figura 39).

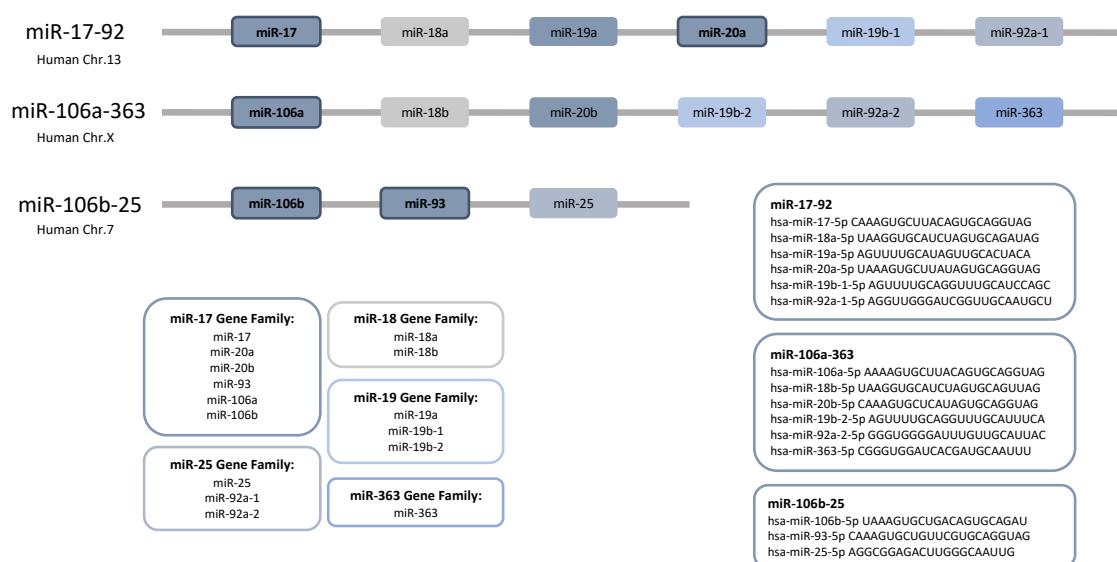


Figura 39. Esquema dels tres clústers parèlegs miR-17-92, miR-106a-363 i miR-106b-25, i les famílies que els formen. Representació dels miRNAs que conformen el clúster miR-17-92, miR-106a-363 i miR-106b-25, així com la classificació de les famílies que els formen i les seqüències dels miRNAs de cada clúster.

El primer clúster és el miR-17-92, que ha estat descrit com a oncomiR-1 i és un dels clústers de miRNAs més estudiats per la seva relació amb la carcinogènesi i la progressió tumoral. Dins d'aquest clúster s'hi troben el miR-17, el miR-18a, el miR-19a, el miR-20a, el miR-19b i el miR-92a-1. Aquest clúster està situat al cromosoma 13 en humans. El següent clúster és el miR-106a-363, el qual està al cromosoma X en humans i el conformen el miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92a-2 i el miR-363. Per últim, el clúster miR-106b-25 està format pel miR-106b, el miR-93 i el miR-25, i està localitzat al cromosoma 7 en humans (Figura 39). Per tant, els tres miRNAs que van correlacionar significativament amb hCNT1 es troben a algun d'aquests clústers

parèlegs. Dins d'aquests hi ha miRNAs de diferents famílies, els que pertanyen a la família miR-17 són el miR-17, el miR-20a, el miR-20b, el miR-93, el miR-106a i el miR-106b (Figura 39) i com a membres de la mateixa família comparteixen la *seed-sequence*, que determina la seqüència d'unió a l'extrem 3'UTR del seu gen diana (Figura 39).

Per tal de valorar la implicació de la família miR-17 en l'expressió del transportador hCNT1 es van fer diverses aproximacions que tot seguit es detallen.

3.1 Efecte de la modulació de la família miR-17 sobre l'expressió d'hCNT1

Considerant doncs, que els dos principals candidats pertanyien a la mateixa família, i que aquesta havia estat relacionada prèviament amb el desenvolupament del càncer, en primer lloc, es va procedir al silenciament en conjunt de tota la família miR-17. Aquesta aproximació, es va dur a terme per tal de veure si aquest silenciament podia tenir un efecte sobre la modulació de l'expressió d'hCNT1. Es van realitzar els silenciaments i 48 hores després se'n van analitzar els efectes. Els resultats van mostrar un increment significatiu de l'expressió de l'mRNA d'hCNT1 a les dues línies derivades de PDAC (Figura 40).

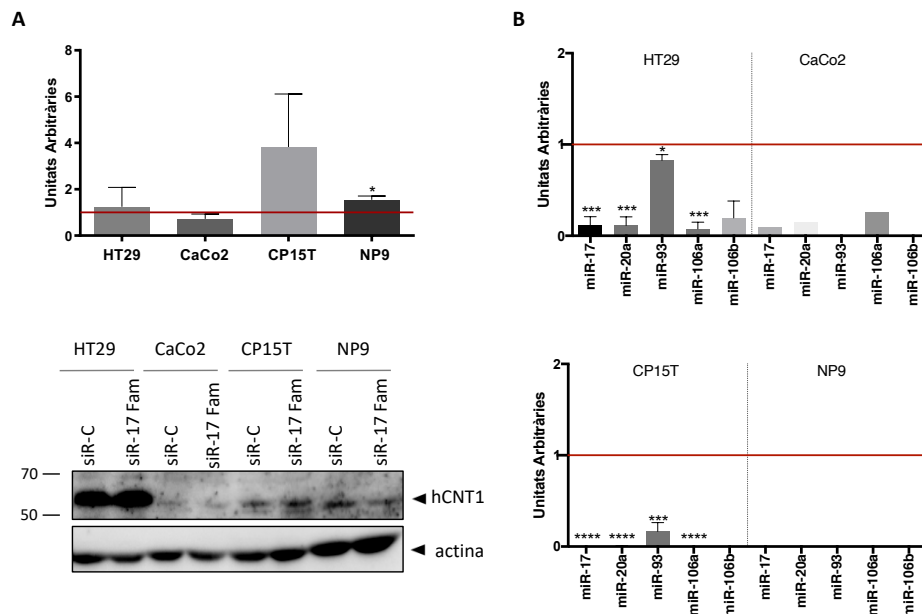


Figura 40. Modulació d'hCNT1 amb el silenciament de la família miR-17. Expressió del missatger (a dalt) i la proteïna (a baix) d'hCNT1 amb el silenciament de la família miR-17 (A). Expressió dels miRNAs silenciats (B). Valors representats com a mitjana de 3 experiments independents \pm ES i normalitzats a la condició control (C=1). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** $p < 0.005$ ***, $p < 0.001$ ****. Imatge del WB representativa de tres experiments independents.

A la línia NP9 l'increment va ser significatiu, mentre que CP15T va mostrar un increment evident, però no significatiu degut a la variabilitat inter-experimental. Tot i que sempre s'observava increment en aquesta línia, un dels experiments presentava un increment de 10 vegades, mentre que la resta presentaven un increment al voltant de dues vegades. Pel que fa a les línies de CRC no es va observar increment de l'expressió de missatger del transportador (Figura 40). En paral·lel es va comprovar que el silenciament de tots els microRNAs de la família fos correcte. Així tots els microRNAs de les línies emprades estaven considerablement disminuïts excepte miR-93 a la línia HT29, del qual només es va observar una lleu disminució, tot i que significativa, de la seva expressió (Figura 40). En quant a l'expressió proteica d'hCNT1, els resultats van mostrar un increment a la línia CP15T, a la línia HT29 es va observar una tendència a incrementar de manera lleugera, mentre que no es van detectar canvis a les altres línies (Figura 40). Aquests resultats concorden amb els obtinguts a les correlacions clíniques, considerant que el miR-17 només era candidat per PDAC, degut a que les mostres de CRC no van mostrar correlació amb el miR-17.

Cal considerar que amb aquest silenciament, s'està alterant l'expressió de miRNAs que *a priori* no s'havien considerat com a candidats. Aquests altres miRNAs podrien estar tenint un efecte sobre el transportador de manera indirecta ja que el silenciament d'aquests podria estar alterant l'expressió d'altres gens que no estem valorant.

Per tal d'avaluar de forma més directa l'impacte de la família sobre l'mRNA d'hCNT1, es va decidir analitzar l'activitat luciferasa del 3'UTR del seu mRNA en condicions basals i silenciant els miRNAs de la família. Tal i com ja s'ha esmentat anteriorment, l'assaig luciferasa amb la clonació del 3'UTR del transportador en un vector d'expressió del gen de la luciferasa, permet l'anàlisi de la luminescència emesa, considerant l'activitat del 3'UTR clonat en diferents condicions. En aquest cas, es va procedir a realitzar l'assaig 48 hores post transfecció del vector i silenciament dels miRNAs. L'anàlisi de l'assaig luciferasa es basa en que si els miRNAs s'estan unint al 3'UTR d'hCNT1, no hi haurà activitat luciferasa, en canvi amb el silenciament d'aquests, si que es podrà traduir la luciferasa i per tant es podrà detectar l'activitat luciferasa que s'observarà amb la luminescència emesa. Per tant, s'esperaria un increment de la luminescència amb el silenciament. Els resultats van mostrar una tendència al increment de l'activitat

luciferasa a la línia CP15T amb el silenciament de la família en comparació amb el control negatiu del silenciament, però no es va veure cap augment a les altres línies testades (Figura 41). Aquests resultats preliminars van mostrar la possible unió dels miRNAs de la família miR-17 al 3'UTR del transportador en el cas de la línia derivada de PDAC CP15T. Malgrat tot, la necessitat de valorar aquesta unió mitjançant un altre mètode es va fer evident.

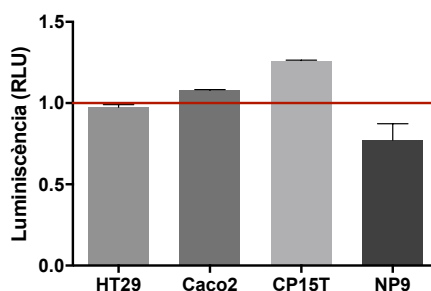


Figura 41. Activitat luciferasa del 3'UTR amb el silenciament de la família miR-17. Les cèl·lules es van co-transfectar amb el vector luciferasa que conté el 3'UTR d'hCNT1 i el vector pRL-TK (renilla), que és el control endogen de transfecció. A les 5 hores es van silenciar els miRNAs. L'assaig luciferasa es va realitzar a les 48h post silenciament dels miRNAs mesurant l'activitat luciferasa del vector i de la renilla. Els resultats es mostren com el quocient entre les dues activitats. Valors normalitzats al control negatiu del silenciament (C=1). Valors representats com a mitjana de les rèpliques d'un experiment \pm ES.

Aquesta aproximació de caràcter més general va portar a pensar que la implicació dels miRNAs en la modulació d'hCNT1 es podria basar en una relació més concreta per a cada miRNA candidat i cada teixit. Cal destacar també que amb el silenciament dels miRNAs de tota la família es poden estar alterant altres mecanismes, i no es pot descartar que altres factors estiguin influenciant els resultats, considerant que l'alteració de tants miRNAs alhora poden tenir efectes solapats o fins i tot contraris. Per exemple, l'efecte que poden tenir els miRNAs de la família miR-17 sobre el cicle i la progressió cel·lular no es limiten a la regulació d'un gen, sinó que els diversos miRNAs poden tenir dianes diferents, així com diversos miRNAs tenir la mateixa diana (Tan et al. 2014). Algun d'aquests gens podrien ser els transportadors, ja que s'ha observat la seva alteració en cicle cel·lular també. Alhora, els miRNAs poden estar regulats per diversos factors externs que en modulin la seva expressió. Concretament, s'ha observat que el tractament amb alguns fàrmacs pot afectar la seva expressió. És el cas de dexametasona la qual és responsable de disminuir l'expressió dels miRNAs miR-27b, miR-148a i miR-451 amb el corresponent increment de les seves dianes CYP3A4 i ABCB1 (Rodrigues et

al. 2011). Aquests miRNAs junt amb el miR-324-3p i el miR-328 també s'han descrit com a causants, en part, de l'increment de l'expressió de la bombad'extrussió de fàrmacs MRP1 (*ABCC1*) degut al tractament amb vinblastina (Schrenk et al. 2001). Un altre exemple seria el miR-124 el qual s'ha vist reduït amb l'administració de diversos fàrmacs psicoactius com la fluoxetina (He et al. 2015b). El cisplatí s'ha descrit com a responsable de l'alteració en la maduració d'alguns miRNAs, com el cas del miR-200b, en el qual s'ha observat que aquest fàrmac en modifica la seva forma immadura, el pre-miR-200b, i en bloqueja la seva maduració, disminuint així els nivells d'aquest miRNA en cèl·lules de càncer d'ovari (Mezencev and Wartell 2018). Aquesta alteració no és l'única descrita pel tractament amb cisplatí, sinó que també es va detectar l'alteració de dos miRNAs en càncer hepàtic amb aquest tractament. Concretament es va observar una disminució de l'expressió del miR-21, així com una sobreexpressió del miR-122 amb el tractament de cisplatí (Shu et al. 2016). Per altra banda, la modulació de la metilació i acetilació del DNA també afecta a l'expressió dels miRNAs tal i com ja s'ha comentat anteriorment. Per tant, el SAHA (àcid suberoïlanilida hidroxàmic) o vorinostat, el qual modifica l'acetilació de les histones, pot alterar l'expressió de miRNAs. Concretament, s'ha demostrat que aquest disminueix l'expressió del clúster miR-17-92 (Yang et al. 2015).

El SAHA és un fàrmac epigenètic d'ample espectre amb un mecanisme d'acció basat en la inhibició d'histones desacetilases. Amb aquesta inhibició s'acumulen els grups acetil a les histones i permet una relaxació de la cromatina i en conseqüència una major transcripció. En les cèl·lules tumorals, l'efecte del SAHA s'ha associat a una reducció de la migració i la proliferació cel·lular, així com a una major mort cel·lular (Ververis et al 2013). Amb les evidències que el SAHA està relacionat amb la disminució del clúster miR-17-92 i el fet que anteriorment al grup s'havia estudiat una possible modulació dels transportadors pel tractament amb aquest fàrmac, es va considerar aquest tractament com a possible estratègia per modular els transportadors via miRNAs. Dades mostrades en la tesi doctoral de la Dra. Aida Mata-Ventosa, mostraven un increment dels transportadors, sobretot a temps curts (4 i 6h) amb el tractament amb SAHA a diverses línies derivades de CRC i PDAC (Figura 42).

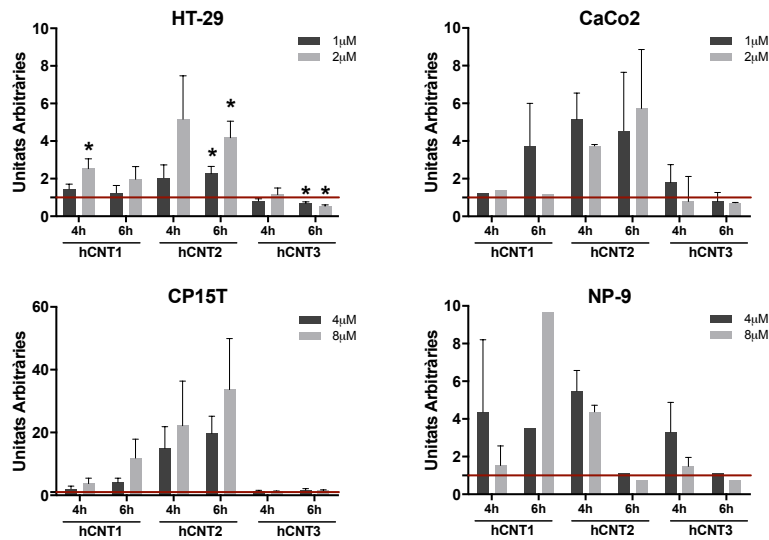


Figura 42. El SAHA modula l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids. Expressió relativa dels transportadors concentratius de nucleòsids hCNT1, hCNT2 i hCNT3 en panell de línies cel·lulars derivades de càncer colorectal (HT29 i CaCo2) i adenocarcinoma ductal pancreàtic (CP15T i NP9). L'expressió va ser determinada mitjançant PCR a temps real. Tots els valors van ser referits a una condició control sense tractament, indicada amb la línia horitzontal. Les barres representen la mitjana \pm SEM d'experiments independents. La significació estadística es va determinar mitjançant test t-Student aparellat; $p < 0.05^*$. Figura adaptada de la tesi doctoral de la Dra. Aida Mata-Ventosa.

En primer lloc, es va escollir una línia de CRC i una de PDAC (HT29 i CP15T respectivament) i es van analitzar els miRNAs de la família miR-17 amb el tractament de SAHA a temps més curts, en els quals s'havia observat un increment dels transportadors (Figura 42). Amb aquestes condicions de tractament no es va observar disminució dels miRNAs (Figura 43).

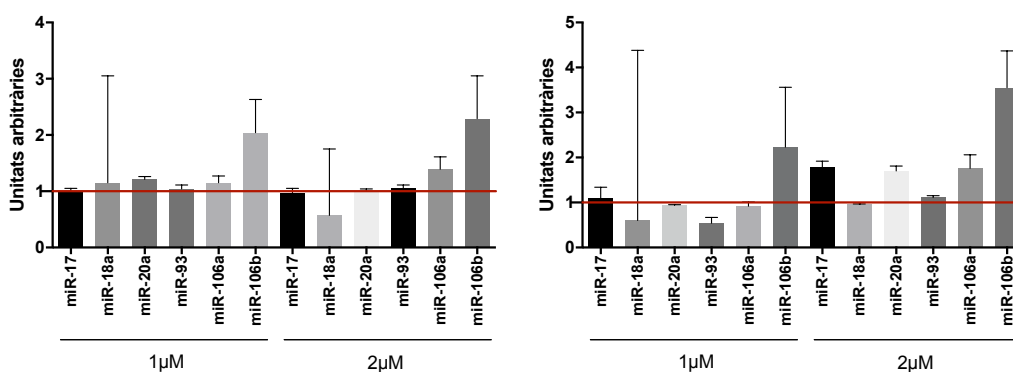


Figura 43. Efecte del SAHA sobre els miRNA de la família miR-17 i els clústers paràlegs candidats a 4 i 6 h de tractament. Les cèl·lules es van tractar amb dues dosis de SAHA (2 i 4µM) a les 24h post-sembra i es van analitzar mitjançant RT-PCR a les 4 i 6 hores de tractament. Valors representats com a mitjana de les rèpliques d'un experiment i normalitzats a la condició control (C=1).

Podria ser que en aquestes condicions, el temps de tractament no fos suficient per modular els miRNAs, per això, posteriorment es van tractar les cèl·lules durant temps

més llargs amb SAHA. El temps escollit va ser 48h. Els resultats van mostrar en primer lloc una disminució dels miRNAs de la família miR-17 amb el tractament de SAHA a les dues línies, essent més clar a la línia HT29 i significatiu per miR-17, miR-18a i miR-20a (Figura 44). Els tres miRNAs pertanyen al clúster miR-17-92, per tant els resultats concordaven amb els ja descrits (Yang et al. 2015). En quant a l'expressió del transportador hCNT1, es va observar un increment de l'expressió en les dues línies. Aquest, tot i no ser significatiu en cap d'elles, era major a la línia HT29 (Figura 44).

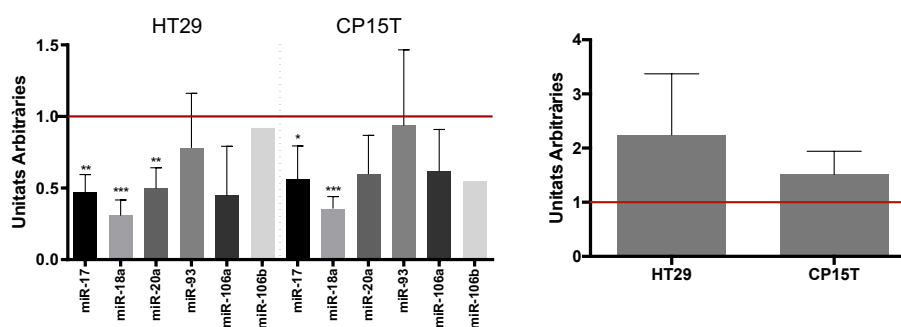


Figura 44. Efecte del SAHA sobre l'expressió dels miRNAs candidats de la família miR-17 i els clústers paràlegs i sobre el transportador hCNT1 a les 48h de tractament. Les cèl·lules es van tractar amb 2µM de SAHA a les 24h post-sembrada i es van analitzar mitjançant RT-PCR a les 48 hores de tractament. Valors representats com a mitjana de les 3N independents ± ES i normalitzats a la condició control (C=1). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.005$ ***.

Tot i que l'efecte del SAHA sobre els microRNAs no va ser tant potent com el del silenciament, considerant que la reducció de l'expressió dels miRNAs amb el silenciament era pràcticament del 90-100%, els resultats amb el tractament de SAHA van mostrar-se en la mateixa línia que els de silenciament de la família. Fet que porta a pensar que alguns dels miRNAs de la família miR-17 podrien estar implicats, en certa manera, en la modulació de l'expressió d'hCNT1. S'ha de tenir en compte però que el SAHA és un fàrmac amb efecte sobre un gran nombre de gens, així com sobre altres elements com factors de transcripció, o elements repressors, els quals podrien estar també influïent sobre els transportadors. No es descarta la possibilitat de l'ús del SAHA com a possible modulador dels miRNAs i que aquest tingui un efecte sobre el transportador hCNT1. S'hauria de seguir validant la implicació del SAHA sobre els microRNAs i els transportadors, i es podria contemplar la possibilitat de combinar el SAHA amb altres teràpies per potenciar-ne l'efecte. Concretament, en el cas dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids es podria pensar en incrementar l'expressió dels

transportadors i així afavorir l'entrada d'aquests fàrmacs millorant-ne la seva eficàcia. Com ja s'ha comentat, en paral·lel a la tesi doctoral, s'estava treballant en el grup amb el tractament de SAHA sobre la modulació dels transportadors en el marc de l'estudi de les modificacions de les histones. Aquest estudi va mostrar un augment de l'expressió d'hCNT1, que es traduïa en un petit augment en l'activitat de transport. Aquests resultats van portar a realitzar combinacions amb la gemcitabina, fàrmac anàleg de la citidina utilitzat en teràpia oncològica i el qual s'internalitza per hCNT1. Es van realitzar diverses aproximacions amb combinacions a diferents temps dels dos tractaments. No obstant, els resultats, exposats a la tesi doctoral de la Dra. Aida Mata-Ventosa, no mostraven un augment de l'efecte de la gemcitabina amb el pre-tractament de SAHA.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, s'ha descrit també la implicació del cisplatí, fàrmac derivat del platí, el qual forma complexos amb el DNA i inhibeix la seva síntesi, en la modulació d'alguns miRNAs. Aquestes dades, junt amb el fet que el cisplatí és un dels tractaments més utilitzat en teràpia oncològica, va fer reconsiderar algunes observacions obtingudes en altres projectes que s'havien estat realitzant al grup, on s'havia observat una modulació de l'expressió dels transportadors per part del cisplatí (CDDP) en colangiocarcinoma (CCA). Aquests resultats es recullen al complet en l'article annex (*Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma*. N. Urtasun, C. Boces-Pascual, L. Boix, J. Bruix, M. Pastor-Anglada i S. Pérez-Torras). En aquest treball, es van tractar tres línies cel·lulars derivades de CCA (EGI-1, TFK-1 i BCLC12) amb les dosis que tenien un efecte sobre la viabilitat cel·lular del 20% (IC20) i del 50% (IC50) de cisplatí a diferents temps, i es van analitzar els nivells d'expressió dels transportadors de nucleòsids, així com d'hOCT1. Aquest és un transportador de cations orgànics que pertany a la família gènica *SLC22*, s'expressa majoritàriament a fetge, tot i que també a altres teixits com l'intestí prim, el ronyó, el pulmó, el múscul esquelètic, el cervell, el teixit adipós i en cèl·lules del sistema immunitari. És el responsable de la internalització de fàrmacs derivats del platí com el cisplatí entre d'altres (Koepsell 2013). L'anàlisi de l'expressió dels transportadors amb el tractament de cisplatí, va consistir en els tractaments amb les dosis esmentades durant 24, 48 i 72h. Els resultats van mostrar un increment de l'expressió d'alguns dels transportadors en certes condicions. L'augment més clar es va donar a les 48h de

tractament, sobretot a la línia cel·lular BCLC12, on es va observar un augment significatiu d'hCNT1 i hOCT1 i una tendència a augmentar dels altres transportadors (Figura 45). Al mateix temps esmentat, també es va observar un augment significatiu dels transportadors hOCT1, hCNT2 i hCNT3 a la línia TFK-1, aquest darrer també augmentat a la línia EGI-1 (Figura 45).

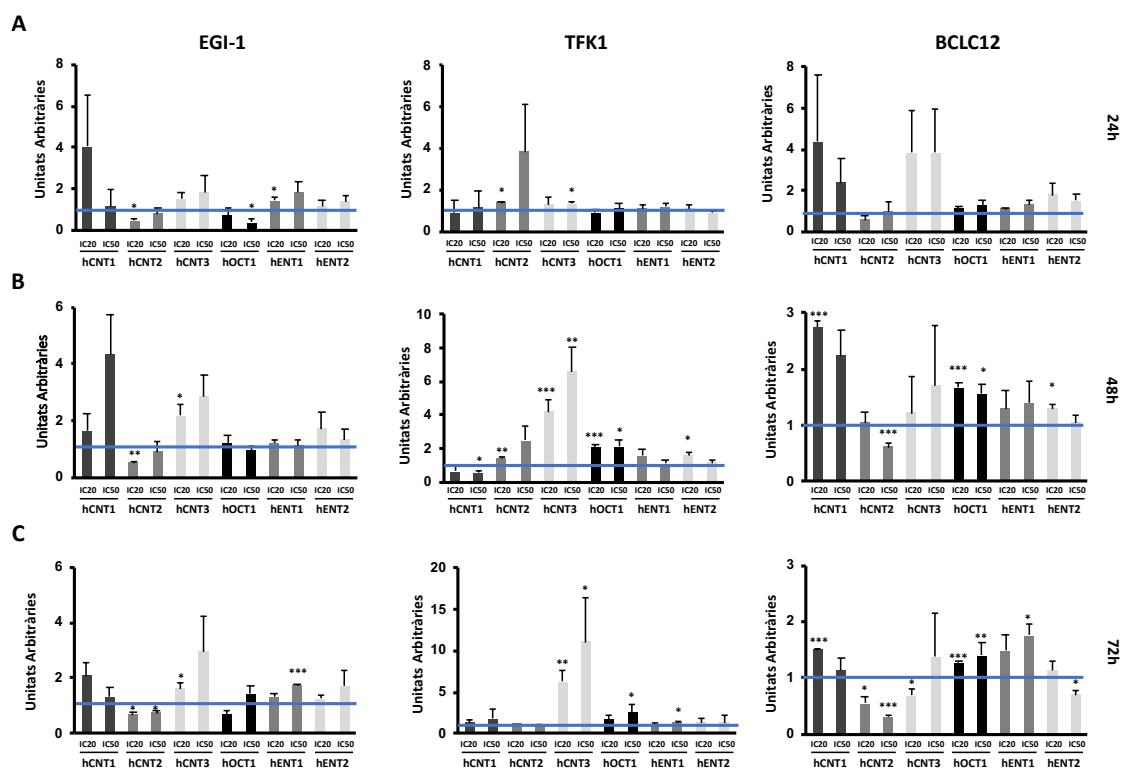


Figura 45. Modulació dels transportadors de nucleòsids i hOCT1 amb el tractament de cisplatí a diferents temps. Es van tractar les línies EGI-1, TFK1 i BCLC12 amb les corresponents dosis de CDDP IC20 i IC50 durant 24h (A), 48h (B) o 72h (C). Es va determinar l'expressió de l'mRNA dels transportadors de nucleòsids i hOCT1 mitjançant RT-PCR. Valors representats com a mitjana \pm ES (n=3-4). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; p<0.05*, p<0.01** p<0.005***.

Per tal de valorar si aquest augment d'expressió es traduïa en un canvi d'activitat dels transportadors, es van fer assajos de transport a les tres línies amb el tractament de cisplatí. Aquests es van realitzar a les 48 i 72 hores de tractament, considerant que van ser els temps on s'havia determinat l'augment d'mRNA dels transportadors. Els resultats van mostrar un increment en el transport dels hCNTs als dos temps de tractament amb cisplatí a les línies EGI-1 i BCLC12 (Figura 46). A la línia TFK-1 no es va observar increment en l'activitat de transport (Figura 46).

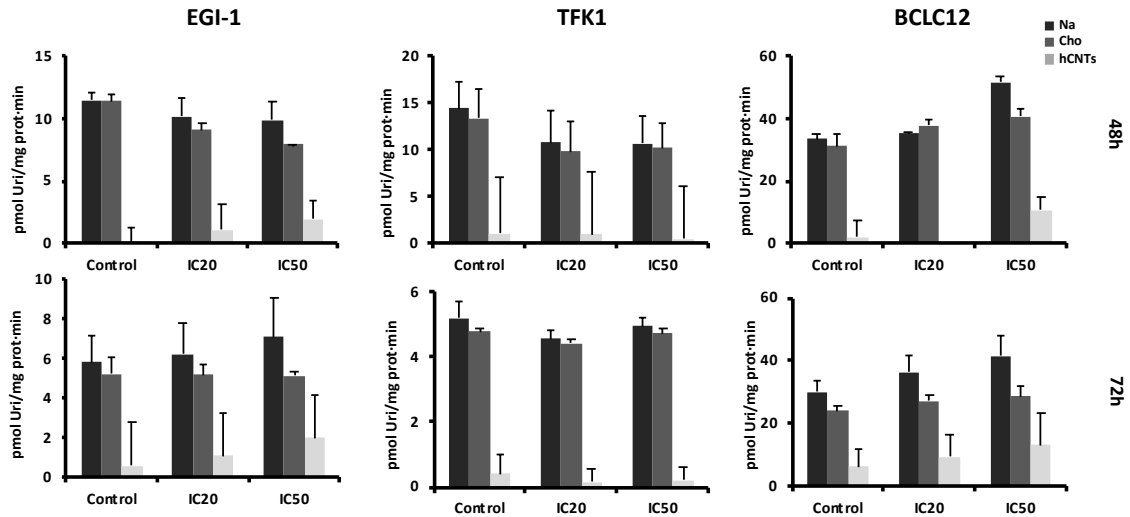


Figura 46. Activitat de transport amb el tractament de cisplatí. Es van tractar les línies EGI-1, TFK1 i BCLC12 amb les corresponents dosis de CDDP IC20 i IC50 durant 48h (A) o 72h (B). L'assaig de transport va valorar l'entrada d'uridina tritiada, calculada a partir de la diferència de valors en medi sodi o colina. Valors representats com la mitjana \pm ES dels experiment independents (n=2-3). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; $p < 0.05^*$.

Aquests resultats van portar a la idea de combinar el tractament de cisplatí amb anàlegs de nucleòsids per tal d'afavorir l'entrada d'aquests degut a l'increment dels transportadors. Per això es van realitzar diversos assajos de viabilitat cel·lular on es realitzava un pre-tractament amb cisplatí i un tractament posterior amb dosis creixents de gemcitabina. Els assajos també es van realitzar a les 48 i a les 72h de tractament. Els resultats van mostrar un efecte sinèrgic entre els dos fàrmacs a les línies EGI-1 i BCLC12 (Figura 47), resultats coherents amb els obtinguts en l'anàlisi de l'activitat de transport.

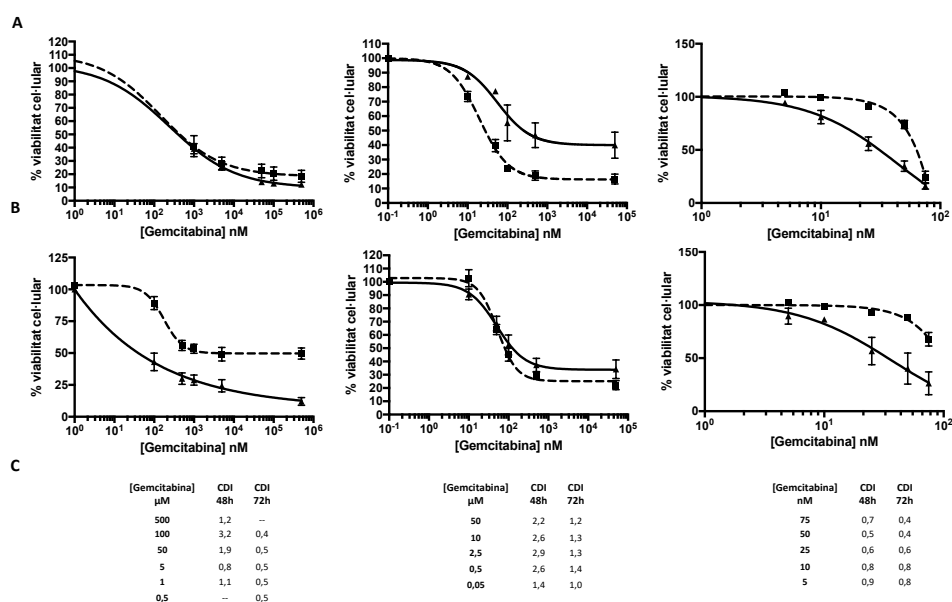


Figura 47. Efecte de la gemcitabina en la viabilitat cel·lular amb la combinació de tractament amb cisplatí. Les línies cel·lulars EGI-1, TFK1 i BCLC12 es van tractar amb les corresponents dosis IC20 i IC50 de CDDP (línia contínua) o sense tractament (línia discontinua) i amb dosis creixents de gemcitabina durant 48h (A) o 72h (B). Els valors del CDI (Coefficient of drug interaction) per les combinacions de CDDP i gemcitabina a les 48h i 72h (C). Valors representats com a mitjana \pm ES dels 3 experiment independents.

Per tal de validar aquesta sinergia entre els dos fàrmacs *in vivo*, es van generar tumors subcutanis en ratolins atímics amb la injecció de les cèl·lules de les tres línies emprades. En primer lloc, es van realitzar tractaments amb dues dosis de cisplatí (2mg/kg i 4mg/kg) i el corresponent control mitjançant injecció subcutània del fàrmac o de salí, i es va analitzar l'expressió dels transportadors en els tumors a les 48 i les 72 hores de tractament. Els resultats van mostrar un increment del transportador hCNT1 a les 48 hores a les línies EGI-1 i BCLC12 amb les dues dosis de fàrmac, essent significatiu a la dosi més alta (Figura 48). En aquestes mateixes condicions es va observar un increment dels transportadors hENT1 i hOCT1 a la línia EGI-1 i d'hENT2 a la línia BCLC12 (Figura 48). A les 72 hores de tractament només es va observar l'increment d'hCNT3 a la línia cel·lular EGI-1 amb les dues dosis de cisplatí (Figura 48).

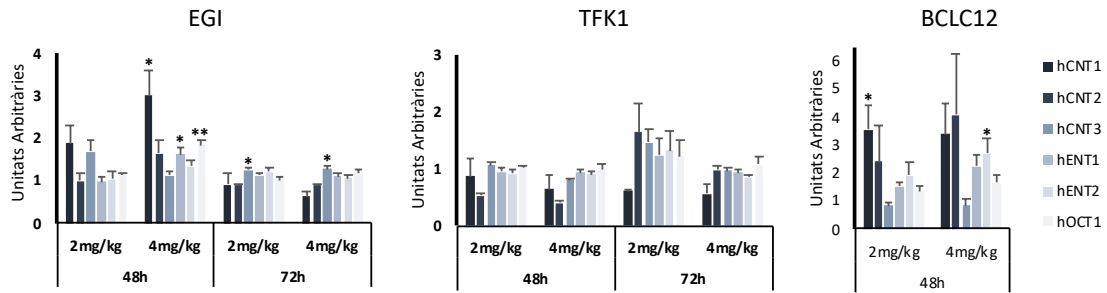


Figura 48. Efecte del tractament del cisplatí sobre els transportadors *in vivo*. Es van tractar els tumors subcutànics derivats de les línies EGI-1, TFK1 i BCLC12 amb el tractament de CDDP de 2mg/kg i 4mg/Kg, 48 o 72h després es van analitzar els nivells d'mRNA dels transportadors mitjançant RT-PCR. Valors representats com a mitjana \pm ES dels diferents tumors extrets (n=8). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ $p < 0.005^{***}$.

Tenint en compte aquests resultats, junt amb els obtinguts en la viabilitat cel·lular *in vitro*, es va decidir analitzar aquesta possible sinergia entre fàrmacs *in vivo*. Per això, de la mateixa manera es van generar tumors subcutànics, en aquest cas només amb la línia cel·lular EGI-1, i es van tractar amb cisplatí, gemcitabina o la combinació dels dos amb les pautes de tractament mostrades a la (Figura 49). Els resultats van confirmar l'efecte sinèrgic dels fàrmacs amb una reducció del 40% del pes del tumor amb el doble tractament, en comparació al 10% i 16% de tractament dels fàrmacs individuals amb cisplatí i gemcitabina respectivament (Figura 48).

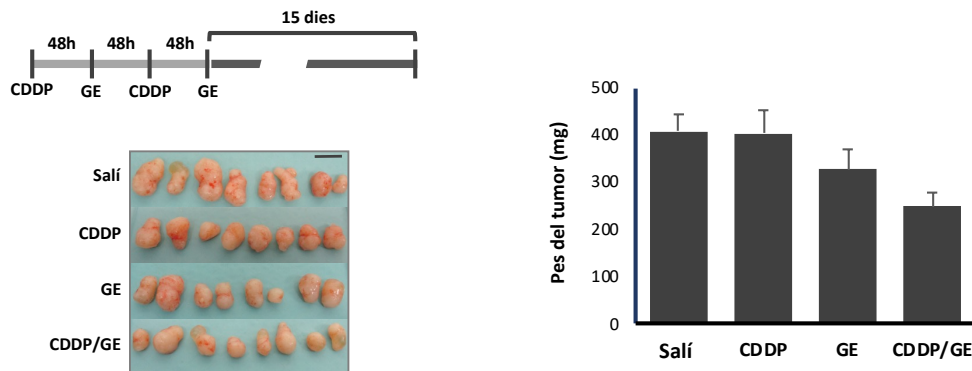


Figura 49. Efecte de la combinació del cisplatí i la gemcitabina en tumors derivats de la línia EGI-1. Combinació del tractament de cisplatí i gemcitabina seguint la pauta de tractament indicada als tumors subcutànics derivats de la línia EGI-1. Imatges i valors representats com a mitjana \pm ES del pes dels diversos tumors analitzats (n=8). La significança estadística es va determinar mitjançant el test ANOVA.

Aquests resultats van confirmar que el cisplatí, pot incrementar els nivells d'expressió i l'activitat dels transportadors de nucleòsids i així afavorir el tractament amb la gemcitabina. Amb aquests resultats i amb la idea que el cisplatí pot modular alguns miRNAs, seria interessant valorar quin és el mecanisme pel qual el cisplatí incrementa

l'expressió dels transportadors i si els miRNAs hi estarien implicats. Desafortunadament, la majoria de les mostres d'RNA obtingudes en aquest treball no van permetre l'anàlisi dels miRNAs, ja que el projecte es va iniciar a les etapes més primerenques de la tesi, i fins al moment l'extracció d'RNA es realitzava mitjançant un altre mètode el qual no preserva els RNAs petits com els miRNAs. Només les mostres dels tumors subcutanis es van extreure amb el kit *miRNeasy*, el qual permet la preservació dels miRNAs per a les seves anàlisi. Per això, es va determinar l'estat d'expressió dels miRNAs en aquestes mostres i així valorar si el tractament amb cisplatí n'hauria modificat la seva expressió al tumor. Els resultats van mostrar-se variables entre les dues línies. Mentre que BCLC12 no va presentar canvis dels nivells d'expressió dels miRNAs (Figura 50), a la línia EGI es va observar una disminució del miR-106a amb les dues dosis als dos temps analitzats (Figura 50). En aquest cas, l'increment d'hCNT1 observat a les 48h en aquesta línia podria estar degut a la disminució del miR-106a, i tot i que l'efecte de la disminució es manté a les 72h, si s'assumeix que la modulació d'hCNT1 és degut als miRNAs, no es pot descartar que algun mecanisme de compensació estigui afectant a l'expressió d'hCNT1 a aquest temps.

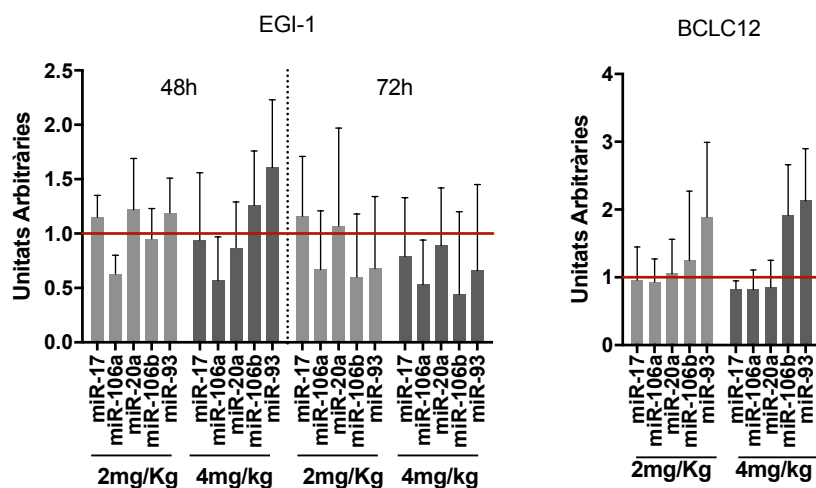


Figura 50. Expressió dels miRNAs amb el tractament de cisplatí a les mostres de tumors subcutanis generats a partir de les línies de CCA EGI-1 i BCLC12. Valors obtinguts per l'anàlisi de RT-PCR a partir de l'RNA extret dels tumors subcutanis derivats de les línies EGI-1 i BCLC12 i tractats a 2 i 4mg/Kg durant 48 o 72h. Valors representats com la mitjana de les rèpliques d'un tumor per condició. \pm ES i normalitzats a la condició control (C=1).

L'anàlisi dels miRNAs amb el tractament de cisplatí en els tumors no van mostrar uns resultats clars pel que fa a la regulació d'aquests degut al fàrmac. Tot i que van en la línia del que ja ha estat descrit en altres models tumorals, on s'ha observat la disminució del

miR-106a amb el tractament de cisplatí, o la correlació de l'expressió del miR-106a en exosomes de cèl·lules sensibles o resistents al cisplatí (Tian et al. 2018, Raji et al. 2017). La idea que se'n desprèn és que la regulació que exerceix el cisplatí sobre els transportadors és més complexa. Podria ser que els miRNAs tinguessin una implicació dins una xarxa més complicada en la qual hi podrien estar intervenint altres elements, com per exemple els factors de transcripció. A més, no s'ha d'obviar el fet que amb el tractament de cisplatí, es va observar la modulació de més transportadors, no només d'hCNT1, fet que complica encara més la interpretació d'aquests resultats. Considerant que s'ha de tenir en compte els possibles efectes de la modulació dels altres transportadors en un possible equilibri entre expressió de concentratius i equilibratius, o quin paper podrien tenir els miRNAs sobre aquests.

Per tal d'intentar discernir si el cisplatí tindria algun efecte sobre el 3'UTR del transportador hCNT1, i per tant sobre la regulació d'aquest per part dels miRNAs, es va realitzar una primera aproximació mitjançant l'assaig luciferasa amb l'extrem 3'UTR d'aquest transportador i el tractament de cisplatí. Els resultats, no van mostrar canvis en l'activitat luciferasa amb el tractament amb cisplatí respecte el control de tractament (Figura 51). Per tant, no es podria anticipar la implicació miRNAs sobre el 3'UTR d'hCNT1 amb el tractament de cisplatí.

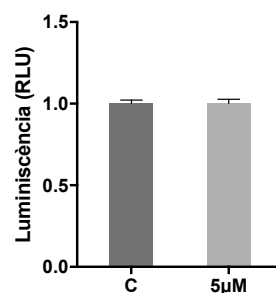


Figura 51. Activitat luciferasa del 3'UTR d'hCNT1 amb el tractament de cisplatí. Les cèl·lules de la línia HT29 es van co-transfectar amb el vector luciferasa que conté el 3'UTR d'hCNT1 i el vector pRL-TK (renilla), control endogen de transfecció. A les 5 hores es van tractar amb CDDP (cisplatí). L'assaig luciferasa es va realitzar a les 48h post-tractament mesurant l'activitat luciferasa dels vectors i de la renilla. Els resultats es mostren com el quocient entre les dues activitats. Valors normalitzats a la mitjana de cada condició al PGL3-promoter. Valors representats com a mitjana \pm ES de dos experiments independents.

Tot i que els resultats de l'expressió dels transportadors de nucleòsids amb el tractament de cisplatí mostressin una regulació no només d'hCNT1 sinó també d'hENT1 i hCNT3, la possible modulació d'aquests mitjançant els miRNAs degut al cisplatí es va limitar a

hCNT1. Cal destacar, que tal i com s'ha esmentat a l'apartat 1 l'anàlisi dels programes de predicció de dianes dels miRNAs, van mostrar diversos candidats per a hCNT1 i hCNT2. Per a hCNT1, tot i tenir un extrem 3'UTR curt (596bp), s'hi detecten molts possibles llocs d'unió de miRNAs. Concretament, analitzant el programa de predicció de *TargetsScan* es detecten més de 300 llocs d'unió putatius de diversos miRNAs, mentre que per hCNT3 i hENT1, encara que tenen un extrem 3'UTR més llarg (2761 i 2913 respectivament) la detecció de possibles llocs d'unió de miRNAs és pràcticament nul·la, determinant-se només 8 llocs d'unió a miRNAs per hCNT3, i només 1 per a hENT1. Pel que fa a hENT2, de la mateixa manera que hCNT1, existeixen dues variants amb extrems 3'UTR diferents, però en aquest cas, cap dels dos extrems 3'UTR de 1120 i 969bp tenen llocs d'unió a miRNAs. Aquest és un fet rellevant, que permet restringir, la possibilitat de la regulació per part dels miRNAs a hCNT1 i hCNT2. A més permet anticipar que hCNT1 requereix d'una fina regulació addicional que no és necessària per als altres transportadors. Aquesta idea es podria relacionar amb la importància de la regulació d'hCNT1 degut a la rellevància de les seves funcions com a transceptor.

Amb els resultats adquirits amb el tractament amb cisplatí sobre els transportadors i sobre els miRNAs, no es descarta la possibilitat de realitzar els assajos necessaris per valorar aquest fet en un futur, una vegada s'hagi validat la implicació dels miRNAs en la regulació d'hCNT1. En primer lloc, s'hauria de determinar si els miRNAs candidats a regular l'expressió d'hCNT1 podrien estar subjectes a la modulació per part del cisplatí, i després valorar si aquesta modulació seria suficient per ser la responsable de l'increment observat del transportador. Tot i que els resultats obtinguts suggereixen que la regulació amb cisplatí és més complexa i no esdevindria un clar candidat regular els miRNAs.

El conjunt de resultats obtinguts en aquest apartat, ja sigui amb el silenciament de la família i el tractament amb SAHA va evidenciar la possibilitat de regulació del transportador hCNT1 pels miRNAs. Tot i que aquesta no va ser del tot conclouent, la tendència a l'augment d'hCNT1 era evident. Així, a partir d'aquests resultats es va decidir validar de forma individualitzada els miRNA candidats identificats en el cribratge inicial i valorar la possible unió dels miRNAs al 3'UTR de manera específica. Per això es va utilitzar la mateixa aproximació que s'havia emprat amb tota la família utilitzant

l'extrem 3'UTR d'hCNT1 clonat a la construcció de la luciferasa però en aquest cas silenciant el miR-106a de manera individual. Aquesta valoració preliminar es va realitzar només amb aquest miRNA considerant que era el coincident en CRC i PDAC, i es va realitzar en una línia derivada de cada tipus de tumor (HT29 i CP15T respectivament). Els resultats van mostrar una tendència a l'increment de l'activitat luciferasa només a la línia HT29 (Figura 52).

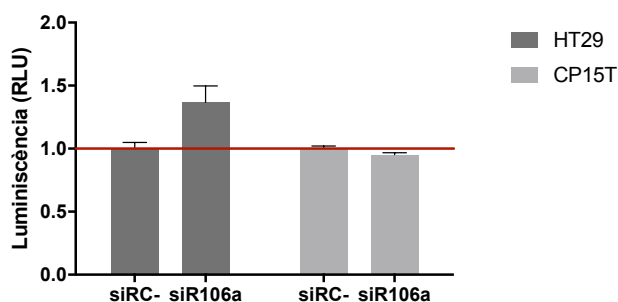


Figura 52. Activitat luciferasa amb el silenciament del miR-106a a les línies derivades de CRC, HT29 i PDAC, CP15T. Les cèl·lules es van co-transfectar amb el vector luciferasa que conté el 3'UTR d'hCNT1 i el vector pRL-TK (renilla), control endogen de transfecció. A les 5 hores es van silenciar els miRNAs. L'assaig luciferasa es va realitzar a les 48h post-silenciament dels miRNAs mesurant l'activitat luciferasa del vector i de la renilla. Els resultats es mostren com el quocient entre les dues activitats. Valors normalitzats al control negatiu del silenciament (C=1). Valors representats com a mitjanes de les $2N \pm ES$ per la línia HT29 i de les rèpliques d'un sol experiment per CP15T.

Al no observar canvis clars amb aquesta aproximació, es va posar de manifest la necessitat de validar la unió dels miRNAs a l'extrem 3'UTR mitjançant un mètode sotmès a menys variabilitat, que permetés també la determinació exacta del lloc d'unió d'aquests amb el transportador. A més en aquest cas l'efecte del silenciament, s'estava considerant sobre un *background* que pot tenir elements que influeixin en aquesta unió, i que en aquestes condicions no estaven controlats, en aquest sentit calia doncs una altra estratègia per validar directament la unió del miRNA a l'extrem 3'UTR del transportador.

3.2 Deleció del lloc d'unió del miR-106a, miR-17, miR-18a i miR-9 a l'extrem 3'UTR d'hCNT1.

Considerant els resultats obtinguts amb les correlacions a les mostres clíniques, i ja que les anàlisis de tota la família miR-17 no van ser prou robustos, es va decidir anar més al detall i determinar quina implicació podria tenir cada miRNA candidat per separat. Per tant, els miRNAs escollits per seguir l'estudi van ser el miR-106a, el miR-17, el miR-18a i

el miR-9. Una vegada seleccionats els miRNAs candidats a modular l'expressió d'hCNT1, i per tal de validar la implicació d'aquests candidats en la regulació del transportador, es va procedir a la comprovació que hCNT1 fos diana directa d'aquests miRNAs. Aquesta validació va consistir en determinar si els miRNAs seleccionats s'unien a l'extrem 3'UTR del transportador hCNT1. El primer pas va consistir en la deleció del possible lloc d'unió dels miRNAs al 3'UTR, per tal de realitzar l'anàlisi de l'activitat luciferasa i així comprovar aquesta unió.

La deleció del lloc d'unió o BS (BS, de l'anglès *Binding Site*) dels microRNAs al 3'UTR de l'mRNA del transportador hCNT1 es va realitzar sobre el vector amb el 3'UTR clonat amb el gen de la luciferasa esmentat a l'apartat anterior. Per tal de definir el lloc d'unió del miR-106a, miR-17, miR-18a i miR-9 al 3'UTR d'hCNT1 es va utilitzar el programa de predicció *RNAHybrid*, i es van deleccionar aquests BS al 3'UTR clonat, generant així un extrem 3'UTR modificat on els miRNAs candidats no s'hi podrien unir. Les seqüències d'unió dels miRNAs a l'extrem 3'UTR d'hCNT1 es mostren a la (Figura 53), així com la seva posició relativa a l'extrem 3'UTR del transportador.



Figura 53. Esquema de la seqüència i posició dels llocs d'unió (BS) dels microRNAs a l'extrem 3'UTR d'hCNT1. Posició relativa dels BS a l'extrem 3'UTR del transportador hCNT1 i seqüència específica del BS de miR-106a/miR-17, del miR-18a i del miR-9.

En el cas del miR-106a i el miR-17 es va observar que el lloc d'unió a l'extrem 3'UTR d'hCNT1 era únic i el mateix per ambdós miRNAs. Aquests dos microRNAs pertanyen a la mateixa família, la família del miR-17. Aquest fet fa que la seva *seed-sequence* sigui la mateixa, i per tant que en aquest cas, el lloc d'unió amb hCNT1 sigui també el mateix. La família miR-17 engloba diversos miRNAs com el miR-106a i miR-106b, el miR-17, el

miR-20a i miR-20b i el miR-93. Tots ells distribuïts en tres clústers paràlegs: el miR-17-92, el miR-106a-363 i el miR-106b-25. Curiosament, el miR-18a, es troba també al mateix clúster miR-17-92, però pertany a la família del miR-18. Per altra banda, el miR-9 pertany a la família del mateix miR-9 i es troba al cromosoma 1 en humans. Amb l'extrem 3'UTR del transportador clonat, així com els seus corresponents BS mutats, el següent pas va consistir en analitzar l'activitat luciferasa per determinar si hCNT1 era diana directa dels miRNAs candidats.

3.3 Assaig luciferasa per validar la unió del miR-106a, miR-17, miR-18a i miR-9 al 3'UTR d'hCNT1.

Aquesta anàlisi va consistir en mesurar la luminescència del vector de la luciferasa amb el 3'UTR del transportador, així com la dels 3'UTRs amb les delecions dels BS. L'anàlisi comparatiu de l'activitat luciferasa, ens permet determinar si els miRNAs candidats s'uneixen a les seqüències delecionades. Si aquest és el cas, s'esperaria un increment de l'activitat luciferasa, ja que els miRNAs no s'estarien unint al 3'UTR delecionat i per tant no n'estarien reprimint la seva expressió (Figura 54).

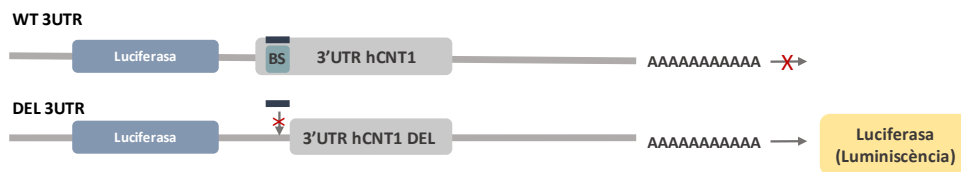


Figura 54. Esquema de l'activitat luciferasa amb els 3'UTR WT (*Wild type*) i els delecionats (DEL) en els quals es van eliminar els BS dels microRNAs seleccionats.

L'activitat luciferasa es va analitzar en diferents línies cel·lulars derivades de CRC, PDAC i HCC. Els resultats de la mesura de l'activitat luciferasa van mostrar un augment significatiu a les línies de CRC -HT29 i CaCo2- i les de PDAC -CP15T i NP9- amb la deleción del BS del miR-106a/miR-17 (Figura 55). Pel que fa a les línies d'HCC no es va observar cap augment significatiu amb la deleción del BS de miR-106a/miR-17 (Figura 55).

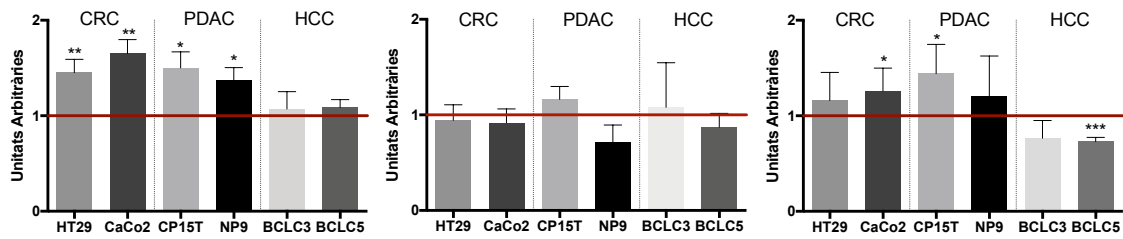


Figura 55. Validació de la unió dels microRNAs a l'extrem 3'UTR d'hCNT1 mitjançant l'activitat luciferasa. Les cèl·lules es van co-transfectar amb el vector luciferasa que conté el 3'UTR d'hCNT1, o el 3'UTR modificat (DEL) i el vector pRL-TK (renilla), control endogen de transfecció. L'assaig luciferasa es va realitzar a les 48h post transfecció mesurant l'activitat luciferasa del vector i de la renilla. Els resultats es mostren com el quocient entre les dues activitats. Activitat luciferasa al 3'UTR DEL normalitzat al control (WT=1). Activitat luciferasa del vector amb el BS delecionat respecte al WT pel miR-106a/miR-17, el miR-18a i el miR-9. Valors representats com a mitjana de les 3N ± ES. La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; p<0.05*, p<0.01**, p<0.005***, p<0.001****.

En quan a la delecio del BS del miR-18a, no es va obtenir cap increment significatiu de l'activitat luciferasa en cap de les línies analitzades (Figura 55). Per tant, aquest microRNA es va descartar com a possible modulador de l'expressió d'hCNT1.

Finalment, la delecio del lloc d'unió de miR-9 no va incrementar significativament l'activitat luciferasa a les línies d'hepatocarcinoma BCLC3 i BCLC5, tal i com s'esperava, sinó que de fet va induir una disminució, essent significativa per la línia BCLC5. Curiosament, es va observar un increment significatiu a la línia de CRC CaCo2 i a la de PDAC CP15T (Figura 55). En aquest cas, el miRNA analitzat miR-9, en un principi era considerat un candidat exclusiu per hepatocarcinoma, ja que no es veu alterat en CRC ni PDAC.

Els resultats van permetre determinar que dos dels miRNAs estudiats tenien com a diana directa el transportador de nucleòsids. D'aquesta anàlisi es desprèn que hCNT1 podria estar modulada per miR-106a i miR-17 en les línies derivades de CRC i PDAC. Tampoc es pot descartar que miR-9 sigui un possible candidat, tot i que no de manera clara, també en aquests dos tipus de tumors. Tanmateix, miR-9 degut a que no va mostrar-se com a candidat significatiu en les línies d'HCC, i considerant que aquest microRNA va ser escollit com a candidat exclusiu d'aquest tipus de tumor en aquest estudi, junt amb el fet que les correlacions amb hCNT1 tampoc van resultar significatives, es va decidir, pel moment, centrar l'estudi amb els altres dos candidats miR-106a i miR-17.

4. Analitzar l'efecte de la restitució dels transportadors, mitjançant la modulació dels miRNAs candidats, en models preclínic de les neoplàsies estudiades.

Els resultats obtinguts en l'assaig de l'activitat luciferasa van confirmar que hCNT1 és diana de miR-106a i miR-17. Aquest fet situa als miRNAs com a possibles moduladors de l'expressió del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1. Com ja s'ha esmentat, hi ha evidències que hCNT1 es perd en tumors com el de mama o tumors ginecològics (Farre et al. 2004, Urtasun et al. 2017, Gloeckner-Hofmann et al. 2006). A més, s'ha confirmat aquesta pèrdua en tumors de CRC, PDAC i HCC, amb l'anàlisi de mostres clíniques de teixit tumoral i teixit no tumoral adjacent d'aquests tumors. La pèrdua d'hCNT1 durant la carcinogènesi podria tenir efectes en la biologia cel·lular del tumor, ja sigui en la migració cel·lular, en la progressió del cicle cel·lular, o en la inducció de la mort cel·lular, degut al paper d'hCNT1 com a transceptor (Pérez-Torras et al. 2013). A més, la pèrdua d'aquest transportador pot provocar l'aparició de quimioresistència a alguns fàrmacs utilitzats com a tractament oncològic d'aquests tumors com és el cas de la gemcitabina en PDAC. Considerant la importància de l'expressió d'aquest transportador, i amb l'evidència que hCNT1 és diana dels miRNAs miR-106a i miR-17, es va plantejar la possibilitat de restituir l'expressió d'hCNT1, mitjançant la modulació dels miRNAs candidats en aquests models tumorals. Aquesta restitució permetria revertir, tant els possibles efectes de la pèrdua d'hCNT1 com a transceptor, com millorar l'eficiència de tractaments amb fàrmacs anàlegs de nucleòsids que s'internalitzin per aquest transportador.

4.1 Efecte del silenciament de miR-106a i miR-17 en l'expressió d'hCNT1

Per tal d'observar l'efecte de la modulació dels miRNAs candidats sobre l'expressió del transportador hCNT1, i degut a que els resultats de silenciament amb la família de miR-17 no van mostrar resultats prou contundents, es va modular l'expressió concreta de cada miRNA amb diferents aproximacions: el silenciament a través de siRNAs específics, el bloqueig amb un vector miRZip, o la sobreexpressió mitjançant l'expressió heteròloga de miRNA mímic.

Per això, com a primera aproximació, es va procedir al seu silenciament, i es va valorar si hi havia un increment de l'expressió del transportador. Es va analitzar l'mRNA i la proteïna 48h post-silenciament. També es van comprovar els nivells de cada miRNA amb el seu corresponent silenciament. Els resultats van mostrar un increment de l'expressió del missatger d'hCNT1 a les línies HT29, CP15T i més dèbilment a CaCo2 (Figura 56), encara que cap dels tres increments va resultar significatiu, degut a la gran variabilitat entre experiments (Figura 56). Els nivells de miR-106a van demostrar un bon silenciament, presentant uns nivells indetectables.

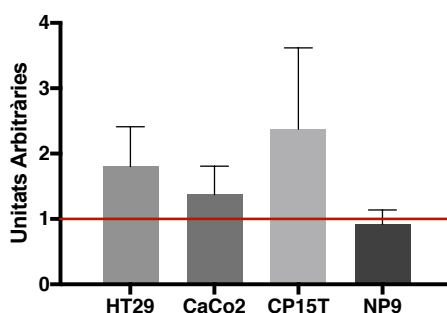


Figura 56. Modulació de l'expressió del missatger d'hCNT1 amb el silenciament del miR-106a. Expressió mesurada per RT-PCR a les línies de CRC i PDAC d'hCNT1 48h posteriors al silenciament del miR-106a. Valors representats com a mitjana de les $3N \pm ES$ i normalitzats a la condició control (C=1). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.005^{***}$, $p < 0.001^{****}$.

En quant a l'expressió d'hCNT1 amb el silenciament de miR-17, es va observar un increment, de nou no significatiu, en aquest cas només a les línies derivades de PDAC CP15T i NP9 (Figura 57).

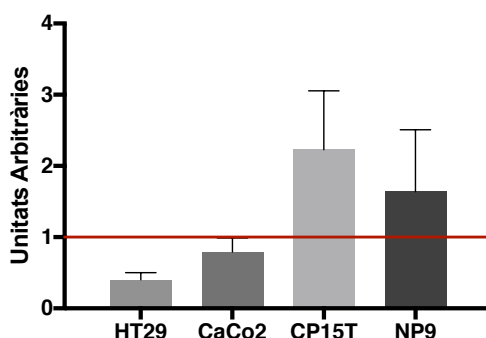


Figura 57. Modulació de l'expressió del missatger d'hCNT1 amb el silenciament del miR-17. Expressió mesurada per RT-PCR a les línies de CRC i PDAC d'hCNT1 48h posteriors al silenciament del miR-17. Valors representats com a mitjana de les $3N \pm ES$ i normalitzats a la condició control (C=1). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.005^{***}$, $p < 0.001^{****}$.

Aquests resultats, novament confirmen que miR-17 tindria un paper important en PDAC, tal i com es va observar amb l'anàlisi de les correlacions clíniques d'aquest tumor i del silenciament de tota la família miR-17. La comprovació del silenciament amb l'anàlisi del miR-17 va confirmar la disminució de la seva expressió, essent impossible detectar-ne els nivells.

Posteriorment, es va analitzar de quina manera la modulació dels miRNAs afectava el nivell de proteïna d'hCNT1. En aquest cas, es va realitzar l'anàlisi d'hCNT1 tant amb el silenciament dels microRNAs, com amb l'increment d'aquests mitjançant la transfecció de miRNA mímic. La utilització dels miRNA mímic es limita a la detecció proteica del transportador, ja que l'anàlisi de l'expressió del transportador a nivell d'RNA en les línies tumorals és força difícil, considerant que les C_T detectades es corresponen a valors al voltant de les 34-35 C_T , i per tant observar una disminució d'expressió no es possible. En quant a l'anàlisi proteic d'hCNT1, considerant els baixos nivells basals d'hCNT1 en les línies tumorals, la detecció per WB és també complicada. Fins al moment amb els anticossos que es disposaven no es podia detectar l'expressió endògena de la proteïna. Amb l'anticòs monoclonal del que es disposa actualment, es va aconseguir detectar la proteïna endògena del transportador mitjançant WB carregant entre 80-100µg de proteïna i amb temps llargs d'exposició (entre 7 i 20 minuts). Per aquest motiu, la possible modulació per part dels miRNA mímic es va valorar només a nivell proteic, considerant però que la seva detecció també es basa en uns nivells força baixos de la proteïna. Aquesta anàlisi també es va realitzar a les 48h post-transfecció. Els resultats van mostrar un increment de la proteïna d'hCNT1 amb el silenciament del miR-106a a les línies HT29, CP15T i NP9 (Figura 58). En el cas del silenciament del miR-17, es va observar un increment d'hCNT1 a la línia CaCo2 (Figura 58). Pel que fa a l'expressió d'hCNT1 amb els miRNA mímic, només es va obtenir una disminució de la proteïna a la línia CP15T amb la sobre-expressió dels dos miRNAs (Figura 58). En aquest cas, a la línia CaCo2 no es va detectar hCNT1 en cap de les condicions. Cal dir que de les quatre línies testades, aquesta és la que més dificultats presenta tant per l'extracció proteica com per la detecció d'hCNT1.

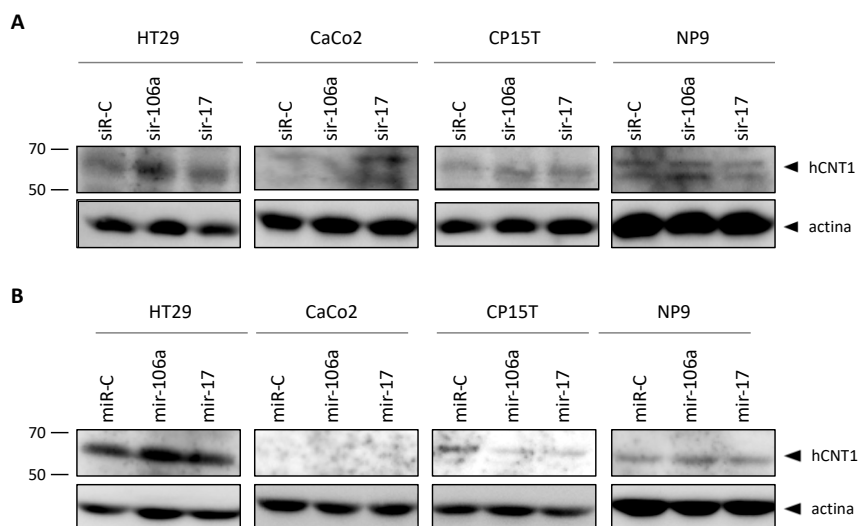


Figura 58. Expressió proteica del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 amb la modulació dels microRNAs miR-106a i miR-17. Expressió de la proteïna hCNT1 mesurada mitjançant WB a les 48h post-silenciament del miR-106a i miR-17 (A). Expressió de la proteïna hCNT1 amb l'increment dels miRNAs miR-106a i miR-17 (B). Imatges de WB representatives de 3 experiments independents.

L'anàlisi en conjunt dels resultats obtinguts en aquest apartat, segueixen en la mateixa direcció que els discutits anteriorment. L'evidència de la unió entre els microRNAs miR-106a i miR-17 al 3'UTR d'hCNT1, així com la inducció a l'increment d'expressió d'aquest amb el silenciament dels miRNAs i una possible disminució de la proteïna d'hCNT1 amb la sobreexpressió d'aquests, permet determinar la implicació dels miRNAs en la regulació de l'expressió del transportador hCNT1. Tot i que, la variabilitat entre experiments amb els silenciaments, no mostra resultats concloents, cal destacar que l'efecte dels miRNAs en el seu gen diana es basa en una fina regulació, i per tant, tampoc s'esperaria incrementar el transportador de manera desmesurada. A més, caldria tenir en compte que la seva regulació pot estar condicionada per altres factors, els quals també poden estar alterats durant el procés carcinogènic, com seria el cas dels factors de transcripció, els quals s'ha observat que també podrien tenir una implicació en l'expressió del transportador hCNT1. Un exemple seria HNF4 α que s'uniria al promotor d'hCNT1 augmentant així la seva expressió (Klein et al. 2009). Altres factors de transcripció s'han estat validant al laboratori. Així, dins el marc de la tesi doctoral de la Dra. Aida Mata-Ventosa s'han identificat llocs d'unió al promotor del *SLC28A1* per a KLF6 i d'E2F1 per al promotor de *SLC28A1* i *SLC29A1*. En quant a E2F1 és rellevant el fet que també pot estar regulat pels miRNAs del clúster miR-17-92, i alhora aquest modular l'expressió d'aquest clúster, generant-se així una autoregulació (Li et al. 2017). Per tant,

pel que fa a la regulació en aquest cas d'hCNT1 es podria considerar una complexa xarxa reguladora en la qual hi intervindrien diversos elements com els miRNAs o els factors de transcripció amb connexions entre tots els elements esmentats.

4.2 Inhibició miR-106a amb el vector miRZip-106a sobre l'expressió d'hCNT1

Considerant tots els resultats, i com que el candidat comú tant a càncer colorectal com a adenocarcinoma ductal pancreàtic era el miR-106a, aquest apartat es va realitzar considerant només aquest miRNA. En aquest sentit, es va procedir a utilitzar un altre mètode per bloquejar el miR-106a i veure així si els resultats eren més robustos. D'aquesta manera, es va analitzar per una altra via aquesta possible modulació d'hCNT1 per part dels miRNAs.

Aquest bloqueig es va realitzar mitjançant la transfecció del vector miRZip-106a, el qual a través del *short hairpin RNA* (shRNA) que conté produeix un miRNA antisentit que resulta en una des-repressió de la diana del miRNA ja que el miRNA en qüestió és segrestat pel vector (Figura 59). Amb aquest mètode s'esperaria un major efecte del bloqueig del miR-106a sobre l'expressió d'hCNT1, considerant que l'efecte sobre el miRNA és més potent i estable en el temps que el silenciament amb siRNAs. En primer lloc, es va generar el vector control negatiu a partir del vector miRZip-106a. Mitjançant el mètode PCR i les dianes de restricció corresponent, es va eliminar el shRNA que bloqueja el miR-106a i es va substituir per un shRNA que contenia una seqüència control que no s'unia a cap dels miRNAs estudiats en el projecte, el qual es va comprovar mitjançant la seqüenciació del fragment del shRNA. Segons l'estructura del vector, així com el mecanisme pel qual es bloqueja el miRNA, no es factible confirmar l'expressió dels miRNAs mitjançant RT-PCR. En aquest cas, es va comprovar l'eficiència de la transfecció mitjançant l'observació al microscopi de fluorescència a cada experiment, ja que el vector conté la proteïna GFP (Figura 59).

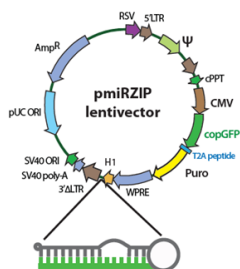


Figura 59. Estructura del vector miRZip i esquema del shRNA. El shRNA del miRZip-106a es va eliminar i es va introduir un shRNA control per a generar el vector miRZipC. El vector conté GFP que permet la comprovació de la transfecció cel·lular.

Es va analitzar l'expressió d'hCNT1 tant a nivell de missatger, com de proteïna a les 48h post transfecció. Els resultats de l'anàlisi de l'mRNA d'hCNT1 amb el bloqueig del miR-106a pel vector miRZip-106a van resultar en un increment significatiu de l'expressió del transportador a totes les línies analitzades, fins arribar gairebé a quintuplicar l'expressió d'hCNT1 a les línies HT29 i CP15T (Figura 60).

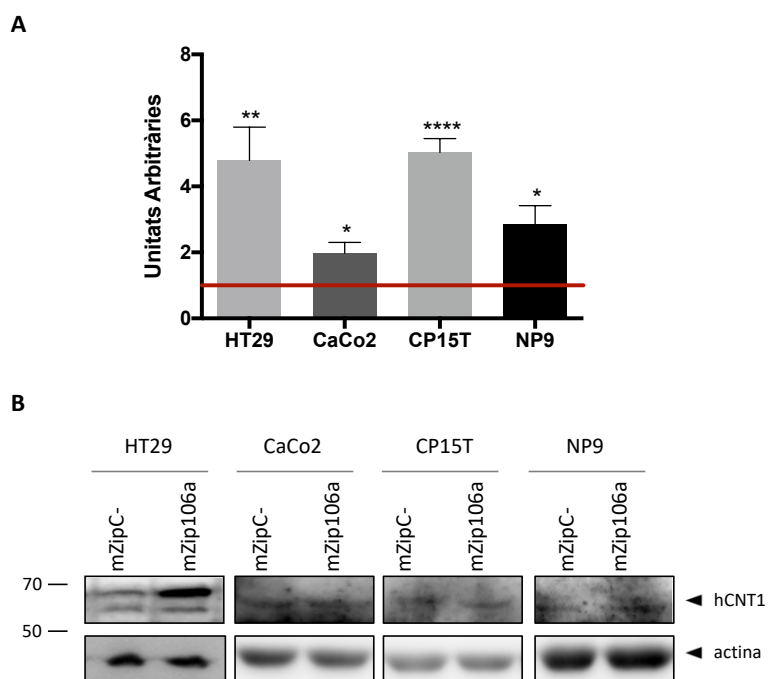


Figura 60. Expressió d'hCNT1 amb el bloqueig del miR-106a pel vector miRZip-106a. Expressió del missatger d'hCNT1 48h post-transfecció del vector miRZip-106a mesurat mitjançant RT-PCR (A). Expressió de la proteïna del transportador hCNT1 48h post-transfecció del vector miRZip-106a analitzat per WB (B). Valors representats com a mitjana de les 3N ± ES i normalitzats a la condició control (C=1). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; p<0.05*, p<0.01** p<0.005***, p<0.001****. Imatges de WB representatives de 3 experiments independents.

En quant a l'expressió de la proteïna hCNT1, es va observar un increment d'aquesta amb la transfecció del vector miRZip-106a a la línia HT29 (Figura 60). Aquests resultats van

confirmar de manera més clara, la implicació del miR-106a en l'expressió, sobretot a nivell d'RNA, del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1.

4.2.1 Efecte del miRZip-106a en les funcions d'hCNT1

El conjunt de tots els resultats obtinguts fins al moment, confirmen la modulació de l'expressió del transportador hCNT1 a través dels miRNAs. Considerant l'increment tant a nivell de missatger com de proteïna obtinguts amb el miRZip-106a, el següent pas va ser l'anàlisi de l'efecte del bloqueig del miR-106a sobre les funcions d'hCNT1. En aquest cas, van ser objecte d'estudi tant les funcions clàssiques de transportador com les considerades de transceptor. En primer lloc es va mesurar l'activitat de transport. Aquest assaig es va realitzar a la línia CP15T, ja que era una de les dues línies que van mostrar més increment d'hCNT1 amb el bloqueig del miR-106a, junt amb HT29. En aquest cas, altres aproximacions fetes al laboratori sobre el transport d'hCNT1 en la línia cel·lular HT29 van presentar alguns problemes per detectar augment significatiu en transport, per aquest motiu, la línia seleccionada per realitzar aquest assaig va ser CP15T. Els resultats no van mostrar increment de transport amb el bloqueig del miRZip-106a (Figura 61), tot i que s'ha de tenir en compte, que l'activitat basal de totes les línies tumorals és pràcticament nul·la, degut a la baixa expressió dels transportadors a totes elles. Els resultats van evidenciar la baixa activitat de transport de nucleòsids en línies tumorals, presentant uns valors baixos de transport. Aquest fet, va demostrar la necessitat de treballar amb un altre model que permeti la detecció de la funció transportadora de manera més clara.

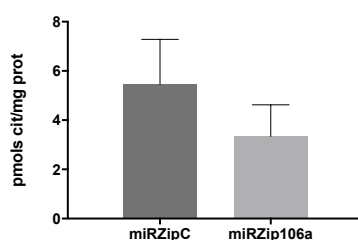


Figura 61. Activitat de transport de citidina amb la transfecció del miRZip-106a a la línia CP15T. L'activitat de transport es va valorar a les 48h post-transfecció amb els vectors miRZip106a i miRZipC. L'assaig de transport va valorar l'entrada de citidina tritiada, calculada a partir de la diferència de valors en medi sodi o colina. Valors representats com la mitjana de les quatre repeliques \pm DS d'un sol experiment.

Per altra banda, es va analitzar l'efecte del miR-106a sobre les funcions d'hCNT1 com a transceptor. Tal i com s'ha esmentat, aquestes es caracteritzen per modular el cicle

cel·lular i produir un increment de la fase S, així com un increment en la fosforilació de diverses quinases com AKT i ERK quan es restitueix hCNT1. En aquest sentit, es va analitzar el perfil del cicle cel·lular i la fosforilació d'aquestes dues quinases mitjançant WB amb el bloqueig del miR-106a. El perfil del cicle cel·lular es va analitzar en una línia derivada de CRC i una de PDAC (HT29 i CP15T), ja que van ser les que major increment van presentar en aquestes condicions. Els resultats d'anàlisi del perfil de cicle cel·lular van mostrar una tendència a acumular-se en fase S tant a les 48h com a les 72h a les dues línies analitzades (Figura 62), tal i com s'havia observat amb la restitució d'hCNT1 (Pérez-Torras et al. 2013).

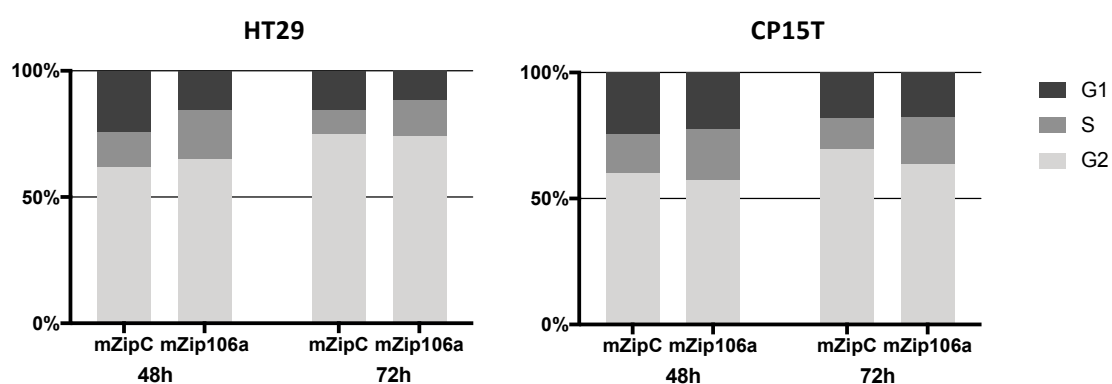


Figura 62. Anàlisi del perfil del cicle cel·lular amb el bloqueig del miR-106a mitjançant el vector miRZip-106 a les línies derivades de CRC i PDAC, HT29 i CP15T respectivament. Les cèl·lules es van transfectar amb els vectors miRZip106a i miRZipC, 48h després es van fixar amb etanol absolut durant 24h i es van tnyir amb iodur de propidi per ser analitzades per citometria de flux. Valors representats com les mitjanes de les 3N ±ES (excepte a les 72h CP15T n=2).

S'ha de tenir en compte però que caldrien més proves per atribuir aquests efectes directament a hCNT1, ja que s'ha descrit que miR-106a podria afectar al perfil del cicle cel·lular mitjançant la unió a altres dianes. S'ha descrit la seva unió a E2F o a PTEN en altres models cel·lulars (Yang et al. 2011, Qin et al. 2018) els quals podrien estar influint també en la modulació del cicle cel·lular. Tot i que s'ha de tenir en compte el *background* analitzat, aquestes dianes de miR-106a podrien estar actuant a favor d'aquest arrest, o al contrari, promovent l'avanç del cicle cel·lular i per tant compensant aquest arrest a fase S per altres vies.

Per tal de seguir analitzant els efectes d'hCNT1 com a transceptor mitjançant la modulació per part del miR-106a, es van analitzar l'estat de les quinases AKT i ERK, esperant-se un increment en la seva fosforilació tal i com succeeix al restituir hCNT1 a

la línia NP9 derivada de PDAC. Els resultats van mostrar una tendència a augmentar en la fosforilació d'AKT a les línies CaCo2 i NP9, encara que per CaCo2, aquest augment era degut a un augment de l'AKT total (Figura 63). Pel que fa a les altres dues línies cel·lulars, es va detectar de manera molt tènue la fosforilació d'AKT a la línia HT29, mentre que no es va detectar a la línia CP15T (Figura 63). En quant a la fosforilació d'ERK, es va observar increment d'aquesta a la línia NP9 (Figura 63), mentre que semblaria que hi ha una disminució de pERK a CP15T (Figura 63).

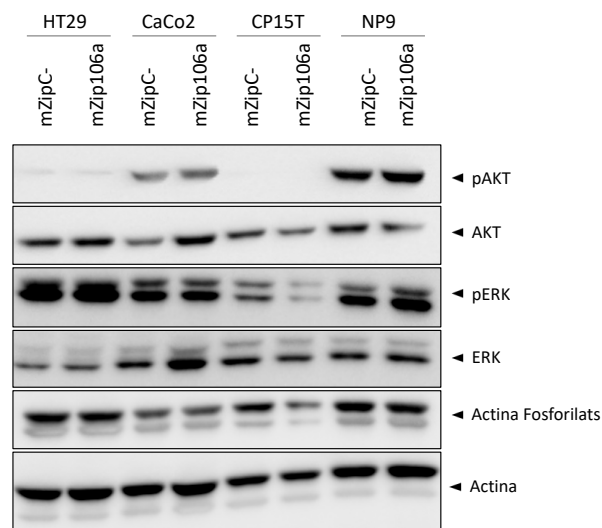


Figura 63. Expressió i fosforilació de les quinases AKT i ERK amb el bloqueig del miR-106a. Les cèl·lules van ser transfectades amb els vectors miRZip i miRZipC, a les 48h post-transfecció es va realitzar l'extracció de proteïna per tal d'analitzar-les mitjançant WB. Imatge de WB d'un sol experiment.

Per poder confirmar que aquests efectes observats són resultat de l'increment d'hCNT1 produïts pel bloqueig del miR-106a, caldria analitzar-los amb la combinació del bloqueig del miR-106a i el silenciament d'hCNT1. Per tal de determinar fins on arriba l'efecte de la modulació dels miRNAs sobre les funcions d'hCNT1 caldrien més anàlisis per confirmar la implicació del miR-106a sobre les funcions transceptores d'hCNT1, així com trobar nous mètodes més sensibles o diferents models per poder mesurar l'activitat de transport de manera més robusta.

S'ha de considerar el fet que els nivells d'expressió basal d'hCNT1 a les línies tumorals utilitzades és molt baixa. Tots els mètodes de detecció utilitzats fins al moment resulten difícils i a vegades poc sòlids degut a la variabilitat entre experiments.

4.3 Anàlisi de l'efecte dels microRNAs en la modulació dels transportadors en un nou model cel·lular tridimensional

Considerant la pèrdua de l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids (hCNTs) en models tumorals o immortalitzats, hi ha una manca de models útils per analitzar-ne la seva expressió. Per això, es va voler generar un nou model de treball per intentar incrementar l'expressió dels transportadors concentratius i així tenir més marge per la seva manipulació i detecció, podent treballar de manera més eficient i repetitiva amb l'expressió endògena del transportador. Aquest nou model es basa en la generació d'un cultiu cel·lular en tres dimensions (esferoides). Les condicions de cultiu es mantenen en el creixement d'aquestes cèl·lules, però en aquest cas s'utilitzen plaques no tractades per tal que les cèl·lules no s'hi adhereixin i així es generin de manera espontània els cultius 3D sense inducció amb cap factor addicional.

4.3.1 Efecte de la confluència cel·lular en l'expressió dels transportadors concentratius de nucleòsids

La generació d'aquest nou model, es basa en la premissa que els transportadors concentratius de nucleòsids estan associats a teixits més diferenciats, mentre que els equilibratius ho estan a proliferació, tal i com ja s'ha esmentat en apartats anteriors. D'aquesta manera, la primera aproximació va ser analitzar l'expressió dels transportadors de nucleòsids en condicions de cultiu en monocapa a diferents confluències cel·lulars, ja que anteriorment s'havia associat la sobreconfluència a més diferenciació i augment d'expressió en membrana d'hCNT1 (Garcia-Manteiga et al. 2003). Els resultats d'aquesta anàlisi van mostrar un increment del transportador concentratiu hCNT1 a major confluència a totes les línies analitzades, essent molt evident a CaCo2 (Figura 64). Aquest fet recolza la hipòtesi que els hCNTs estan associats a diferenciació, ja que la línia CaCo2 es diferencia en condicions de sobreconfluència. Els transportadors concentratius hCNT2 i hCNT3 no van mostrar aquest clar increment, tot i que hCNT2 sí que augmenta amb la confluència cel·lular a les línies HT29 i CP15T. En aquest cas no mostra canvis a la línia CaCo2, de la qual no es van obtenir resultats per la condició del 50% de confluència, ja que en l'anàlisi de RT-PCR no es van generar valors d'expressió d'hCNT2 en aquesta condició (Figura 64).

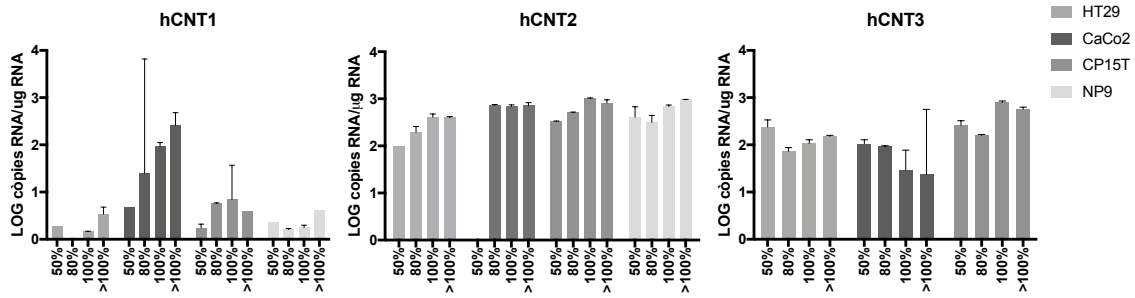


Figura 64. Expressió d'mRNA dels transportadors concentratius de nucleòsids en diferents condicions de confluència cel·lular. Les cèl·lules es van sembrar i es van realitzar les extraccions d'RNA quan es van aconseguir les confluències cel·lulars del 50, 80, 100% i sobreconfluència. Valors representats com la mitjana de les dues rèpliques \pm ES d'un sol experiment.

Per altra banda, els transportadors equilibratius, no van mostrar cap augment amb les diferents condicions de confluència a cap de les línies testades (Figura 65), tal i com s'esperava, ja que aquests s'han associat a teixits més proliferatius i menys diferenciats.

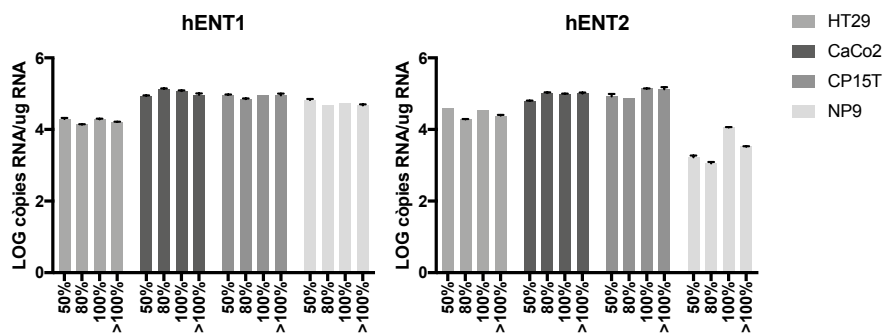


Figura 65. Expressió d'mRNA dels transportadors equilibratius de nucleòsids en diferents condicions de confluència cel·lular. Les cèl·lules es van sembrar i es van realitzar les extraccions d'RNA quan es van aconseguir les confluències cel·lulars del 50, 80, 100% i sobreconfluència. Valors representats com la mitjana de les rèpliques \pm ES d'un sol experiment.

L'increment del mRNA d'hCNT1 amb aquestes condicions de cultiu cel·lular no és un fet suficient per treballar en elevada confluència, ja que les limitacions del cultiu no permetien treballar bé per fer les diferents aproximacions experimentals, considerant que amb els temps, transfeccions i tractaments que es realitzen no s'obtingrien resultats reproduïbles, a més del fet que s'ha observat que l'elevada confluència també té efectes sobre el cicle cel·lular. Aquest fet, junt amb els resultats obtinguts van portar a la idea de treballar en cultiu on les condicions cel·lulars fossin similars a la sobreconfluència, però sense les limitacions que aquestes suposen, per tal de tenir un model on l'expressió d'hCNT1 fos més elevada i es pogués treballar de manera correcta. Per això, es va procedir a la generació d'un cultiu 3D d'esferoides, esperant que tal i com succeeix a les

cèl·lules en monocapa a alta confluència, aquests cultius també presentessin una major expressió d'hCNT1. Es considera que per la generació dels esferoides les cèl·lules es compacten i per tant hi hauria similitud amb el cultiu a sobreconfluència cel·lular. A més segons dades de GEO (*Gene Expression Omnibus*) el cultiu de colonosferes de la línia HT29, en aquest cas generat amb l'ajuda de suplementes incrementava l'expressió d'hCNT1 en comparació del cultiu de monocapa (GEO: GSE14773). Amb aquestes condicions es podria seguir validant de manera més extensa la relació del transportador concentratiu hCNT1 amb els microRNAs.

4.3.2 Generació d'un model cel·lular tridimensional: esferoides

En primer lloc, per tal de caracteritzar aquest cultiu cel·lular, es van generar els esferoides i es van mantenir durant 10 dies. Es va controlar el seu creixement, i es van analitzar els nivells basals d'mRNA dels transportadors hCNT1, hCNT3, hENT1 i hENT2 i dels miRNAs candidats miR-106a i miR-17. Aquests nivells es van comparar amb el cultiu amb monocapa al 80% de confluència, utilitzant el mateix cultiu cel·lular que s'havia emprat per la sembra dels esferoides.

Aquest creixement es va realitzar en les quatre línies utilitzades, les dues derivades de CRC -HT29 i CaCo2- i les derivades de PDAC -CP15T i NP9-. Cada línia cel·lular va presentar un creixement diferent sota aquestes condicions de cultiu. La línia derivada de CRC, HT29 va presentar un creixement en tres dimensions esfèric i regular (**Figura 66**), mentre que la línia derivada de PDAC, CP15T creixia formant una massa tridimensional poc compacta i irregular. En el cas de CaCo2 es va generar una massa irregular no compacta. Finalment, la línia NP9 no va presentar creixement tridimensional (**Figura 66**). El model, per tant, utilitzat per seguir l'estudi amb esferoides va ser HT29.

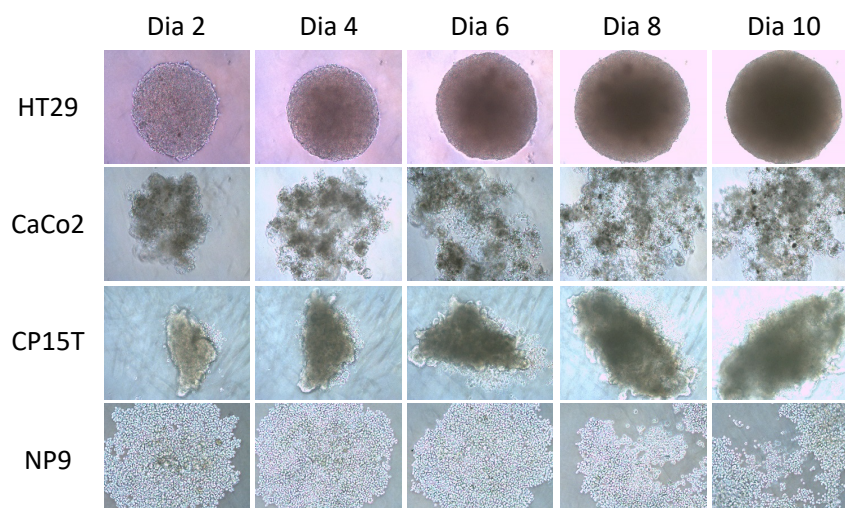


Figura 66. Creixement del cultiu cel·lular d'esferoides durant 10 dies de les diferents línies tumorals. Es van sembrar 50.000 cèl·lules per pou i es van mantenir en cultiu durant 10 dies. Imatges representatives del creixement de cada línia cel·lular als dies 2, 4, 6, 8 i 10 post-sembrada en les plaques de 96 pous (*low adhesion*). Imatges captades amb l'objectiu 10x.

La línia escollida HT29 va presentar un creixement regular en el temps. A les 48h post-sembrada, ja es va poder veure l'inici de la formació de l'esferoide, però va ser a partir del dia quatre quan ja es va poder observar la compactació cel·lular i el creixement en massa. Fins el dia 10, l'esferoide presentava un increment de creixement i una major compactació cel·lular. La seva velocitat màxima de creixement es va donar entre els dies 4 i 8, a partir del qual l'esferoide ja no creixia tant ràpidament (Figura 67).

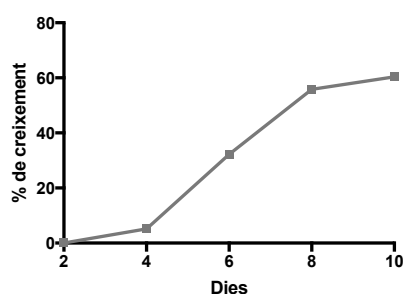


Figura 67. Creixement esferoides de la línia HT29 durant els 10 dies de creixement. Es va mesurar l'àrea de cada esferoide amb el programa ImageJ i es va calcular el percentatge de creixement des del dia 2 al dia 10.

Amb les condicions de cultiu establertes i el model cel·lular determinat, es va procedir a l'anàlisi basal dels transportadors en el cultiu d'esferoides en comparació amb els cultius cel·lulars en monocapa. Es va mesurar l'RNA dels transportadors a dia 10 del creixement dels esferoides. Els resultats van mostrar una major expressió només del transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1, així com una menor expressió de l'equilibratiu hENT1

(Figura 68). El transportador hENT2 no es va veure alterat en aquestes condicions de cultiu cel·lular, mentre que hCNT3 semblava tenir menys expressió (Figura 68).

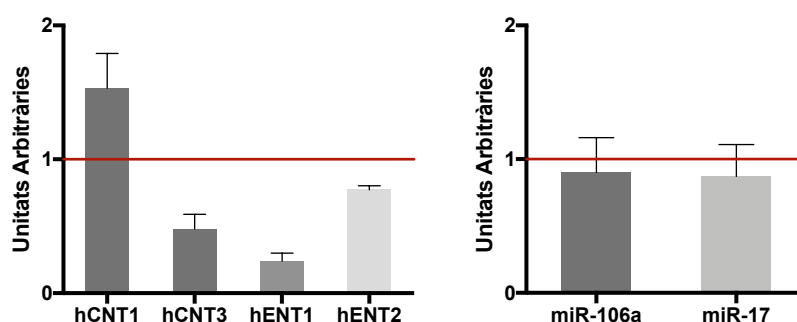


Figura 68. Expressió dels transportadors hCNT1, hCNT3, hENT1 i hENT2 i dels microRNAs miR-106a i miR-17 en el cultiu cel·lular tridimensional d'esferoides en comparació amb el cultiu en monocapa. Es van analitzar els miRNAs i els transportadors per RT-PCR en condicions basals dels esferoides a dia 10 de creixement. Valors normalitzats a la condició control (cultiu en monocapa=1). Valors representats com la mitjana de les rèpliques \pm ES d'un sol experiment.

Aquests resultats concorden amb els obtinguts en l'anàlisi de la confluència cel·lular, ja que l'augment més clar en els anteriors va ser també el del transportador hCNT1, mentre que hCNT3 a la línia cel·lular HT29 presentava una expressió variable i fins i tot més baixa a alta confluència (Figura 64).

L'establiment d'un nou model amb una major expressió del transportador hCNT1 permet ampliar l'estudi de la modulació de la seva expressió, no només en l'àmbit de la regulació dels miRNAs, sinó també per altres mecanismes. Els esferoides possibiliten la modulació de l'expressió del transportador en els dos sentits, ja sigui incrementant-la com disminuint-la, fet que fins ara només es podia fer en models cel·lulars on hCNT1 s'expressava de manera heteròloga. Aquest model, per tant, suposa una nova eina per a l'estudi de la proteïna hCNT1, podent analitzar l'expressió, funció i modulació dels seus nivells endògens.

En paral·lel, també es va analitzar l'expressió dels dos miRNAs candidats miR-106a i miR-17 en aquest nou model de cultiu cel·lular. En aquest cas, no es van observar alteracions significatives en l'expressió d'aquests (Figura 68), fet que va facilitar el seguiment i la interpretació de les dades obtingudes amb aquest model cel·lular.

4.3.3 Efecte de la modulació dels microRNAs en l'expressió dels transportadors en esferoides

De la mateixa manera que es va fer al cultiu en monocapa (apartat 4.1 i 4.2), es van modular els nivells de miRNAs, en aquest cas al cultiu d'esferoides, per validar la implicació d'aquests sobre la regulació d'hCNT1. Treballar amb aquest nou model, va permetre l'anàlisi de la modulació dels miRNAs tant a nivell de missatger com de proteïna en els dos sentits, tant el silenciament i bloqueig d'aquests per tal d'observar un increment d'hCNT1, com la sobreexpressió dels miRNAs per disminuir l'expressió del transportador. Es van utilitzar les mateixes condicions de transfecció i silenciament que en el cultiu de monocapa, escalades a la placa de 96 pous utilitzada per al creixement dels esferoides. En aquest cas, les transfeccions es van realitzar a dia 5 del cultiu (quan l'esferoide ja està format) i les anàlisis de l'expressió del transportador es van realitzar 48h després a dia 7 del creixement dels esferoides (Figura 69). Es va analitzar l'expressió del transportador tant a nivell d'mRNA com de proteïna. Els resultats d'anàlisi del missatger van mostrar un clar increment del transportador amb el silenciament del miR-106a, i no tant clar amb el miRZip-106a (Figura 69). En quant a la sobreexpressió dels miRNAs amb la transfecció dels miRNA mímic no es va observar cap disminució significativa (Figura 69).

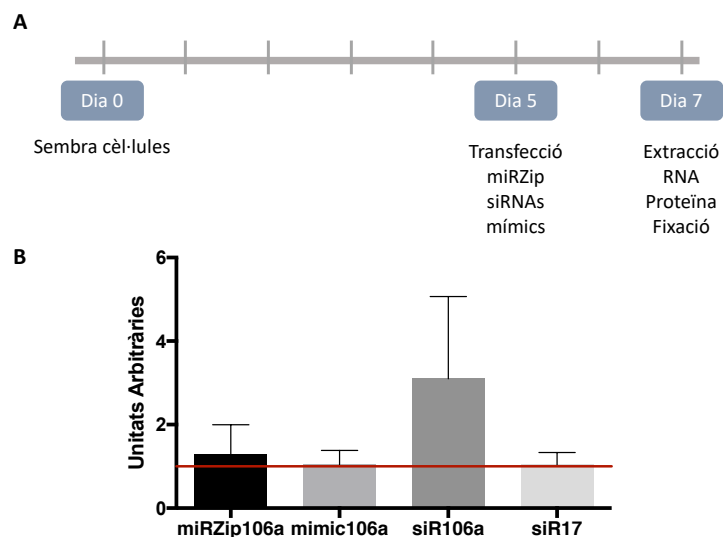


Figura 69. Expressió del mRNA d'hCNT1 amb la modulació dels miRNAs miR-106a i miR-17 al cultiu tridimensional d'esferoides. Representació esquemàtica de la pauta de creixement i transfecció dels esferoides (A). Expressió del mRNA d'hCNT1 amb la modulació dels miRNAs (B). Els esferoides es van transfectar a dia 5 de creixement amb el vector miRZip106a i els siRNAs siR-106a i siR-17, així com els miRNAs mímic miR-106a. A les 48h post-transfecció es va analitzar l'mRNA d'hCNT1 per RT-PCR. Valors representats com a mitjana de les 3N ± ES i normalitzats a la condició control (C=1). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; p<0.05*, p<0.01**, p<0.005***, p<0.001****.

En quant a l'expressió proteica del transportador hCNT1 es van realitzar dues aproximacions. Per una banda es va mesurar l'expressió a partir d'un homogenat de diversos esferoides mitjançant *Western Blot* (WB) i per l'altra, es van fixar els esferoides sencers per tal de detectar la proteïna hCNT1 per immunofluorescència al microscopi confocal. De la mateixa manera, es van fixar i incloure en OCT esferoides sencers i se'n van fer talls amb el criòstat per detectar també hCNT1 per immunofluorescència. Els resultats del WB van mostrar un clar increment de la proteïna hCNT1 amb els silenciament dels dos miRNAs miR-106a i miR-17 (Figura 70). En quant al bloqueig del miR-106a amb el vector miRZip-106a, va mostrar una tendència al increment però de manera poc clara (Figura 70). La sobreexpressió amb els miRNA mímic no van induir canvis (Figura 70).

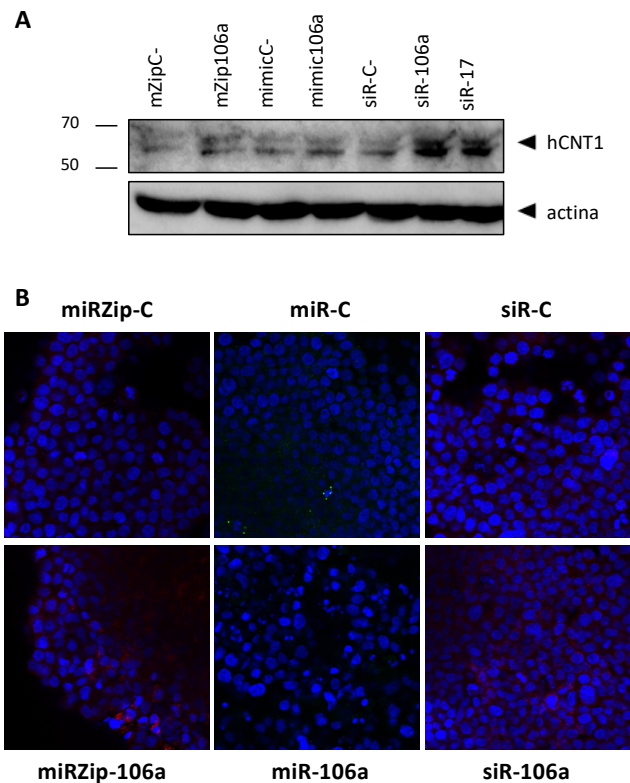


Figura 70. Expressió de la proteïna hCNT1 amb la modulació dels microRNAs miR-106a i miR-17 al cultiu tridimensional d'esferoides. Els esferoides es van transfectar a dia 5 de creixement amb el vector miRZip106a i els siRNAs siR-106a i siR-17, així com els miRNA mímic miR-106a. A les 48h post-transfecció es va analitzar la proteïna hCNT1 mitjançant WB o es van fixar els esferoides per ser analitzats per immunofluorescència. Imatges de WB representatives de 3 experiments independents. Imatges d'immunofluorescència de la localització d'hCNT1 marcat en vermell pel miRZip i siRNAs i verd pels mímic. Imatges representatives de dos experiments independents. X50

Pel que fa a les imatges d'immunofluorescència, es va observar un clar augment de la proteïna hCNT1 amb el bloqueig i silenciament del miR-106a (Figura 70). A més la

localització del transportador amb aquest silenciament es situava clarament a membrana tot i també observar-se a citoplasma. En quant al miRNA mimic miR-106a es va observar una disminució del transportador, tot i que la detecció basal segueix essent molt baixa amb aquesta tècnica (Figura 70).

Pel que fa als resultats del bloqueig del miR-106a amb el vector miRZip-106a, no han resultat tant efectius en aquests cultius tridimensionals. En canvi els silenciaments i la transfecció dels miRNA mítics han estat millors. Aquest fet segurament es deu a que la transfecció del miRZip és menys eficient considerant la complexitat de l'estructura de l'esferoide i la mida més gran del vector miRZip. En canvi, la transfecció amb els siRNAs i els miRNA mítics potser podrien arribar millor a les diferents parts de l'esferoide gràcies a la seva mida més reduïda. De tota manera, els resultats obtinguts tant a nivell d'RNA com de proteïna han seguit en la mateixa direcció que els de cultiu en monocapa, corroborant així la modulació d'hCNT1 per part dels microRNAs miR-106a i miR-17.

Tal i com es va realitzar al cultiu en monocapa, i amb l'evidència que es modula l'expressió del transportador mitjançant els miRNAs, també es va voler valorar l'activitat d'hCNT1 com a transceptor. Per això, es van analitzar per *Western Blot* les fosforilacions de les quinases AKT i ERK amb la modulació dels miRNAs. Els resultats obtinguts, que ja havien mostrat una expressió tènue de la fosforilació d'AKT en monocapa, van evidenciar una pèrdua de la fosforilació d'AKT en el cultiu d'esferoides. En les condicions de cultiu en monocapa es va poder detectar aquesta fosforilació, mentre que no es va observar en cap condició del cultiu d'esferoides, ni tant sols a la basal tot i forçar a exposicions llargues (Figura 71). Aquests resultats, es relacionarien amb el fet que en el cultiu d'esferoides s'espera una menor proliferació, i per tant seria raonable que hi hagi una reducció de la fosforilació d'AKT, la qual es relacionaria amb la proliferació cel·lular (Agarwal, Brattain and Chowdhury 2013).

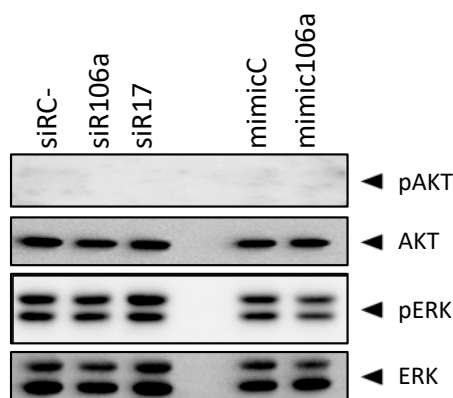


Figura 71. Expressió i fosforilació de les quinases AKT i ERK amb el bloqueig del miR-106a i el silenciament i sobreexpressió dels miR-106a i miR-17 en el cultiu d'esferoides. Els esferoides es van transfectar a dia 5 de creixement amb el vector miRZip106a i els siRNAs siR-106a i siR-17, així com els miRNAs mítics miR-106a i miR-17. A les 48h post-transfecció es va realitzar el WB. Imatge de WB d'un sol experiment.

En quant a la fosforilació d'aquestes quinases amb la modulació dels miRNAs, no es va observar cap canvi de patró de fosforilació ni en els nivells totals d'aquestes quinases (Figura 71).

Per altra banda, amb la confirmació de la capacitat del miR-106a i miR-17 de regular l'expressió del transportador hCNT1, tant a nivell d'RNA com de proteïna i a més la localització d'aquesta a membrana, es va voler avaluar la funcionalitat d'hCNT1. En primer lloc, es va determinar la capacitat transportadora amb la modulació dels miRNAs en aquest nou model cel·lular. Per això es va realitzar l'assaig de transport a dia 7 de creixement dels esferoides, 48h després de la transfecció del vector miRZip. L'assaig es va realitzar bloquejant els transportadors equilibratius amb dipiridamol, per tal de veure només l'efecte en els concentratius. Els resultats van mostrar una tendència a l'augment del transport en bloquejar el miR-106a (Figura 72).

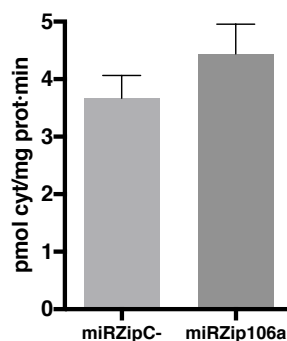


Figura 72. Activitat de transport concentratiu amb el boqueig del miR-106a. Valors representats com la mitjana \pm ES de tres experiments independents. La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; $p < 0.05^*$.

Per tant, considerant que l'augment d'expressió d'hCNT1 es traduïa en un petit augment de la seva activitat de transport, es va pensar en l'oportunitat de realitzar una aproximació més translacional, analitzant la capacitat de modular la citotoxicitat de fàrmacs antitumorals derivats de nucleòsids.

4.3.4 Modulació de l'efecte dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids mitjançant els microRNAs

Un dels papers importants que tenen els transportadors de nucleòsids és que són els responsables de la internalització de diversos fàrmacs anàlegs de nucleòsids. Aquests són molècules que mimetitzen l'estructura dels nucleòsids naturals per aprofitar els seus mecanismes d'internalització i metabolització per tal d'incorporar-se al DNA. Gràcies a les seves modificacions, una vegada s'han unit al DNA en poden aturar la seva síntesi, inhibir la divisió cel·lular, generar un dany al DNA i així induir l'apoptosi (Jordheim et al. 2013, Parker 2009). Els fàrmacs anàlegs de nucleòsids s'utilitzen àmpliament en teràpia oncològica tant per tractar diferents tipus de tumors sòlids com malalties limfoproliferatives. El primer pas i sovint limitant de l'acció d'aquests fàrmacs és la internalització a la cèl·lula diana. En el cas dels tumors sòlids s'utilitzen anàlegs de pirimidines. En son exemples la gemcitabina, el 5-Fluorouracil (5-FU), el 5-DFur i la floxuridina. Tots ells excepte el 5-FU són internalitzats, entre altres, per hCNT1. Per tant l'expressió d'aquest és determinant en la bioassequibilitat d'aquests fàrmacs. La pèrdua d'hCNT1 durant el procés carcinogènic podria estar relacionada amb la resistència a aquestes teràpies. De fet, en general s'havia associat la supervivència en pacients tractats amb aquests fàrmacs a l'expressió dels transportadors equilibratius (Deng et al.

2014, Vincenzi et al. 2017, Kim et al. 2018). Per això va semblar una bona aproximació la restitució de l'activitat d'hCNT1 per millorar la quimioresistència a aquests fàrmacs. En aquest sentit, es va procedir a determinar l'efecte de la modulació d'hCNT1 mitjançant els miRNAs sobre l'eficàcia dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids en esferoides.

Es van créixer els esferoides en les mateixes condicions anteriorment esmentades i es van modular de la mateixa manera els miRNAs. A les 48h des de la modulació dels miRNAs ja sigui per silenciament, bloqueig o sobreexpressió, es van tractar els esferoides amb dues dosis dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids 5-DFur (20 i 50nM) i gemcitabina (10 i 20nM). Després de 72h, als 10 dies de creixement de l'esferoide, es va realitzar l'assaig de viabilitat.

Els resultats amb obtinguts amb el tractament de 5-DFur van mostrar una tendència a l'increment en la mort cel·lular amb el tractament i, el bloqueig o el silenciament, del miR-106a. En quant a l'efecte del fàrmac junt amb la transfecció dels miRNA mímic, no es va observar aquest efecte, sinó que més aviat hi havia una tendència a la resistència al fàrmac (Figura 73).

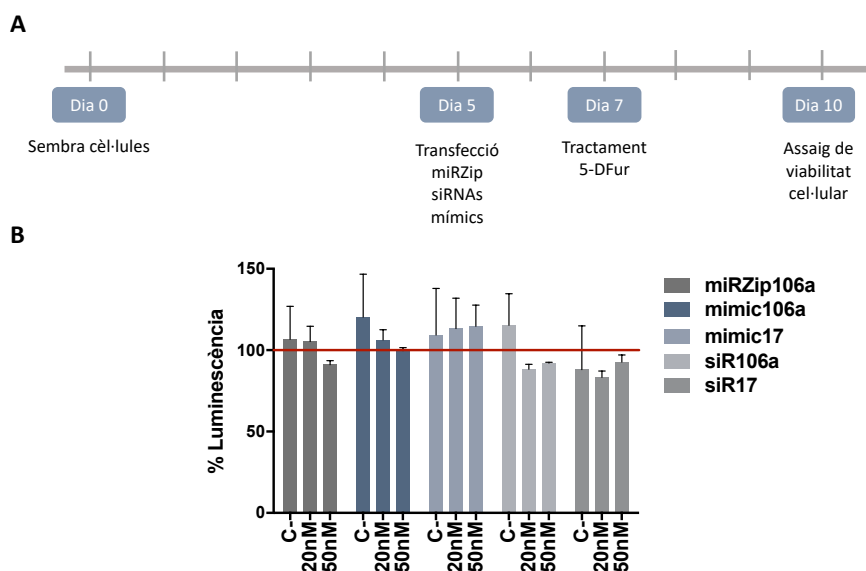


Figura 73. Efecte del 5-DFur en la viabilitat cel·lular dels esferoides amb la modulació dels microRNAs. Representació esquemàtica de la pauta de creixement, transfecció, tractament i assaig de viabilitat dels esferoides (A). Els esferoides es van transfectar a dia 5 de creixement amb el vector miRZip106a i els siRNAs siR-106a i siR-17, i els mítics miR-106a i miR-17. L'assaig de viabilitat cel·lular es va mesurar 48h post-transfecció. Dades de percentatge de luminescència (B). Valors representats com a mitjana ± ES de tres experiments independents i normalitzats a la condició control de cada condició (C=100%). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; p<0.05*.

Pel que fa als resultats amb el tractament de gemcitabina, van mostrar un major efecte del fàrmac al silenciar els microRNAs miR-106a i miR-17 i al bloquejar el miR-106a (Figura 74).

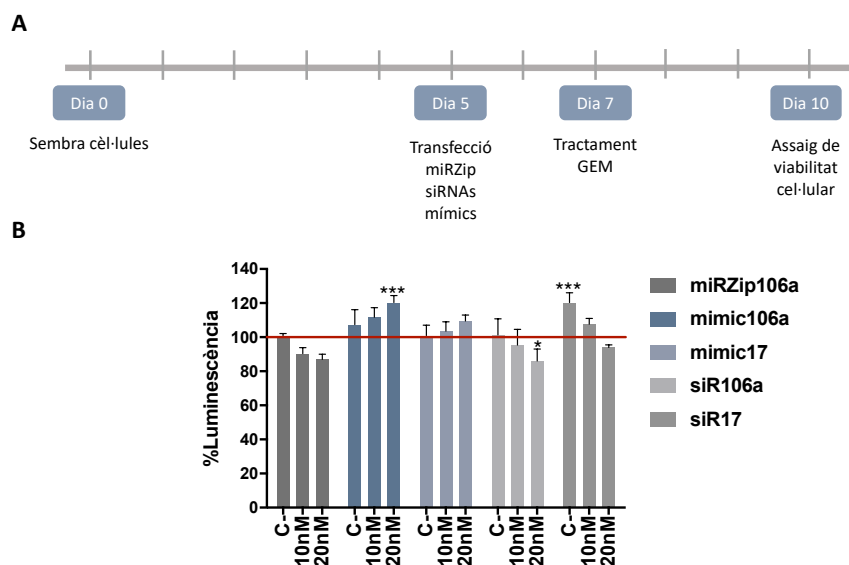


Figura 74. Efecte de la gemcitabina en la viabilitat cel·lular dels esferoides amb la modulació dels microRNAs. Els esferoides es van transfectar a dia 5 de creixement amb el vector miRZip106a i els siRNAs siR-106a i siR-17, i els mímics miR-106a i miR-17. L'assaig de viabilitat cel·lular es va mesurar 48h post-transfecció. Dades de percentatge de luminescència. Valors representats com a mitjana de les 3N \pm ES i normalitzats a la condició control de cada condició (C=100%). La significança estadística es va determinar mitjançant el test t de Student; $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** $p < 0.005$ ***, $p < 0.001$ ****.

Per altra banda, la sobreexpressió del miR-106a va mostrar una clara resistència al fàrmac mostrant una major viabilitat cel·lular amb la sobreexpressió del miRNA en comparació amb el tractament en condicions basals (Figura 74). En quant al mímico miR-17, els resultats no van mostrar cap canvi significatiu en la viabilitat cel·lular (Figura 74).

Amb la modulació dels miRNAs per tant, s'aconsegueix un major efecte dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids. Mentre que amb la sobreexpressió dels miRNAs hi hauria una resistència al tractament a causa de la dificultat d'internalització d'aquests per la disminució de l'expressió del transportador, fet que pot estar succeint durant el procés tumoral.

Aquests resultats obren la porta a la possibilitat de millorar les teràpies amb els fàrmacs anàlegs de nucleòsids, ja que amb la modulació dels miRNAs i en conseqüència del transportador hCNT1, s'aconsegueix millorar de manera significativa l'efecte, en aquest cas, de la gemcitabina. A més, també es podria considerar utilitzar els miRNAs com a biomarcadors per determinar poblacions adients o resistents a la teràpia.

Els mecanismes de resistència en teràpia oncològica són molt importants i és un àmbit que s'ha de seguir investigant i estudiant. Un possible mecanisme d'aquesta resistència és la pèrdua dels transportadors concentratius de nucleòsids, concretament hCNT1, el qual s'ha vist que disminueix en tumors molt diversos. Considerant que aquests són importants en la bioassequibilitat dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids, la modulació de la seva expressió per part dels miRNAs és un fet rellevant, ja que en última instància, els microRNAs són en part responsables d'aquesta resistència a alguns fàrmacs. No es podria descartar la possibilitat d'utilitzar elements externs, o fins i tot fàrmacs per modular aquests microRNAs abans de certes teràpies per tal d'afavorir l'entrada de fàrmacs i per tant potenciar-ne el seu efecte. En aquest sentit s'hauria de seguir validant en altres models preclínic l'efecte de la modulació dels microRNAs sobre la resposta als fàrmacs anàlegs de nucleòsids a través de la regulació d'hCNT1.

A watercolor splash graphic with a mix of yellow, orange, and light blue colors, positioned to the left of the text.

DISCUSSIÓ GENERAL

DISCUSSIÓ GENERAL

El transportador concentratiu de nucleòsids hCNT1 (*SLC28A1*), pertany a la família gènica *SLC28*, la qual codifica a més per hCNT2 i hCNT3 (*SLC28A2* i *SLC28A3* respectivament). Aquests difereixen en quant a la selectivitat de substrat, ja que hCNT1 transporta pirimidines, hCNT2 purines i uridina i hCNT3 els dos tipus de nucleòsids. A més, també es diferencien pel seu perfil d'expressió, encara que els tres coincideixen en epitelis absortius i reabsortius com el fetge, el ronyó o l'intestí prim (Molina-Arcas et al. 2009). L'altre família que codifica pels transportadors de nucleòsids (NTs), en aquest cas els equilibratius hENT1, hENT2 i hENT3, és la *SLC29*. hENT1 i hENT2, els millor caracteritzats, presenten una major selectivitat, però menor afinitat pel seu substrat. L'expressió dels hCNTs es considera exclusiva d'epitelis polaritzats, facilitant així un flux vectorial dels nucleòsids de fet, els hCNTs s'expressen en tots els teixits considerats determinants per la farmacocinètica anteriorment esmentats (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). En quant als equilibratius, la seva distribució en aquest cas és més ubiqua que la dels hCNTs, encara que la seva localització principalment a les membranes basolaterals segueix afavorint aquest flux vectorial dels nucleòsids. El rol principal i canònic dels NTs a la cèl·lula és el transport de nucleòsids, i per tant són els responsables de l'homeòstasi de nucleòsids i nucleobases segons les provisions d'aquests en les diferents condicions fisiològiques. L'alteració d'aquests transportadors en patologia podria desenvolupar una situació de desequilibri en l'homeòstasi dels nucleòsids amb les conseqüències que això suposaria, com per exemple la necessitat de realitzar més síntesi *de novo* de nucleòtids per compensar la falta de la recuperació d'aquests deguda a la disminució dels transportadors (Pastor-Anglada and Perez-Torras 2015). En aquest sentit, durant el procés oncològic, on la proliferació és més elevada, les necessitats de nucleòtids augmentarien per tal de cobrir les necessitats per la síntesi de DNA. Encara que s'esperaria que els transportadors estiguessin cobrint aquestes necessitats, s'ha descrit que l'expressió d'hCNT1 està disminuïda en aquestes patologies. Concretament s'ha observat una pèrdua d'aquest en alguns tipus de tumors, com per exemple en els de mama o en tumors ginecològics (Farre et al. 2004, Gloeckner-Hofmann et al. 2006). En aquesta tesi, s'ha demostrat també que hi ha una pèrdua del transportador hCNT1

en càncer colorectal, adenocarcinoma ductal pancreàtic i hepatocarcinoma. També es va observar una pèrdua d'hCNT2 en CRC però no va ser el cas en PDAC ni HCC, on inclús es va observar una tendència a l'augment, igual que succeïa en aquests tres tipus de tumor per hCNT3. Aquests fets podrien ser deguts a l'heterogeneïtat cel·lular d'aquests tumors, on els diferents tipus cel·lulars podrien estar expressant de manera diferent els transportadors i els miRNAs com seria el cas dels macròfags infiltrats. Concretament, s'ha descrit que en pancreatitis la càrrega del miR-122 als exosomes segregats en plasma es veuria reduïda, fet que es relacionaria amb la inflamació (Jiménez-Alesanco et al. 2019). En aquest cas, els nivells analitzats en les mostres tumorals de PDAC també presenten una disminució d'aquest miRNA, així com una tendència a augmentar d'hCNT2. A més, en HCC concretament, cal destacar que es prové d'un fetge cirròtic, en el qual hi ha una inflamació, que aporta a aquest teixit unes característiques prèvies, de major infiltració i fibrosi (Muller, Bird and Nault 2020, Lowes et al. 1999) i amb això una identificació de l'expressió dels transportadors encara més complexa. Conforme amb aquesta pèrdua en teixit tumoral, l'expressió dels transportadors en les línies cel·lulars derivades de tumors també es presenta força baixa, fet que dificulta la seva detecció tant a nivell d'mRNA com de proteïna, així com la mesura de la seva activitat com a transportadors. Aquesta però, no és la única funcionalitat del transportador hCNT1, ja que aquest s'ha definit com a transceptor, atribuint-li funcions que van més enllà de la capacitat de translocar el seu substrat (Pérez-Torras et al. 2013). Aquestes funcions, que poden ser independents de l'activitat transportadora, es basen en la modulació del perfil del cicle cel·lular. El fet que aquest transportador sigui l'únic que presenta una disminució evident en el teixit tumoral, on teòricament hi ha una gran demanda de nucleòsids, posa de manifest la importància d'aquestes funcions addicionals d'hCNT1 com a transceptor. S'anticipa doncs, que la pèrdua d'aquestes és més determinant durant el procés oncològic que la capacitat de transportar nucleòsids, fet que segurament estaria cobert pels transportadors equilibratius. Per exemple, s'ha descrit que hENT2 està incrementat en estadis avançats de diversos tumors com l'hepatocarcinoma o el càncer d'ovari (Chen et al. 2010, Bock et al. 2012). Aquests canvis doncs s'han d'avaluar des de diverses perspectives, tenint en compte totes les funcions d'hCNT1 així com la seva implicació en el procés carcinogènic. En aquest sentit, la restitució de l'expressió d'hCNT1 en models de tumors de pàncrees va mostrar la

capacitat d'aquest transceptor de produir efectes de supressor tumoral (Pérez-Torras et al. 2013). Aquest fet, evidencia la rellevància de la pèrdua d'hCNT1 durant el procés carcinogènic. Per tant, hCNT1 podria tenir un paper en la biologia del càncer. Per això, els mecanismes pels quals es regula la seva expressió, els quals en gran mesura encara són desconeguts, són de gran importància per tal d'entendre millor el procés de desenvolupament tumoral. La xarxa de regulació d'hCNT1 tindria diversos elements, els quals poden intervenir de manera combinada i complexa, entre els quals, hi ha els miRNAs. Aquests RNAs petits no codificants estan també alterats en diversos tipus de càncer (Bartel 2009). La seva expressió aberrant, sol suposar un increment en teixit tumoral. Els resultats obtinguts en l'anàlisi de mostres clíniques de CRC, PDAC i HCC ha mostrat un augment en l'expressió d'alguns miRNAs. A més, s'ha descrit que l'elevada expressió d'aquests es corresponia amb la pèrdua d'expressió d'hCNT1 en les mateixes mostres, mostrant així una correlació negativa entre els dos elements. Concretament, de tots els miRNAs candidats es van observar correlacions negatives entre hCNT1 i els miRNAs miR-106a (en els tres tipus de tumor), miR-17 (en les mostres de PDAC) i de miR-18a (tant en PDAC com en HCC). D'aquests tres candidats, es va validar la unió a l'extrem 3'UTR d'hCNT1 per al miR-106a i el miR-17, els quals compartien lloc d'unió a aquest 3'UTR. Amb aquesta evidència, es va demostrar per primera vegada que l'mRNA que codifica hCNT1 és diana directa de miRNAs. La regulació post-transcripcional per miRNAs es caracteritza per ser fina i sensible deguda a la unió a l'extrem 3'UTR del seu gen diana, del qual en poden inhibir o degradar el seu mRNA. En aquest punt, també es van detectar diferències entre tots els transportadors de nucleòsids, ja que hCNT1, tot i tenir l'extrem 3'UTR de l'mRNA més curt de tots els transportadors, és el que presenta un major nombre de llocs d'unió putatius per miRNAs, mentre que als altres transportadors gairebé no se'n detecten, a excepció d'hCNT2. Tampoc en els transportadors equilibratius es detectarien llocs d'unió a miRNAs. Aquest fet, realça de nou la important regulació a la que està sotmesa hCNT1 enfront dels altres transportadors. Amb l'estudi del 3'UTR, es va observar la presència de diversos transcrits pel transportador hCNT1. Curiosament un d'ells tenia un 3'UTR molt més llarg que el del transportador descrit, i a més era un transcrit més curt, el qual si s'arribés a traduir donaria lloc a una proteïna de 175aa amb només els dos primers dominis transmembrana. Aquesta variant d'hCNT1 s'ha començat a caracteritzar en aquesta tesi, però encara es desconeixen les funcions

que tindria, ja que podria estar actuant com a transceptor si aquesta variant es traduís, considerant que podria tenir els dominis necessaris per realitzar aquestes funcions, mentre que li manquen els necessaris per dur a terme l'activitat transportadora. Per altra banda, un possible rol d'aquesta variant seria la regulació a nivell post-transcripcional d'altres proteïnes, o del mateix hCNT1, actuant com a *sponge* de diversos miRNAs. Aquesta hipòtesi sorgeix del fet que és un transcrit amb un llarg extrem 3'UTR, amb molts possibles llocs d'unió a miRNAs, incloent el miR-106a i el miR-17, el qual podria estar segrestant els miRNAs i així regular l'expressió d'hCNT1. Aquest fet, s'hauria de seguir validant i estudiant, valorant com afecta la presència o absència d'aquesta variant sobre l'expressió de la proteïna canònica hCNT1. Un fet a considerar sobre el 3'UTR són els canvis que aquests poden patir. Concretament, s'ha descrit que l'escurçament d'aquests és un mecanisme recurrent en càncer, per tal de desregular el control dels miRNAs sobre els seus mRNA diana i així afavorir la progressió tumoral (Andres et al. 2019).

Tal i com s'ha assenyalat anteriorment, la regulació d'hCNT1 es basa en la interacció de diversos elements. En primer lloc, els factors de transcripció, que en regularien en primera instància la seva expressió. Anteriorment s'havia demostrat la modulació d'hCNT1 pel factor de transcripció HNF4 α (Fernandez-Veledo et al. 2007, Klein et al. 2009). Segons dades obtingudes dins el marc de la tesi doctoral de la Dra. Hamsa Banjer, en un *array* de mostres on es sobreexpressava hCNT1, es van veure augmentats diversos gens relacionats amb el cicle cel·lular com E2F, CDK4, RB1, mentre que l'expressió d'altres gens es va veure disminuïda, com és el cas de KLF6 o de TP53. Seguint amb l'estudi d'aquestes dades, en la tesi doctoral de la Dra. Aida Mata-Ventosa, es van determinar diversos factors de transcripció que s'unien al promotor d'*SLC28A1*. D'aquest treball, es va desprendre, l'alt nivell de repressió al qual estava sotmès el promotor d'hCNT1 vers els altres transportadors. Es va determinar la unió dels factors de transcripció KLF6 i E2F1 al promotor d'*SLC28A1*. El primer induiria l'expressió d'hCNT1, mentre que E2F1 n'estaria reprimint la seva expressió. Com ja s'ha comentat, aquests elements podrien estar interactuant entre ells. En aquest cas, s'ha determinat que tant KLF6 com E2F1 tindrien llocs d'unió a miRNAs que serien coincidents entre els tres. E2F1, és un factor de transcripció relacionat amb la progressió del cicle cel·lular

mitjançant l'eix CDK4-pRB-E2F1, promovent l'entrada a la fase S del cicle (van den Heuvel and Dyson 2008). S'ha descrit que existeix una autoregulació negativa entre E2F1 i els miR-17 i miR-20a els quals l'estarien reprimint, alhora que aquest n'estaria regulant la seva expressió (Li et al. 2017). Tenint en compte que en aquesta tesi s'ha validat la unió del miR-17 a l'extrem 3'UTR d'hCNT1 i que aquest pot estar regulat per E2F1, que alhora també ho està per aquest miRNA, seria interessant aprofundir en aquesta possible regulació de tots els elements esmentats per tal de discernir aquesta complexa xarxa de regulació.

Per altra banda, està descrit que l'estat proliferatiu i de diferenciació de les cèl·lules determina l'expressió dels transportadors de nucleòsids. D'aquesta manera, els transportadors concentratius s'associen a estats més diferenciats, mentre que els equilibratius ho estan a fenotips més proliferatius (Pastor-Anglada et al. 2018). Amb aquesta idea, i considerant que l'expressió dels hCNTs és molt baixa a les línies tumorals, es va decidir generar un nou model cel·lular de treball, basat en la premissa que els hCNTs incrementen la seva expressió en condicions de sobreconfluència cel·lular (Garcia-Manteiga et al. 2003). En aquest sentit es van generar cultius tridimensionals (esferoides) dels quals es va demostrar que expressaven més hCNT1 que en cultiu en monocapa. Aquest fet va permetre una millor detecció d'hCNT1 endogen, tant a nivell d'mRNA com de proteïna, permetent també l'anàlisi funcional d'hCNT1. Amb aquest model de treball, es van poder confirmar els resultats obtinguts en cultiu en monocapa pel que fa a la regulació dels miRNAs sobre l'expressió d'hCNT1. En ambdós tipus de cultiu, es va determinar un increment de l'expressió del transportador amb el silenciament o bloqueig del miR-106a i el silenciament del miR-17, així com una disminució quan es sobreexpressen aquests miRNAs. Aquest fet es va corroborar també a nivell de proteïna en el cultiu d'esferoides, a més determinant que el transportador es localitzaria en part a la membrana cel·lular, i per tant podria estar realitzant les seves funcions com a transportador. L'augment del transport es va constatar amb els assajos d'activitat realitzats en esferoides amb l'increment d'hCNT1 amb el bloqueig del miR-106a. Aquests resultats, van portar a determinar la possibilitat de millorar les teràpies amb fàrmacs anàlegs de nucleòsids, afavorint la seva entrada a la cèl·lula amb la modulació d'hCNT1 per part dels miRNAs. En aquest sentit, els assajos de viabilitat

realitzats amb dos fàrmacs utilitzats en teràpies oncològiques (5-DFur i gemcitabina) van mostrar un increment del seu efecte amb la disminució dels miRNAs, així com l'aparició de certa resistència al fàrmac amb la sobreexpressió dels miRNAs. A més, en aquest model, es realça la importància de la modulació d'hCNT1 en la captació dels fàrmacs, ja que els altres transportadors que els internalitzen es troben disminuïts en aquest cultiu tridimensional i per tant no hi estarien contribuint netament. A més, la importància del paper d'hCNT1 en la bioassequibilitat de la gemcitabina és evident, ja que l'entrada d'aquest fàrmac per aquest transportador és major que pels altres transportadors descrits (hCNT3, hENT1 i hENT2) (Mackey et al. 1999). Per tant, una pèrdua d'hCNT1 seria més limitant en la bioassequibilitat d'aquest fàrmac que qualsevol dels altres transportadors esmentats. Aquest fet seria especialment important en càncer de pàncreas on la gemcitabina és fàrmac de primera línia i els resultats obtinguts no son significatius.

Tenint en compte aquests interessants resultats, pren força la projecció clínica dels miRNAs i s'hauria de seguir validant en altres models preclínic per tal d'avaluar possibles estratègies de millora de les teràpies actuals, sense obviar la possibilitat d'utilitzar aquests miRNAs com a biomarcadors. En aquest sentit, darrerament s'està treballant per a incloure els miRNAs en la teràpia oncològica principalment com a biomarcadors, ja que les seves característiques permeten una detecció fàcil i ràpida, en molts casos no invasiva, considerant que es poden detectar en diversos fluids corporals (Vila-Navarro et al. 2019, Vila-Navarro et al. 2017, Marcuello et al. 2019b, Marcuello et al. 2019a, Herreros-Villanueva et al. 2019). A més la seva expressió és força constant en aquests fluids i s'ha demostrat que hi ha una expressió diferencial robusta en diverses patologies com el cas del PDAC, el càncer de mama o el CRC (Valihrach et al. 2019, Marcuello et al. 2019b, Vila-Navarro et al. 2019). En el cas concret de la modulació d'hCNT1 per part dels miRNAs, s'ha de considerar també, que l'efecte dels miRNAs sobre l'increment d'hCNT1 no només és determinant per la bioassequibilitat dels fàrmacs derivats de nucleòsids, o per a determinar teràpies dirigides classificant poblacions adients o resistents als fàrmacs, sinó que la translació clínica va més enllà, considerant, que la restitució d'hCNT1 mitjançant els miRNAs podria tenir efectes de supressor tumoral degut a les seves característiques de transceptor (Pérez-Torras et al. 2013). En

aquesta direcció, es podria plantejar la translació dels resultats a l'aplicació farmacològica, de manera similar a l'acció del fàrmac Miravirsen, el qual és un antagonista del miR-122 i s'està valorant la seva aplicació en el tractament de l'hepatitis C (HCV), es podrien realitzar antagonistes dels candidats miR-106a i miR-17 per a incrementar l'expressió d'hCNT1 i així reproduir els efectes antitumorals descrits ((Pérez-Torras et al. 2013). Pel que fa però als resultats obtinguts, són dos els miRNAs responsables de la modulació d'hCNT1 i per tant les possibles dianes per a la generació de noves teràpies. En aquest cas, si amb la inhibició farmacològica d'un d'aquests dos miRNAs no fos suficient, es podria enfocar l'estratègia terapèutica des de la vessant de la teràpia gènica. Tot i les limitacions que avui en dia encara condicionen aquest tipus de teràpia, la generació d'un *sponge* que segrestés aquests dos miRNAs es podria valorar com a tractament per a aquests tipus de tumor. En aquesta tesi, els resultats obtinguts sobre la implicació dels miRNAs en el cicle cel·lular van en la mateixa direcció, observant-se un increment en fase S del cicle amb el bloqueig del miR-106a, encara que aquests resultats s'haurien de seguir validant per confirmar que aquest efecte és degut a l'increment d'hCNT1. Tot i que s'ha de considerar que el miR-106a podria tenir també altres dianes que afectessin al cicle cel·lular com pot ser el cas de les ja descrites PTEN, o E2F (Yang et al. 2011, Qin et al. 2018).

La relació dels miRNAs amb els fàrmacs, però, pot anar en els dos sentits, ja que s'ha descrit que diversos fàrmacs poden alterar l'expressió i funció dels miRNAs. És el cas del cisplatí i el SAHA, dels quals se n'ha analitzat la seva implicació sobre l'expressió dels miRNAs candidats. Pel que fa al primer, les dues aproximacions que se'n van fer van mostrar resultats poc concloents, ja que semblaria que l'efecte del cisplatí sobre els miRNAs és diferent segons la línia analitzada, i que la modulació d'hCNT1 per part dels miRNAs en aquest cas podria estar compensada per altres elements que poden estar alterats pel cisplatí. Aquests resultats van determinar que la regulació del cisplatí sobre hCNT1 seria molt més complexa i aniria més enllà de la regulació per part dels miRNAs. De totes maneres, els resultats van en la mateixa direcció que alguns estudis realitzats en altres tipus tumorals, com és el cas dels tumors de pulmó de cèl·lules no petites. En aquest cas, es va observar que el tractament amb cisplatí combinat amb gemcitabina disminuïa l'expressió del miR-106a, tal i com també s'ha determinat en els resultats

presentats. A més, aquest estudi diferenciava dues poblacions: una resistent al tractament i una sensible, el qual es corresponia amb els nivells de miR-106a (Tian et al. 2018). Per tant, seria interessant poder valorar els nivells d'expressió d'hCNT1 en aquests pacients per determinar si els efectes de la sensibilitat correlacionarien amb el transportador.

En quant al SAHA, els resultats obtinguts, van confirmar els ja descrits, mostrant una disminució dels miRNAs del clúster miR-17-92, i observant-se un increment d'hCNT1 amb el seu tractament. En aquest punt, considerant tots els resultats es podria pensar en teràpies combinades, considerant la pauta d'administració, les quals es van mostrar més efectives per al cas del cisplatí i la gemcitabina en models preclínic de CCA (article annex). En estudis realitzats al grup, de moment el pre-tractament amb SAHA no ha mostrat millora significativa de l'efecte de la gemcitabina, tot i que s'hauria de seguir determinant la pauta correcta d'aquests fàrmacs tenint en compte els nous resultats obtinguts en aquest sentit de l'efecte del SAHA sobre els miRNAs i com aquest pot afectar a l'expressió d'hCNT1. Tot i que el paper epigenètic fa que no es pugui descartar l'efecte d'altres gens que puguin contrarestar l'efecte d'hCNT1.

En quant a la regulació d'hCNT1, és evident que és altament complexa. Pel que fa a la regulació gènica hi intervindrien diversos factors de transcripció tal i com ja s'ha esmentat, mentre que la regulació epigenètica mitjançant l'acetilació d'histones hi estaria participant. Tal i com s'ha demostrat en aquesta tesi, la regulació per part dels miRNAs seria una peça clau en la modulació de l'expressió de l'mRNA i la proteïna hCNT1. No obstant, no es pot perdre de vista que altres factors a nivell post-traduccionals podrien estar modulant-ne l'expressió o la localització, com és el cas de la glicosilació, fet que sembla determinant per la localització d'hCNT1 a membrana (Pérez-Torras et al. 2019). Finalment també s'ha de tenir en compte els mecanismes de regulació de la seva degradació, la qual s'està estudiant també actualment al laboratori, i on semblaria que tindria un paper important el proteasoma, de la qual s'han descrit les primeres evidències en la tesi doctoral de la Dra. Aida Mata-Ventosa on es mostra que la modulació del proteasoma induïx l'acumulació d'hCNT1.

La regulació d'hCNT1 és altament intricada i hi intervenen molts elements, els quals poden estar relacionats entre ells. Aquesta estricta regulació d'hCNT1 evidencia la importància d'aquest transportador, així com la necessitat d'aprofundir en l'estudi de la seva pèrdua durant el procés carcinogènic.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi han permès determinar els miRNAs com a un dels elements reguladors d'hCNT1, i en part causants de la pèrdua de la seva expressió en tumors. La implicació dels miRNAs en l'expressió d'hCNT1 és un fet doncs a considerar per a futurs estudis enfocats a la translació clínica del tractament oncològic. Tant els miRNAs com hCNT1 presenten un perfil robust en càncer, fet que els podria posicionar com a bons biomarcadors. Per altra banda la modulació d'hCNT1 per part dels miRNAs es podria considerar per a millorar les teràpies de fàrmacs determinant les millors pautes de tractaments ja existents, o millorant l'eficiència dels fàrmacs afavorint-ne la seva bioassequibilitat.



CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. hCNT1 és l'únic membre de la família *SLC28* que presenta una disminució de la seva expressió en càncer colorectal (CRC), adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) i hepatocarcinoma (HCC), mentre que l'expressió d'hCNT2 només es troba disminuïda en CRC.
2. Les correlacions entre hCNT1 i miR-106a analitzades en mostres clíniques aparellades, són negatives i significatives per als tres tipus de tumor, mentre que miR-17 i miR-18a ho són a PDAC i miR-18a a HCC.
3. La modulació dels miRNAs de la família miR-17 mitjançant el seu silenciament o el tractament amb SAHA, el qual s'ha demostrat que en disminueix l'expressió, té un impacte sobre l'expressió del missatger d'hCNT1, incrementant-ne els seus nivells.
4. S'ha validat hCNT1 com a diana directa de miR-106a i miR-17, identificant la seva unió a la mateixa seqüència de l'extrem 3'UTR d'hCNT1.
5. La disminució del miR-106a i del miR-17 incrementen l'expressió d'hCNT1 a nivell d'mRNA i de proteïna en cèl·lules derivades de CRC i PDAC.
6. El creixement en esferoides de la línia derivada de CRC, HT29, mostra un increment en l'expressió d'hCNT1 en comparació al cultiu de la mateixa línia en monocapa, així com una disminució d'hCNT3 i hENT1. La disminució dels miR-106a i miR-17 en aquest tipus de cultiu cel·lular pot incrementar l'expressió i la funció del transportador hCNT1. En canvi, l'increment dels miRNAs esmentats promou la disminució del transportador a nivell d'mRNA i de proteïna.
7. L'alteració dels miRNAs té efectes sobre l'eficiència dels fàrmacs anàlegs de nucleòsids. Concretament la quimiosensibilitat a la gemcitabina es correspon als canvis de l'activitat de transport d'hCNT1 induïts per la modulació del miR-106a i el miR-17.

8. Aquest treball aporta la primera evidència sobre la regulació de l'expressió d'un transportador de nucleòsids mitjançant els miRNAs. S'ha pogut relacionar la sobreexpressió aberrant del miR-106a i el miR-17 amb la pèrdua d'hCNT1 en CRC, PDAC i HCC.



BIBLIOGRAFIA

A

- Agarwal, E., M. G. Brattain & S. Chowdhury (2013) Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer. *Cell Signal*, 25, 1711-9.
- Aird, K. M. & R. Zhang (2015) Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and cancer. *Cancer Lett*, 356, 204-10.
- Ambros, V., R. C. Lee, A. Lavanway, P. T. Williams & D. Jewell (2003) MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, 13, 807-18.
- Andres, S. F., K. N. Williams, J. B. Plesset, J. J. Headd, R. Mizuno, P. Chatterji, A. A. Lento, A. J. Klein-Szanto, R. Mick, K. E. Hamilton & A. K. Rustgi (2019) IMP1 3' UTR shortening enhances metastatic burden in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 40, 569-579.
- Aravin, A. A., G. J. Hannon & J. Brennecke (2007) The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*, 318, 761-4.
- Aymerich, I., M. Pastor-Anglada & F. J. Casado (2004) Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. *J Gen Physiol*, 124, 505-12.

B

- Baldwin, S. A., P. R. Beal, S. Y. Yao, A. E. King, C. E. Cass & J. D. Young (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*, 447, 735-43.
- Barnes, K., H. Dobrzynski, S. Foppolo, P. R. Beal, F. Ismat, E. R. Scullion, L. Sun, J. Tellez, M. W. Ritzel, W. C. Claycomb, C. E. Cass, J. D. Young, R. Billeter-Clark, M. R. Boyett & S. A. Baldwin (2006) Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ Res*, 99, 510-9.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-33.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond & G. J. Hannon (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-6.
- Bertout, J. A., S. A. Patel & M. C. Simon (2008) The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 967-75.
- Bhutia, Y. D., S. W. Hung, B. Patel, D. Lovin & R. Govindarajan (2011) CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 71, 1825-35.
- Boca, S., D. Gulei, A. A. Zimta, A. Onaciu, L. Magdo, A. B. Tigu, C. Ionescu, A. Irimie, R. Buiga & I. Berindan-Neagoe (2019) Nanoscale delivery systems for microRNAs in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*.
- Bock, A. J., H. P. Dong, C. G. Trope, A. C. Staff, B. Risberg & B. Davidson (2012) Nucleoside transporters are widely expressed in ovarian carcinoma effusions. *Cancer Chemother Pharmacol*, 69, 467-75.
- Bofill-De Ros, X., W. K. Kasprzak, Y. Bhandari, L. Fan, Q. Cavanaugh, M. Jiang, L. Dai, A. Yang, T. J. Shao, B. A. Shapiro, Y. X. Wang & S. Gu (2019) Structural Differences between Pri-miRNA Paralogs Promote Alternative Drosha Cleavage and Expand Target Repertoires. *Cell Rep*, 26, 447-459 e4.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski & D. Gorlich (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10, 185-91.
- Bonneau, E., B. Neveu, E. Kostantin, G. J. Tsongalis & V. De Guire (2019) How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *Ejifcc*, 30, 114-127.
- Brennecke, J., A. Stark, R. B. Russell & S. M. Cohen (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3, e85.

C

- Chen, C. F., E. C. Hsu, K. T. Lin, P. H. Tu, H. W. Chang, C. H. Lin, Y. J. Chen, D. L. Gu, C. H. Lin, J. Y. Wu, Y. T. Chen, M. T. Hsu & Y. S. Jou (2010) Overlapping high-resolution copy number alterations in cancer genomes identified putative cancer genes in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 52, 1690-701.
- Chen, Y., D. Y. Gao & L. Huang (2015) In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev*, 81, 128-41.
- Chi, Y. & D. Zhou (2016) MicroRNAs in colorectal carcinoma--from pathogenesis to therapy. *J Exp Clin Cancer Res*, 35, 43.
- Chitrakar, I., D. M. Kim-Holzappel, W. Zhou & J. B. French (2017) Higher order structures in purine and pyrimidine metabolism. *J Struct Biol*, 197, 354-364.

D

- de Melo Maia, B., H. Ling, P. Monroig, M. Ciccone, F. A. Soares, G. A. Calin & R. M. Rocha (2015) Design of a miRNA sponge for the miR-17 miRNA family as a therapeutic strategy against vulvar carcinoma. *Molecular and cellular probes*, 29, 420-426.
- Deng, T., H. Pan, R. Han, D. Huang, H. Li, L. Zhou, X. Wang, M. Bai, X. Li, R. Liu, S. Ge, T. Ning, L. Zhang & Y. Ba (2014) Gemcitabine sensitivity factors, hENT1 and RRM1 as potential prognostic biomarker for advanced biliary tract cancer. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7, 5041-5049.
- Du, T. & P. D. Zamore (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132, 4645-52.

E

- Errasti-Murugarren, E., F. J. Casado & M. Pastor-Anglada (2010) Different N-terminal motifs determine plasma membrane targeting of the human concentrative nucleoside transporter 3 in polarized and nonpolarized cells. *Mol Pharmacol*, 78, 795-803.
- Errasti-Murugarren, E., M. Molina-Arcas, F. J. Casado & M. Pastor-Anglada (2009) A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum. *FASEB J*, 23, 172-82.
- Errasti-Murugarren, E., M. Pastor-Anglada & F. J. Casado (2007) Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs. *J Physiol*, 582, 1249-60.

F

- Farre, X., E. Guillen-Gomez, L. Sanchez, D. Hardisson, Y. Plaza, J. Lloberas, F. J. Casado, J. Palacios & M. Pastor-Anglada (2004) Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *Int J Cancer*, 112, 959-66.
- Fernandez-Veledo, S., R. Jover, F. J. Casado, M. J. Gomez-Lechon & M. Pastor-Anglada (2007) Transcription factors involved in the expression of SLC28 genes in human liver parenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 353, 381-8.
- Fernandez-Veledo, S., R. Valdes, V. Wallenius, F. J. Casado & M. Pastor-Anglada (2004) Up-regulation of the high-affinity pyrimidine-preferring nucleoside transporter concentrative nucleoside transporter 1 by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in liver parenchymal cells. *J Hepatol*, 41, 538-44.
- Filip, D. & M. Mraz (2019) The role of MYC in the transformation and aggressiveness of 'indolent' B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma*, 1-15.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge & D. P. Bartel (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19, 92-105.

G

- Garcia-Manteiga, J., M. Molina-Arcas, F. J. Casado, A. Mazo & M. Pastor-Anglada (2003) Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clin Cancer Res*, 9, 5000-8.
- Gloeckner-Hofmann, K., E. Guillen-Gomez, C. Schmidtgen, R. Porstmann, R. Ziegler, O. Stoss, F. J. Casado, J. Ruschoff & M. Pastor-Anglada (2006) Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer. *Oncology*, 70, 238-44.
- Govindarajan, R., G. P. Leung, M. Zhou, C. M. Tse, J. Wang & J. D. Unadkat (2009) Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G910-22.
- Grane-Boladeras, N., C. M. Spring, W. J. Hanna, M. Pastor-Anglada & I. R. Coe (2016) Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir. *Cell Mol Life Sci*, 73, 4559-4575.
- Grane-Boladeras, N., D. Williams, Z. Tarmakova, K. Stevanovic, L. A. Villani, P. Mehrabi, K. W. M. Siu, M. Pastor-Anglada & I. R. Coe (2019) Oligomerization of equilibrative nucleoside transporters: a novel regulatory and functional mechanism involving PKC and PP1. *Faseb j*, 33, 3841-3850.
- Griffiths-Jones, S. (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*, 32, D109-11.
- (2010) miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 12, Unit 12.9.1-10.
- Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman & A. J. Enright (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 34, D140-4.
- Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, S. van Dongen & A. J. Enright (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36, D154-8.
- Grishok, A., A. E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D. L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun & C. C. Mello (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106, 23-34.

H

- Ha, M. & V. N. Kim (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 509-24.
- Hamilton, S. R., S. Y. Yao, J. C. Ingram, D. A. Hadden, M. W. Ritzel, M. P. Gallagher, P. J. Henderson, C. E. Cass, J. D. Young & S. A. Baldwin (2001) Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem*, 276, 27981-8.
- Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Hayes, J., P. P. Peruzzi & S. Lawler (2014) MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*, 20, 460-9.
- He, S., D. C. Zhang & C. Wei (2015a) MicroRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 39, 426-34.
- He, Y., J. R. Chevillet, G. Liu, T. K. Kim & K. Wang (2015b) The effects of microRNA on the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. *Br J Pharmacol*, 172, 2733-47.
- Hediger, M. A., B. Clemencon, R. E. Burrier & E. A. Bruford (2013) The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med*, 34, 95-107.

- Herreros-Villanueva, M., S. Duran-Sanchon, A. C. Martin, R. Perez-Palacios, E. Vila-Navarro, M. Marcuello, M. Diaz-Centeno, J. Cubiella, M. S. Diez, L. Bujanda, A. Lanas, R. Jover, V. Hernandez, E. Quintero, J. Jose Lozano, M. Garcia-Cougil, I. Martinez-Arranz, A. Castells, M. Gironella & R. Arroyo (2019) Plasma MicroRNA Signature Validation for Early Detection of Colorectal Cancer. *Clin Transl Gastroenterol*, 10, e00003.
- Huber-Ruano, I., I. Pinilla-Macua, G. Torres, F. J. Casado & M. Pastor-Anglada (2010) Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells. *J Cell Physiol*, 225, 620-30.
- Huntzinger, E. & E. Izaurralde (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12, 99-110.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl & P. D. Zamore (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293, 834-8.

I

- Iliou, M. S., V. da Silva-Diz, F. J. Carmona, J. Ramalho-Carvalho, H. Heyn, A. Villanueva, P. Munoz & M. Esteller (2014) Impaired DICER1 function promotes stemness and metastasis in colon cancer. *Oncogene*, 33, 4003-15.
- Ivanov, D. P., T. L. Parker, D. A. Walker, C. Alexander, M. B. Ashford, P. R. Gellert & M. C. Garnett (2014) Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. *PLoS One*, 9, e103817.

J

- Jansson, M. D. & A. H. Lund (2012) MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*, 6, 590-610.
- Jiménez-Alesanco, A., M. Marcuello, M. Pastor-Jiménez, L. López-Puerto, L. Bonjoch, M. Gironella, M. Carrascal, J. Abian, E. de-Madaria & D. Closa (2019) Acute pancreatitis promotes the generation of two different exosome populations. *Sci Rep*, 9, 19887.
- Johnson, Z. L., C. G. Cheong & S. Y. Lee (2012) Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature*, 483, 489-93.
- Jonas, S. & E. Izaurralde (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*, 16, 421-33.
- Jordheim, L. P., D. Durantel, F. Zoulim & C. Dumontet (2013) Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 447-64.

K

- Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon & R. H. Plasterk (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 15, 2654-9.
- Khuu, C., T. P. Utheim & A. Sehic (2016) The Three Paralogous MicroRNA Clusters in Development and Disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. *Scientifica (Cairo)*, 2016, 1379643.
- Kim, J., H. Kim, J.-C. Lee, J. W. Kim, W. H. Paik, S. H. Lee, J.-H. Hwang, J. K. Ryu & Y.-T. Kim (2018) Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression as a predictive biomarker for gemcitabine chemotherapy in biliary tract cancer. *PLoS one*, 13, e0209104-e0209104.
- King, A. E., M. A. Ackley, C. E. Cass, J. D. Young & S. A. Baldwin (2006) Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 416-25.

- Klein, K., G. A. Kullak-Ublick, M. Wagner, M. Trauner & J. J. Eloranta (2009) Hepatocyte nuclear factor-4alpha and bile acids regulate human concentrative nucleoside transporter-1 gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G936-47.
- Kobayashi, H. & Y. Tomari (2016) RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1859, 71-81.
- Koepsell, H. (2013) The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med*, 34, 413-35.
- Kohnken, R., K. M. Kodigepalli & L. Wu (2015) Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications. *Mol Cancer*, 14, 176.
- Koturbash, I., W. H. Tolleson, L. Guo, D. Yu, S. Chen, H. Hong, W. Mattes & B. Ning (2015) microRNAs as pharmacogenomic biomarkers for drug efficacy and drug safety assessment. *Biomark Med*, 9, 1153-76.
- Kozomara, A., M. Birgaoanu & S. Griffiths-Jones (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*, 47, D155-d162.
- Kozomara, A. & S. Griffiths-Jones (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 39, D152-7.
- (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42, D68-73.
- Krek, A., D. Grun, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel & N. Rajewsky (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 37, 495-500.
- Kwon, S. C., S. C. Baek, Y. G. Choi, J. Yang, Y. S. Lee, J. S. Woo & V. N. Kim (2019) Molecular Basis for the Single-Nucleotide Precision of Primary microRNA Processing. *Mol Cell*, 73, 505-518 e5.
- Kwon, S. C., T. A. Nguyen, Y. G. Choi, M. H. Jo, S. Hohng, V. N. Kim & J. S. Woo (2016) Structure of Human DROSHA. *Cell*, 164, 81-90.

L

- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel & T. Tuschl (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853-8.
- Lane, A. N. & T. W. Fan (2015) Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res*, 43, 2466-85.
- Lane, J., T. A. Martin, C. McGuigan, M. D. Mason & W. G. Jiang (2010) The differential expression of hCNT1 and hENT1 in breast cancer and the possible impact on breast cancer therapy. *J Exp Ther Oncol*, 8, 203-10.
- Larrayoz, I. M., F. J. Casado, M. Pastor-Anglada & M. P. Lostao (2004) Electrophysiological characterization of the human Na(+)/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J Biol Chem*, 279, 8999-9007.
- Lau, N. C., L. P. Lim, E. G. Weinstein & D. P. Bartel (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 858-62.
- Lee, R. C. & V. Ambros (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 862-4.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum & V. Ambros (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- Lee, S. W. L., C. Paoletti, M. Campisi, T. Osaki, G. Adriani, R. D. Kamm, C. Mattu & V. Chiono (2019) MicroRNA delivery through nanoparticles. *J Control Release*.
- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim & V. N. Kim (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo j*, 21, 4663-70.
- Lei, E. P. & P. A. Silver (2002) Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA. *Genes Dev*, 16, 2761-6.

- Lewis, B. P., C. B. Burge & D. P. Bartel (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
- Li, D., X. Jiang, X. Zhang, G. Cao, D. Wang & Z. Chen (2019) Long noncoding RNA FGD5-AS1 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion through upregulating CDCA7 via sponging miR-302e. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 55, 577-585.
- Li, L., B. Shi, J. Chen, C. Li, S. Wang, Z. Wang & G. Zhu (2017) An E2F1/MiR-17-92 Negative Feedback Loop mediates proliferation of Mouse Palatal Mesenchymal Cells. *Sci Rep*, 7, 5148.
- Li, P., Q. Xu, D. Zhang, X. Li, L. Han, J. Lei, W. Duan, Q. Ma, Z. Wu & Z. Wang (2014) Upregulated miR-106a plays an oncogenic role in pancreatic cancer. *FEBS Lett*, 588, 705-12.
- Li, S., F. Peng, Y. Ning, P. Jiang, J. Peng, X. Ding, J. Zhang, T. Jiang & S. Xiang (2020) SNHG16 as the miRNA let-7b-5p sponge facilitates the G2/M and epithelial-mesenchymal transition by regulating CDC25B and HMGA2 expression in hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem*, 121, 2543-2558.
- Li, X., G. Zhang, F. Luo, J. Ruan, D. Huang, D. Feng, D. Xiao, Z. Zeng, X. Chen & W. Wu (2012) Identification of aberrantly expressed miRNAs in rectal cancer. *Oncol Rep*, 28, 77-84.
- Liu, J., C. Zhang, Y. Zhao & Z. Feng (2017) MicroRNA Control of p53. *J Cell Biochem*, 118, 7-14.
- Lowes, K. N., B. A. Brennan, G. C. Yeoh & J. K. Olynyk (1999) Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol*, 154, 537-41.

M

- Macfarlane, L. A. & P. R. Murphy (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 11, 537-61.
- Mackey, J. R., S. Y. Yao, K. M. Smith, E. Karpinski, S. A. Baldwin, C. E. Cass & J. D. Young (1999) Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst*, 91, 1876-81.
- Maiuolo, J., F. Oppedisano, S. Gratteri, C. Muscoli & V. Mollace (2016) Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol*, 213, 8-14.
- Mangravite, L. M., I. Badagnani & K. M. Giacomini (2003) Nucleoside transporters in the disposition and targeting of nucleoside analogs in the kidney. *Eur J Pharmacol*, 479, 269-81.
- Marcuello, M., S. Duran-Sanchon, L. Moreno, J. J. Lozano, L. Bujanda, A. Castells & M. Gironella (2019a) Analysis of A 6-Mirna Signature in Serum from Colorectal Cancer Screening Participants as Non-Invasive Biomarkers for Advanced Adenoma and Colorectal Cancer Detection. *Cancers (Basel)*, 11.
- Marcuello, M., V. Vymetalkova, R. P. L. Neves, S. Duran-Sanchon, H. M. Vedeld, E. Tham, G. van Dalum, G. Flugen, V. Garcia-Barberan, R. J. Fijneman, A. Castells, P. Vodicka, G. E. Lind, N. H. Stoecklein, E. Heitzer & M. Gironella (2019b) Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer. *Mol Aspects Med*, 69, 107-122.
- Martinez-Becerra, P., J. Vaquero, M. R. Romero, E. Lozano, C. Anadon, R. I. Macias, M. A. Serrano, N. Grane-Boladeras, L. Munoz-Bellvis, L. Alvarez, B. Sangro, M. Pastor-Anglada & J. J. Marin (2012) No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm*, 9, 1693-704.
- Medina-Pulido, L., M. Molina-Arcas, C. Justicia, E. Soriano, F. Burgaya, A. M. Planas & M. Pastor-Anglada (2013) Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells. *Biochem J*, 454, 437-45.
- Mezencev, R. & R. M. Wartell (2018) Cisplatin binds to pre-miR-200b and impairs its processing to mature microRNA. *Neoplasia*, 65, 222-227.

- Minuesa, G., I. Huber-Ruano, M. Pastor-Anglada, H. Koepsell, B. Clotet & J. Martinez-Picado (2011) Drug uptake transporters in antiretroviral therapy. *Pharmacol Ther*, 132, 268-79.
- Molina-Arcas, M., F. J. Casado & M. Pastor-Anglada (2009) Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol*, 7, 426-34.
- Mori, R., T. Ishikawa, Y. Ichikawa, K. Taniguchi, R. Matsuyama, M. Ueda, Y. Fujii, I. Endo, S. Togo, P. V. Danenberg & H. Shimada (2007) Human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with the chemosensitivity of gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma and biliary tract carcinoma cells. *Oncol Rep*, 17, 1201-5.
- Mulinta, R., S. Y. M. Yao, A. M. L. Ng, C. E. Cass & J. D. Young (2017) Substituted cysteine accessibility method (SCAM) analysis of the transport domain of human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3) and other family members reveals features of structural and functional importance. *J Biol Chem*, 292, 9505-9522.
- Muller, M., T. G. Bird & J. C. Nault (2020) The landscape of gene mutations in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*.

N

- Nguyen, T. A., M. H. Jo, Y. G. Choi, J. Park, S. C. Kwon, S. Hohng, V. N. Kim & J. S. Woo (2015) Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell*, 161, 1374-87.

P

- Pai, C. C. & S. E. Kearsey (2017) A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability. *Genes (Basel)*, 8.
- Parker, W. B. (2009) Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem Rev*, 109, 2880-93.
- Parkinson, F. E., V. L. Damaraju, K. Graham, S. Y. Yao, S. A. Baldwin, C. E. Cass & J. D. Young (2011) Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Curr Top Med Chem*, 11, 948-72.
- Parsyan, A., Y. Svitkin, D. Shahbazian, C. Gkogkas, P. Lasko, W. C. Merrick & N. Sonenberg (2011) mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 235-45.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson & G. Ruvkun (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-9.
- Pastor-Anglada, M., P. Cano-Soldado, E. Errasti-Murugarren & F. J. Casado (2008) SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica*, 38, 972-94.
- Pastor-Anglada, M., F. J. Casado, R. Valdés, J. Mata, J. García-Manteiga & M. Molina (2009) Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Molecular Membrane Biology*, 18, 81-85.
- Pastor-Anglada, M. & S. Perez-Torras (2015) Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol*, 6, 13.
- Pastor-Anglada, M. & S. Pérez-Torras (2015) Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol*, 6, 13.
- Pastor-Anglada, M., N. Urtasun & S. Perez-Torras (2018) Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation. *Compr Physiol*, 8, 1003-1017.
- Pedley, A. M. & S. J. Benkovic (2017) A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends Biochem Sci*, 42, 141-154.
- Peng, Y. & C. M. Croce (2016) The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 1, 15004.
- Perez-Torras, S., J. Garcia-Manteiga, E. Mercade, F. J. Casado, N. Carbo, M. Pastor-Anglada & A. Mazo (2008) Adenoviral-mediated overexpression of human equilibrative nucleoside

- transporter 1 (hENT1) enhances gemcitabine response in human pancreatic cancer. *Biochem Pharmacol*, 76, 322-9.
- Perez-Torras, S., A. Vidal-Pla, R. Miquel, V. Almendro, L. Fernandez-Cruz, S. Navarro, J. Maurel, N. Carbo, P. Gascon & A. Mazo (2011) Characterization of human pancreatic orthotopic tumor xenografts suitable for drug screening. *Cell Oncol (Dordr)*, 34, 511-21.
- Pinilla-Macua, I., F. J. Casado & M. Pastor-Anglada (2012) Structural determinants for rCNT2 sorting to the plasma membrane of polarized and non-polarized cells. *Biochem J*, 442, 517-25.
- Pinilla-Macua, I., P. Fernandez-Calotti, S. Perez-Del-Pulgar & M. Pastor-Anglada (2014) Ribavirin uptake into human hepatocyte HHL5 cells is enhanced by interferon-alpha via up-regulation of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT2). *Mol Pharm*, 11, 3223-30.
- Pérez-Torras, S., A. Mata-Ventosa, B. Drögemöller, M. Tarailo-Graovac, J. Meijer, R. Meinsma, A. G. van Cruchten, W. Kulik, A. Viel-Oliva, A. Bidon-Chanal, C. J. Ross, W. W. Wassermann, C. D. M. van Karnebeek, M. Pastor-Anglada & A. B. P. van Kuilenburg (2019) Deficiency of perforin and hCNT1, a novel inborn error of pyrimidine metabolism, associated with a rapidly developing lethal phenotype due to multi-organ failure. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*.
- Pérez-Torras, S., A. Vidal-Pla, P. Cano-Soldado, I. Huber-Ruano, A. Mazo & M. Pastor-Anglada (2013) Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner. *Cell Death Dis*, 4, e648.

Q

- Qin, Y., Z. Huo, X. Song, X. Chen, X. Tian & X. Wang (2018) mir-106a regulates cell proliferation and apoptosis of colon cancer cells through targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett*, 15, 3197-3201.

R

- Raji, G. R., T. V. Sruthi, L. Edatt, K. Haritha, S. Sharath Shankar & V. B. Sameer Kumar (2017) Horizontal transfer of miR-106a/b from cisplatin resistant hepatocarcinoma cells can alter the sensitivity of cervical cancer cells to cisplatin. *Cell Signal*, 38, 146-158.
- Rankovic, B., N. Zidar, M. Zlajpah & E. Bostjancic (2019) Epithelial-Mesenchymal Transition-Related MicroRNAs and Their Target Genes in Colorectal Cancerogenesis. *J Clin Med*, 8.
- Reinhart, B. J. & D. P. Bartel (2002) Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, 297, 1831.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz & G. Ruvkun (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-6.
- Rodrigues, A. C., X. Li, L. Radecki, Y. Z. Pan, J. C. Winter, M. Huang & A. M. Yu (2011) MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines. *Biopharm Drug Dispos*, 32, 355-67.

S

- Schrenk, D., P. R. Baus, N. Ermel, C. Klein, B. Vorderstemann & H. M. Kauffmann (2001) Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol Lett*, 120, 51-7.
- Shu, X. L., C. B. Fan, B. Long, X. Zhou & Y. Wang (2016) The anti-cancer effects of cisplatin on hepatic cancer are associated with modulation of miRNA-21 and miRNA-122 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20, 4459-4465.

- Smith, K. M., M. D. Slugoski, S. K. Loewen, A. M. Ng, S. Y. Yao, X. Z. Chen, E. Karpinski, C. E. Cass, S. A. Baldwin & J. D. Young (2005) The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *J Biol Chem*, 280, 25436-49.
- Solaini, G., G. Sgarbi & A. Baracca (2011) Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 534-42.
- Soltani-Sedeh, H., S. Irani, R. Mirfakhraie & M. Soleimani (2019) Potential using of microRNA-34A in combination with paclitaxel in colorectal cancer cells. *J Cancer Res Ther*, 15, 32-37.
- Sun, T., X. Kong, Y. Du & Z. Li (2014) Aberrant MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Researches and Clinical Implications. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 386561.

T

- Tan, W., Y. Li, S.-G. Lim & T. M. C. Tan (2014) miR-106b-25/miR-17-92 clusters: polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 20, 5962-5972.
- Tian, Y., C. Sun, L. Zhang & Y. Pan (2018) Clinical significance of miRNA - 106a in non-small cell lung cancer patients who received cisplatin combined with gemcitabine chemotherapy. *Cancer Biol Med*, 15, 157-164.

U

- Urtasun, N., C. Boces-Pascual, L. Boix, J. Bruix, M. Pastor-Anglada & S. Pérez-Torras (2017) Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 8, 90185-90196.

V

- Valdes, R., F. J. Casado & M. Pastor-Anglada (2002) Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 575-9.
- Valdes, R., S. Fernandez-Veledo, I. Aymerich, F. J. Casado & M. Pastor-Anglada (2006) TGF-beta transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2527-37.
- Valihrach, L., P. Androvic & M. Kubista (2019) Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy. *Mol Aspects Med*.
- van den Heuvel, S. & N. J. Dyson (2008) Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 713-24.
- Vila-Navarro, E., S. Duran-Sanchon, M. Vila-Casadesús, L. Moreira, À. Ginès, M. Cuatrecasas, J. J. Lozano, L. Bujanda, A. Castells & M. Gironella (2019) Novel Circulating miRNA Signatures for Early Detection of Pancreatic Neoplasia. *Clin Transl Gastroenterol*, 10, e00029.
- Vila-Navarro, E., M. Vila-Casadesus, L. Moreira, S. Duran-Sanchon, R. Sinha, A. Gines, G. Fernandez-Esparrach, R. Miquel, M. Cuatrecasas, A. Castells, J. J. Lozano & M. Gironella (2017) MicroRNAs for Detection of Pancreatic Neoplasia: Biomarker Discovery by Next-generation Sequencing and Validation in 2 Independent Cohorts. *Ann Surg*, 265, 1226-1234.
- Villanueva, A., C. Garcia, A. B. Paules, M. Vicente, M. Megias, G. Reyes, P. de Villalonga, N. Agell, F. Lluís, O. Bachs & G. Capella (1998) Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 17, 1969-78.
- Vincenzi, B., S. Stacchiotti, P. Collini, F. Pantano, C. Rabitti, G. Perrone, M. Iuliani, A. Baldi, G. Badalamenti, R. Sanfilippo, D. Santini, A. O. Muda, A. Gronchi, P. Casali, A. P. Dei Tos & G. Tonini (2017) Human equilibrative nucleoside transporter 1 gene expression is

associated with gemcitabine efficacy in advanced leiomyosarcoma and angiosarcoma. *British journal of cancer*, 117, 340-346.

W

- Wasternack, C. (1980) Degradation of pyrimidines and pyrimidine analogs--pathways and mutual influences. *Pharmacol Ther*, 8, 629-51.
- Wei, L., X. Wang, L. Lv, Y. Zheng, N. Zhang & M. Yang (2019) The emerging role of noncoding RNAs in colorectal cancer chemoresistance. *Cell Oncol (Dordr)*, 42, 757-768.
- Wightman, B., T. R. Burglin, J. Gatto, P. Arasu & G. Ruvkun (1991) Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev*, 5, 1813-24.
- Wightman, B., I. Ha & G. Ruvkun (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-62.
- Wright, N. J. & S. Y. Lee (2019) Structures of human ENT1 in complex with adenosine reuptake inhibitors. *Nat Struct Mol Biol*, 26, 599-606.
- Wu, L. & J. G. Belasco (2008) Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 29, 1-7.

X

- Xu, F., J. J. Yan, Y. Gan, Y. Chang, H. L. Wang, X. X. He & Q. Zhao (2019) miR-885-5p Negatively Regulates Warburg Effect by Silencing Hexokinase 2 in Liver Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, 18, 308-319.

Y

- Yang, G., R. Zhang, X. Chen, Y. Mu, J. Ai, C. Shi, Y. Liu, C. Shi, L. Sun, N. G. Rainov, H. Li, B. Yang & S. Zhao (2011) MiR-106a inhibits glioma cell growth by targeting E2F1 independent of p53 status. *J Mol Med (Berl)*, 89, 1037-50.
- Yang, H., P. Lan, Z. Hou, Y. Guan, J. Zhang, W. Xu, Z. Tian & C. Zhang (2015) Histone deacetylase inhibitor SAHA epigenetically regulates miR-17-92 cluster and MCM7 to upregulate MICA expression in hepatoma. *Br J Cancer*, 112, 112-21.
- Yao, S. Y., A. M. Ng, C. E. Cass, S. A. Baldwin & J. D. Young (2011) Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J Biol Chem*, 286, 32552-62.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara & B. R. Cullen (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17, 3011-6.
- Young, J. D., S. Y. Yao, J. M. Baldwin, C. E. Cass & S. A. Baldwin (2013) The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med*, 34, 529-47.
- Young, J. D., S. Y. Yao, L. Sun, C. E. Cass & S. A. Baldwin (2008) Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica*, 38, 995-1021.
- Yu, X., Y. Hu, Y. Wu, C. Fang, J. Lai, S. Chen, Y. Li, C. Zeng & Y. Zeng (2019) The c-Myc-regulated miR-17-92 cluster mediates ATRA-induced APL cell differentiation. *Asia Pac J Clin Oncol*.



Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma

Nerea Urtasun^{1,2}, Clara Boces-Pascual¹, Loreto Boix^{2,3}, Jordi Bruix^{2,3}, Marçal Pastor-Anglada^{1,2} and Sandra Pérez-Torras^{1,2}

¹Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics (MPET), Section Biochemistry and Molecular Pharmacology, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Oncology Program, CIBER ehd, National Biomedical Research Institute on Liver and Gastrointestinal Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

³Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group, Liver Unit, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica (FCRB), Barcelona, Spain

Correspondence to: Sandra Pérez-Torras, **email:** s.perez-torras@ub.edu

Keywords: transporter, cholangiocarcinoma, gemcitabine, cisplatin, chemoresistance

Received: February 07, 2017

Accepted: August 27, 2017

Published: October 06, 2017

Copyright: Urtasun et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) is a heterogeneous group of malignancies with limited therapeutic options. Curative therapy is limited to surgery whereas chemotherapy treatments are the election option for unresectable or metastatic cholangiocarcinoma. Cisplatin plus gemcitabine is the reference chemotherapy regimen, albeit the contribution to the median overall survival barely reaches one year. Drug transporters are undoubtedly a limiting step for drug bioavailability and have been clearly related to chemoresistance. Several members of the SoLute Carrier (SLC) superfamily involved in the uptake of anticancer drugs used to treat cholangiocarcinoma are downregulated in these tumors. This study shows the increase in the expression of specific drug transporters exerted by cisplatin treatment thereby enhancing their transport activity. Combination treatments of cisplatin with selected drugs as gemcitabine and sorafenib take in by these transporters at the desired combination schedule induced synergy. These data support the concept that proper administration pattern could favor treatment outcome.

INTRODUCTION

Cholangiocarcinoma (CCA) is a heterogeneous group of malignancies, which have in common features of biliary tract differentiation. Efforts to characterize and classify the different subtypes of this cancer at the histological and molecular level are being carried out to eventually implement a personalized treatment [1–3]. CCA is a marked chemoresistant malignancy, for which surgery represents the only curative treatment, and systemic chemotherapy remains the mainstay palliative treatment modality for unresectable or metastatic disease. Gemcitabine combined with cisplatin is the most effective

treatment option for locally advanced or metastatic CCA. Combination of these drugs improves progression-free and overall survival, although reaching almost a mere one year of median overall survival [4]. The cisplatin combined with gemcitabine regimen also represents a cost-effective alternative treatment compared with gemcitabine monotherapy [5].

Drug bioavailability and responsiveness may indeed depend upon the so-called transportome profile of the tumor and its associated pharmacogenetics, thereby providing novel networks and genes within them likely to contribute to chemoresistance [6–8]. Mechanisms of chemoresistance to cholangiocarcinoma current treatments

have been identified and classified based upon the steps implicated in drug transport, metabolism, and action [9, 10]. Indeed, drug transporters encompass the first limiting step, involving several members of the SLC superfamily in mediating drug influx through the cell membrane. Uptake of nucleoside analogs such as gemcitabine and 5-fluorouracil mainly relies on Nucleoside Transporters (NTs), both the Equilibrative Nucleoside Transporters (ENTs) and the Concentrative Nucleoside Transporters (CNTs), to enter the cell [7]. Cationic drugs like platinum derivatives and tyrosine kinase inhibitors as cisplatin and sorafenib, respectively, are taken up in part through Organic Cation Transporters (OCTs) [11, 12]. Moreover, sorafenib uptake is also mediated by Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs) [13]. Unfortunately, most of these drug transporters are downregulated in cholangiocarcinoma, thereby limiting the response to these treatments [14–17].

Therefore, in this study we addressed the effect of cisplatin treatment to modulate drug transporters to attempt a chemosensitization strategy based on the temporal drug administration pattern.

RESULTS

Cholangiocarcinoma drug transporters

NTs and OCT1 expression from tumor samples (Supplementary Table 1) and cholangiocarcinoma derived cell lines were analyzed in order to determine the transporter profile of the currently used drugs to treat this malignancy. Total mRNA copies from 4 gallbladder samples and a commercially available sample of healthy liver tissue (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc.) were also analyzed as a reference. Tumor samples showed a general increase in hENT1 and hENT2 expression likewise cell lines, whereas hCNTs and hOCT1 expression exhibited a more variable pattern (Figure 1A). These results prompted us to increase the number of samples and look for appropriated controls. The analysis of public data (GEO:GSE26566,[1]) from 59 paired samples of CCA tumors and its surrounding liver showed a significant decrease of hCNT1 and hOCT1 expression in tumors, whereas hCNT3 was increased (Supplementary Figure 1). However, when drug transporters expression was compared between cholangiocarcinoma and 6 normal intrahepatic bile duct samples obtained from the same cohort, a trend to diminish for almost all the high affinity nucleoside transporters and hOCT1 was observed with no general tendency to increase even considering the few normal intrahepatic bile duct samples.

Three different cholangiocarcinoma cell lines were chosen to determine their uptake features, one derived from an intrahepatic malignancy (BCLC12) and the other two from extrahepatic tumors (TFK-1 and EGI-1) (Figure 1B). All of them relied on hENTs to grant nucleosides

uptake and mainly in hENT1, although BCLC12 also showed hENT2 activity. However, none of them displayed nucleoside uptake depending on hCNTs, despite the mRNA expression of all family members. The three cell lines exhibited hOCTs uptake at different levels and specifically hOCT1, being TFK-1 the cell line with the highest transport activity.

Cisplatin treatment enhances drug transporters activity

Previous works showed alterations in the mRNA levels of some members of the SLC gene superfamily in liver cancer cell lines after 72h of cisplatin treatment at IC50 dose [18]. These prompted us to analyze the expression of several drug transporters after cisplatin treatment in cholangiocarcinoma. Cell lines were treated with their corresponding IC20 or IC50 dose of cisplatin (Supplementary Figure 2) and hCNTs, hOCT1, hENT1 and hENT2 expression was determined 24, 48 and 72h later (Figure 2). Increases in the drug transporters hCNT1, hCNT3, hOCT1 and hENT1 were observed in the three cell lines especially from 48h treatment, although with variable extent depending on cell line. Analysis of nucleoside transport under the same conditions, showed a trend to increase in the hCNT-related sodium-dependent nucleoside uptake in EGI-1 and BCLC12 cell lines at 48h and 72h after treatment (Figure 3). Moreover, both cell lines displayed a significant increase in hOCTs-dependent uptake and in particular showed a significant increment in hOCT1 uptake at 72h after the IC50 cisplatin treatment (Figure 3). However, despite the significant increase observed in hCNT3 and hOCT1 at 48h, no activity changes were observed in the TFK-1 cell line for any of the analyzed transporters.

Proper temporal administration pattern improves drug cytotoxic effect

Currently used drugs to treat cholangiocarcinoma comprise nucleoside analogs such as gemcitabine and 5-fluorouracil in combination with cisplatin. The raise in NTs expression and activity after cisplatin treatment suggests that the drug administration temporal pattern has to be taken into account in order to increase drug-induced cytotoxicity. Since hCNT1, hCNT3 and hENT1 are able to efficiently transport gemcitabine, combination treatment was addressed at the time points where the increment was detected, compared to co-administration (Supplementary Figure 3). Dose-response curves to gemcitabine were performed 48 and 72 hours after cisplatin treatment with the corresponding IC20 dose. Interestingly, the cell lines EGI-1 and BCLC12, which showed an increase in hCNTs-dependent transport activity, displayed a synergy in the combination treatment with the highest effect observed at 72h (Figure 4, Supplementary Figure 4 24h). On the

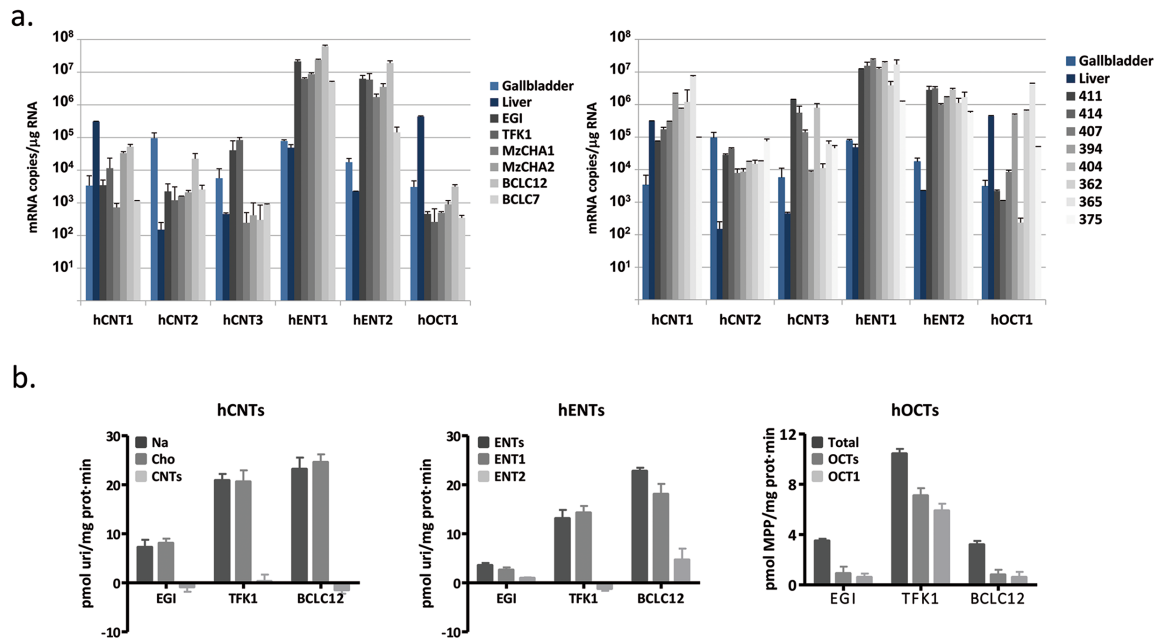


Figure 1: Cholangiocarcinoma drug transporters characterization. (A) mRNA expression of hNTs and hOCT1 in 6 cholangiocarcinoma derived cell lines (left) and 8 tumor samples (right). Four gallbladder (light blue) and one liver (dark blue) tissues were assessed as a reference. (B) Transport activity was determined in EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines. hCNTs (left) sodium-dependent uptake of [³H]uridine (light gray) was determined as uptake in NaCl medium (black) minus uptake in choline chloride (gray). hENTs (middle) uptake of [³H]uridine was determined as total uptake in choline chloride (black) minus uptake inhibited by 1μM NBTI for the hENT1 (gray) or 10μM dipyradamole for the hENT2 (light gray). hOCTs (right) uptake of [³H]MPP was determined as total uptake (black) minus uptake inhibited by 100μM d22 (gray) or 100μM quinidine (light gray). Results are mean ± S.E.M. (n=3).

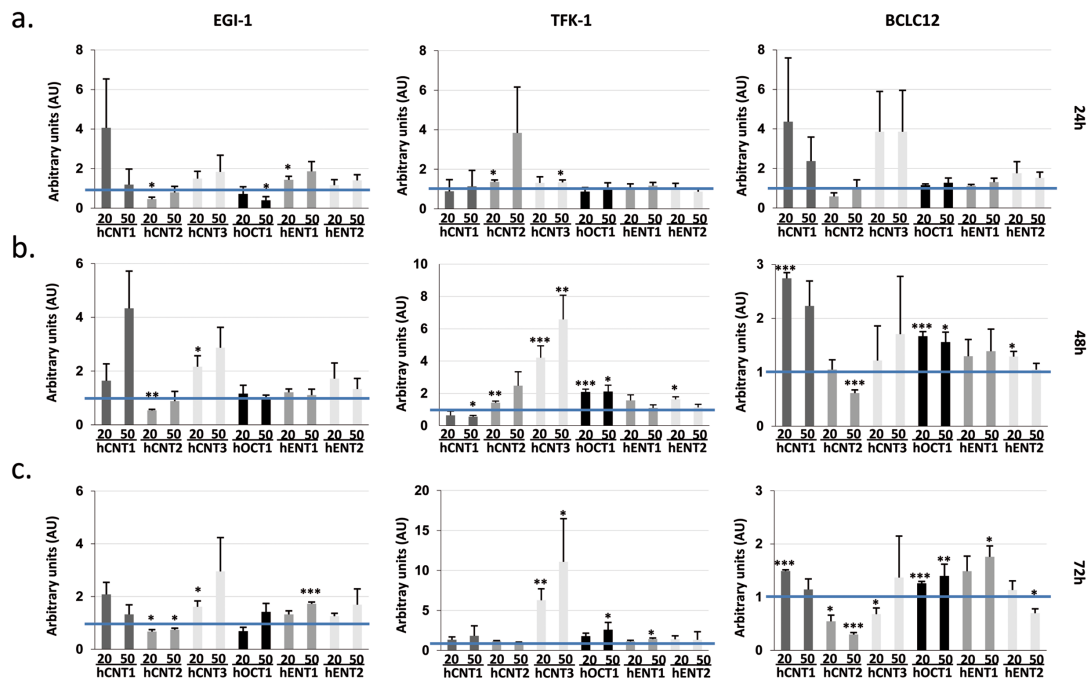


Figure 2: Cisplatin enhances drug transporter expression. EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines were treated with their corresponding IC20 (20) or IC50 (50) cisplatin dose for 24h (A), 48h (B) and 72h (C). mRNA expression levels of hCNTs, hOCT1 and hENTs were determined by RT-PCR. Results are mean ± S.E.M. (n=3-4). Statistical significance was determined with Student's t-test; p<0.05*, p<0.01**, p<0.005***.

contrary, the TFK-1 cell line exhibited no synergy, which is consistent with the lack of increase in transport activity at these conditions. Furthermore, combination treatment with 5-fluorouracil, which is internalized by the NTs hENT1 and hENT2, and hOAT2, displayed similar results as obtained with gemcitabine combination in the three cell lines, showing only synergy in EGI-1 and BCLC12 (Supplementary Figure 5).

Following the same evidence, the increase observed in hOCT1-dependent transport prompted us to explore additional combination treatments. Thus, the hOCT1-transported drug sorafenib was combined following the pattern previously established. Cell lines were treated with cisplatin IC20 dose and after 48 and 72 hours, cells were incubated with increasing sorafenib doses. EGI-1 and BCLC12 exhibited higher sensitivity to sorafenib treatment after cisplatin administration (Figure 5) compared to co-administration pattern (Supplementary Figure 6). However, TFK-1 cells did not show any

improvement but even a trend to antagonism (Figure 5 and Supplementary Figure 6). Again, the synergy observed in EGI-1 and BCLC12 cell lines correlated with the increment displayed in hOCT1-dependent uptake (Figure 3). Furthermore, similar results were observed combining cisplatin with lower doses of paclitaxel, which is also transported by OCT1 (Supplementary Figure 7).

The observations described above induced us to evaluate the expression of drug transporters after cisplatin treatment *in vivo*. To this end, we treated subcutaneous tumors established in nude mice by injection of EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines. When tumors reached a volume of 100mm³, mice were administered with 2 or 4 mg/kg of cisplatin and tumors were collected 48 and 72h later. BCLC12 derived tumors were only obtained at 48h due to the low engraftment ability of this cell line, reaching barely a 45% after 5 months. The analysis of the drug transporters expression pattern showed a similar profile to the *in vitro* assays. EGI-1 and BCLC12 tumors exhibited

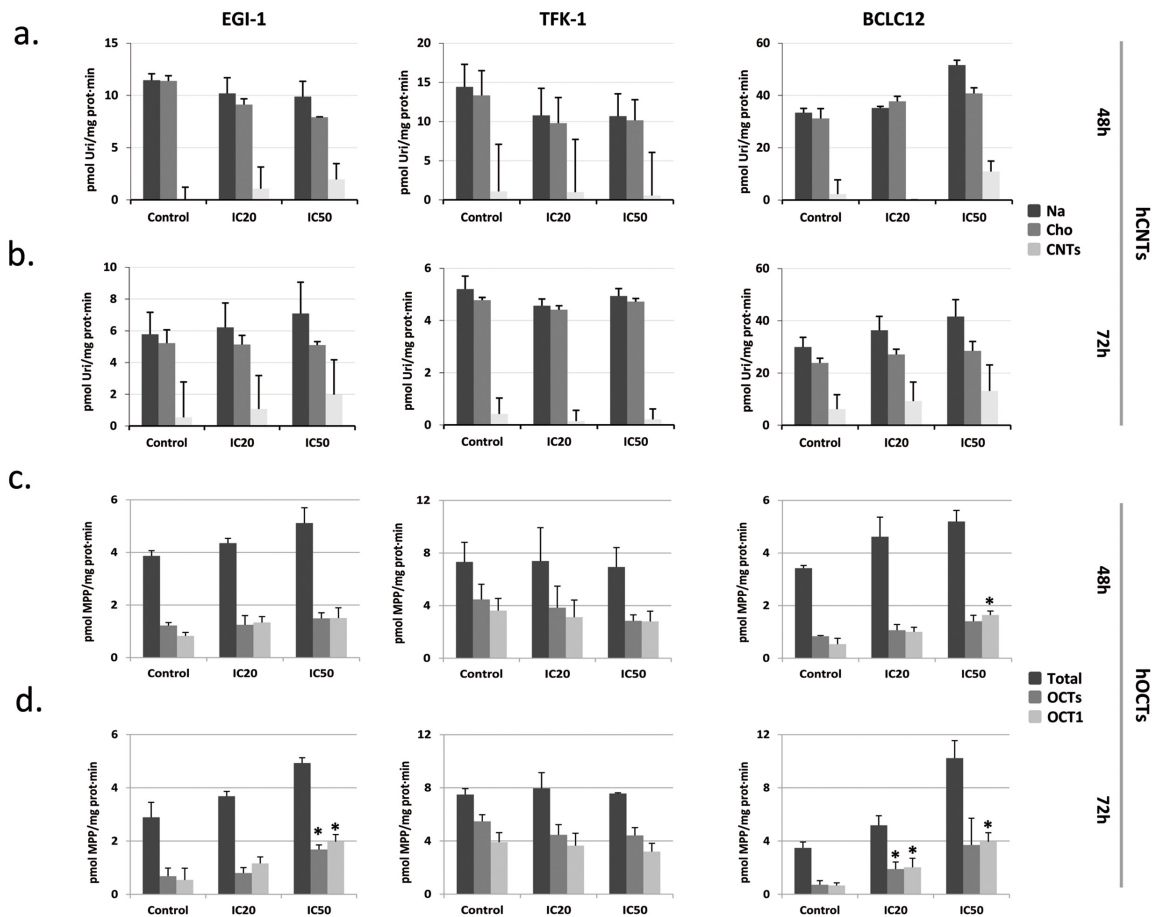


Figure 3: Cisplatin modulates hCNTs and hOCTs transport activity. EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines were treated with their corresponding IC20 (20) or IC50 (50) cisplatin dose for 48h (A, C) and 72h (B, D). hCNTs sodium-dependent uptake of [³H]uridine (light gray) was determined as uptake in NaCl medium (black) minus uptake in choline chloride (gray) (A, B). hOCTs uptake of [³H]MPP was determined as total uptake (black) minus uptake inhibited by d22 (gray) or quinidine (light gray) for the hOCT1 (C, D). Results are expressed as mean ± S.E.M. (n=2-3). Statistical significance was determined with Student's t-test; p<0.05*, p<0.01**, p<0.005***.

an increase in almost all the drug transporters, being the best condition 48h after 4 mg/kg of CDDP administration, whereas no significant changes were detected in TFK-1 tumors at the assayed doses (Figure 6A).

To evaluate a delayed combination treatment, we selected EGI-1 tumors treated with 4 mg/kg of CDDP to combine with either gemcitabine or sorafenib 48h later. When tumors reached a volume of 70mm³ mice were administered with 4 mg/kg of cisplatin and 48h later received 100 mg/kg of gemcitabine or 50 mg/kg of sorafenib. Mice were subjected to two cycles of treatment with a 48h lag and tumor growth was followed up for two more weeks. Under these conditions, combination treatment provoked a 40% decrease of tumor growth, whereas single drugs only induced slight decreases of 10% and 16%, for CDDP and gemcitabine, respectively (Figure 6B). Surprisingly, two separated doses of sorafenib treatment alone increased tumor growth at this treatment temporal pattern (Supplementary Figure 8).

DISCUSSION

Cholangiocarcinoma is an aggressive disease with poor clinical outcome, mainly due to the late diagnosis that limits the therapeutic options. Cisplatin and gemcitabine combination is the current therapy used in unresectable or metastatic cholangiocarcinoma. However, the effect on patients is limited and surgery remains the only potentially curative therapy, although with high rate of disease recurrence [19].

Nowadays, there is no discussion about the relevance of drug transporters in clinical outcome [20]. The analysis of drug transporters expression even the characterization of its polymorphisms is becoming a standard to predict drug efficacy and safety. Clinical evidence has demonstrated its relevance in pharmacokinetics and pharmacodynamics likewise in combination schedules where drug transporters have been involved in clinically relevant drug-drug interactions. Moreover, several studies

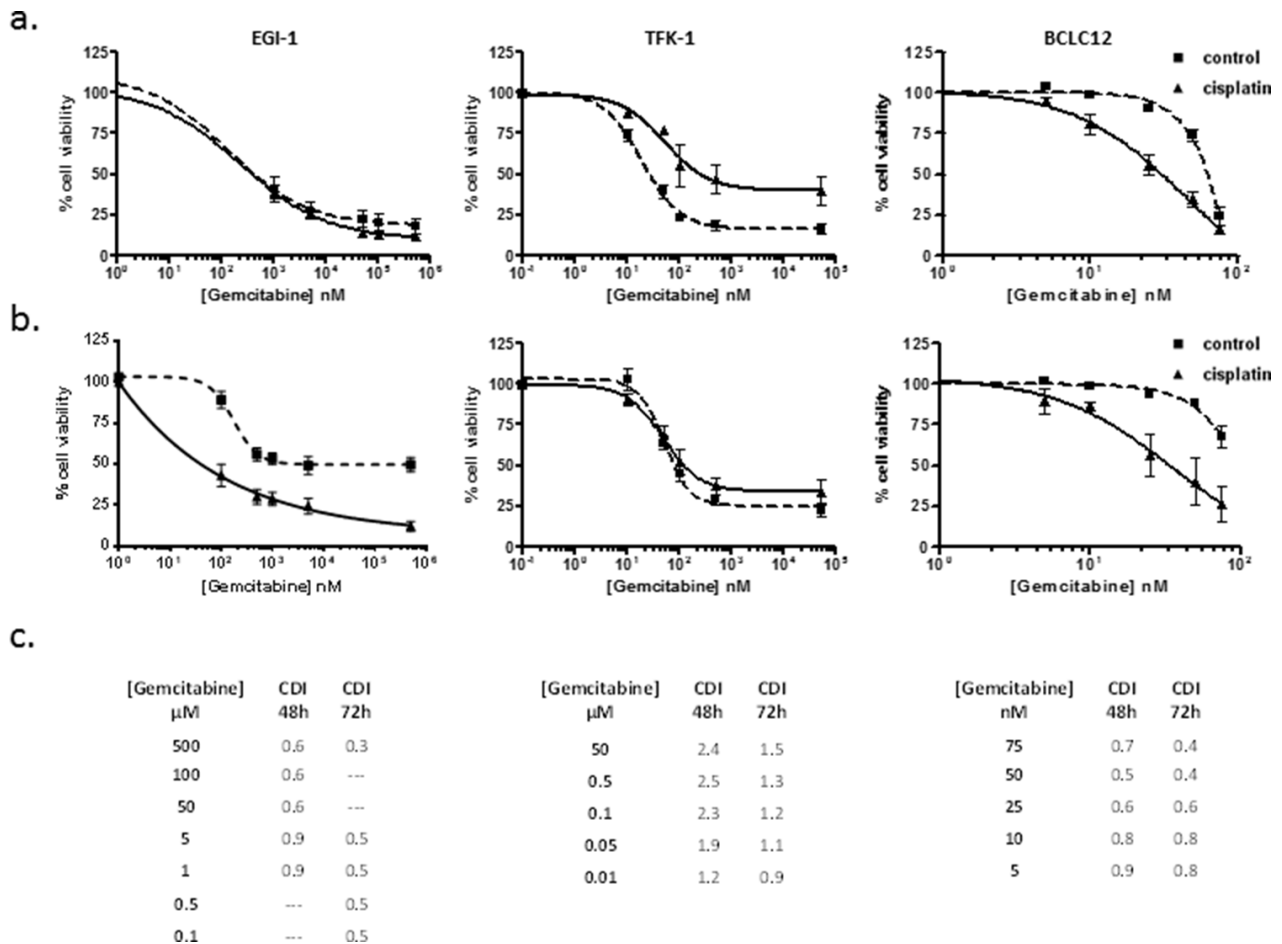


Figure 4: Gemcitabine cytotoxic effect improves with the administration temporal pattern. Dose-response curves in EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines combining cisplatin and gemcitabine. Cells were treated with IC20 cisplatin dose (solid line) or vehicle (dashed line) and 48h (A) and 72h (B) later were treated with gemcitabine increasing doses. (C) CDI values for CDDP and gemcitabine combination treatments at 48h and 72h. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n=3).

demonstrated alterations in drug transporters encoding genes in several cancers such as diminished expression of hCNTs and hOCT1 in different tumors [14, 18, 21–23].

Cisplatin is a broad-spectrum anticancer platinum agent and is active against a wide range of solid tumors, including ovarian, testicular, bladder, colorectal, lung, and head and neck cancers [24]. Interestingly, the study of mechanisms of resistance in liver cancers showed that cisplatin treatment induces changes in several genes involved in the uptake and efflux of anticancer drugs [18]. Our analysis of cisplatin treatment in cholangiocarcinoma cell lines showed increased expression of several transporters involved in anticancer drug uptake, including hCNTs, hENTs and hOCT1. Furthermore, results exhibited a trend to increase the activity of these transporters concomitant with their expression especially in EGI-1 and BCLC12 cell lines, whereas no increase in transport activity was observed in TFK-1. These observations suggested that proper temporal pattern administration of drugs could improve the outcome of currently used chemotherapy combination of cisplatin and gemcitabine,

likewise combination of cisplatin and sorafenib to benefit from hOCT1 increased uptake.

Gemcitabine is a deoxycytidine analogue drug widely used against several solid tumors, including pancreatic, lung, breast, bladder, head, neck, thyroid and ovarian cancers [25]. Nucleoside transporters are necessary to allow the uptake of nucleoside analogues into the cells. Specifically, hCNT1, hCNT3, hENT1 and hENT2 mediate the uptake of gemcitabine into cells [7, 26, 27]. hENT1 intratumoral expression and responsiveness to gemcitabine has shown positive correlation in several solid tumors, including cholangiocarcinoma [16, 28–31]. Nevertheless, no conclusive clinical studies have been performed, when dealing with the other gemcitabine transporters and treatment outputs. Moreover, hCNT1 expression shows a trend to diminish in some cancer types such as gynecologic tumors, breast cancer and pancreatic cancer [21, 22, 32], which clearly could impair chemosensitivity to gemcitabine. In this sense, the increase in gemcitabine transporters expression and activity induced by cisplatin treatment clearly benefit the combination treatment.

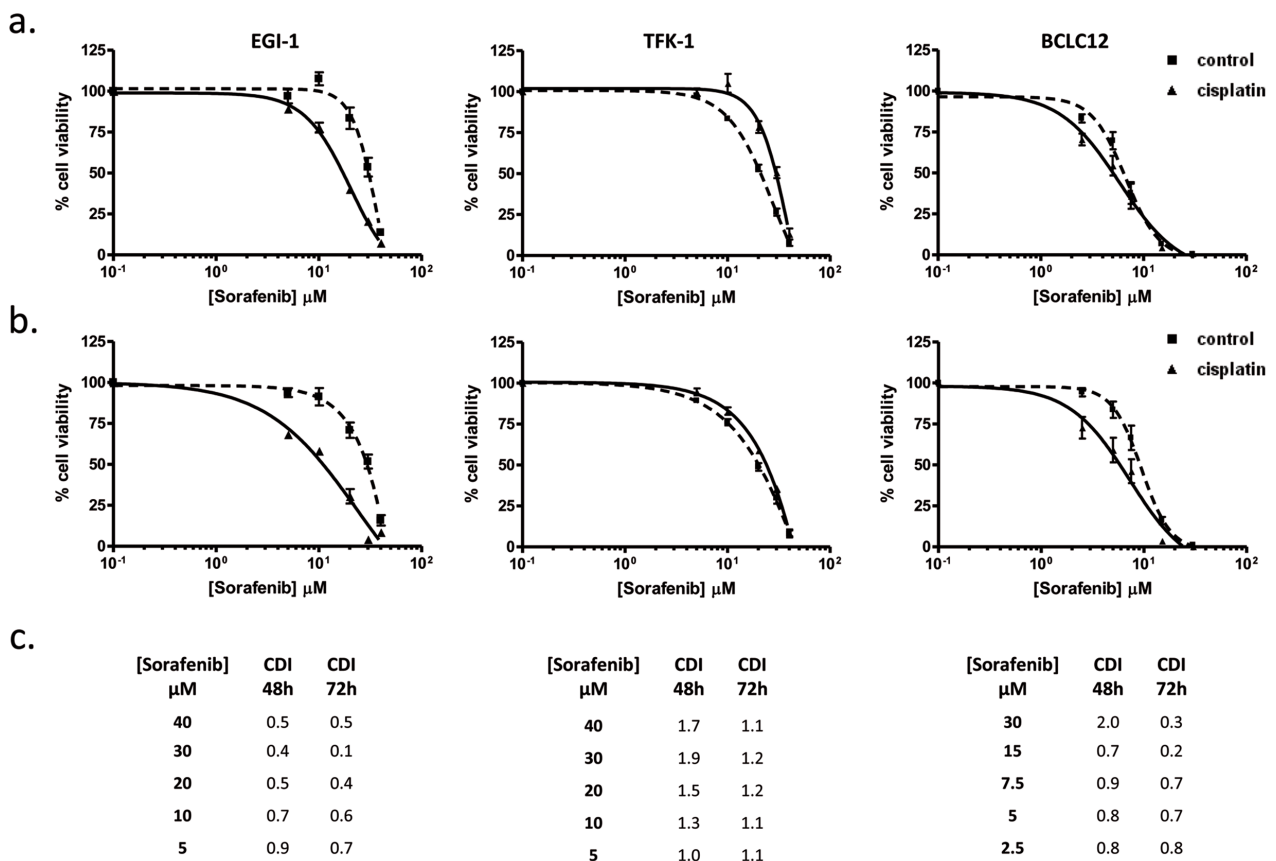


Figure 5: Sorafenib cytotoxic effect improves with the administration temporal pattern. Dose-response curves in EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines combining cisplatin and sorafenib. Cells were treated with IC20 cisplatin dose (solid line) or vehicle (dashed line) and 48h (A) and 72h (B) later were treated with sorafenib increasing doses. (C) CDI values for CDDP and sorafenib combination treatments at 48h and 72h. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n=3).

Sorafenib is a multikinase inhibitor approved for the treatment of hepatocellular carcinoma, renal cell carcinoma and advanced thyroid carcinoma [33]. hOCT1, hOATP1B1 and hOATP1B3 are the transporters involved in sorafenib uptake [12, 13, 34]. There are a few studies dealing with the effect of sorafenib in biliary cancer patients, although mainly without promising clinical results [35–38]. However, negative results could be explained by the lack of selection of specific subtypes of biliary cancers. In this sense, a pilot prospective study has recently shown a modest effect of sorafenib combined with best supportive care in patients with advanced and unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma [39]. This kind of cholangiocarcinoma presents an overlapping molecular profile with hepatocellular carcinoma according to the published molecular signature by Sia et al [3]. A recent retrospective study shows that a reduced intratumoral hOCT1 mRNA expression might play a role as a prognostic biomarker in sorafenib-based hepatocarcinoma therapy, resulting in a worse survival

[40]. However, when we face an increased expression of hOCT1, the activity of the transporter should be considered. In this sense, our results with TFK-1 showed no correlation between hOCT1 expression and activity as we observed for NTs expression and activity. Moreover, in spite of the results obtained *in vitro*, that showed a good synergy combining cisplatin and sorafenib in EGI-1 and BCLC12, the outcome of the *in vivo* experiment clearly showed that daily treatment pattern of sorafenib cannot be changed. Unexpectedly, treatment with only two doses of sorafenib delayed 96h instead of daily treatment induced tumor growth, discarding changes in the administration temporal pattern.

The key role of transporters assuring drug bioavailability, pointed us to design a chemosensitization strategy based on the enhancement of their activity. Thus, in cholangiocarcinoma cell lines, cisplatin treatment induced an increase in drug transporter expression that can enhance their transport activity. Under these conditions, combination treatments of cisplatin with either

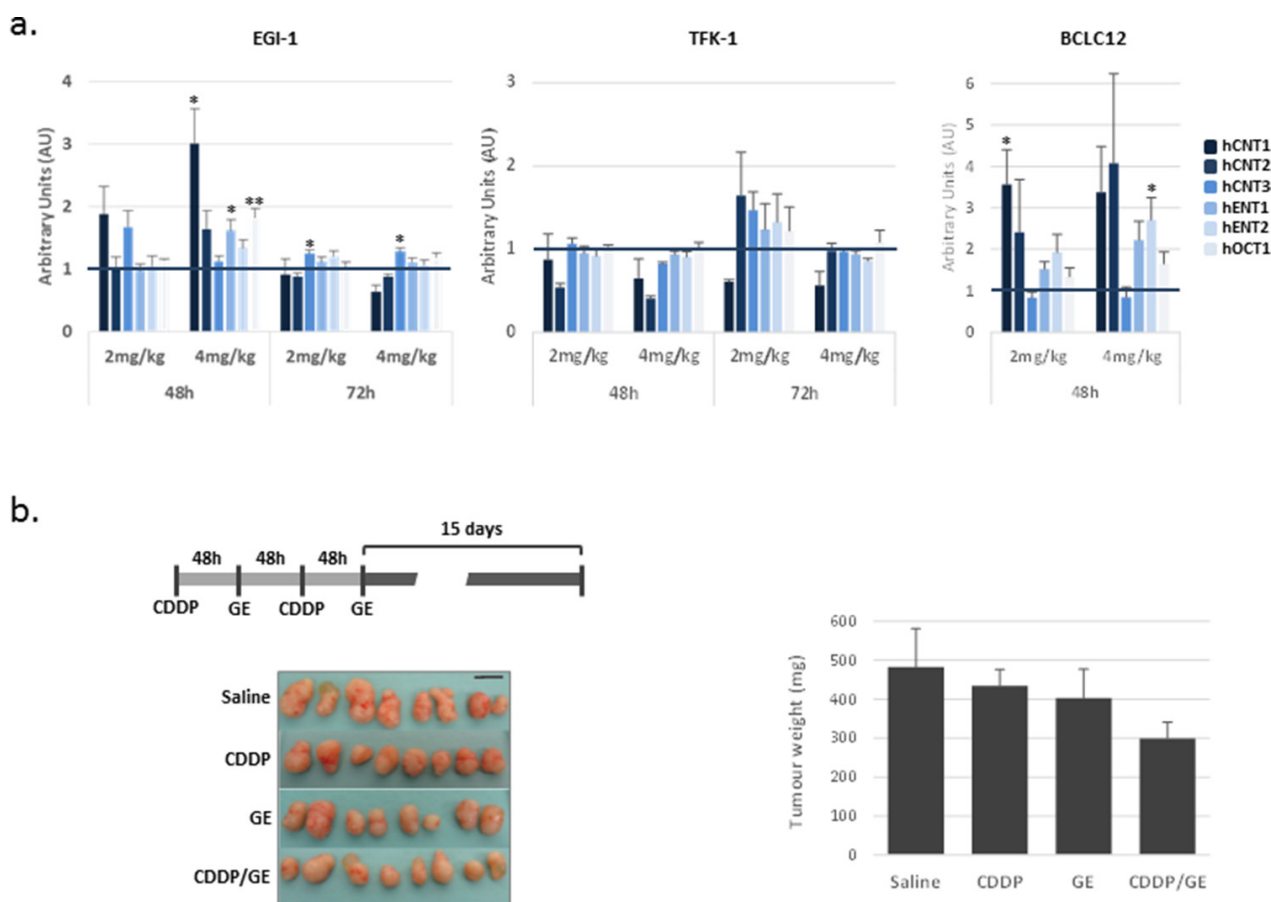


Figure 6: Delayed combination treatment potentiates gemcitabine effect in EGI-1 derived tumors. (A) Effect of cisplatin treatment on drug transporters *in vivo*. Drug transporter expression after 48h and 72h of cisplatin treatment at 2 mg/kg and 4 mg/kg in EGI-1, TFK-1 and BCLC12 derived subcutaneous tumors. **(B)** Combination treatment of cisplatin and gemcitabine in EGI-1 derived tumors following the indicated treatment schedule. Tumor weight and tumor pictures at the end of the experiment. Bars are means ± S.E.M. (n=8). Statistical significance was determined with ANOVA.

gemcitabine or sorafenib at the desired drug combination schedule induced synergy, enhancing the *in vitro* cytotoxic effect in both cases. In this sense, high throughput studies of CDDP resistance has revealed a complex scenario of cell signaling activation pathways triggered by this drug that could eventually explain the expression changes observed in drug transporters [41]. However, the lack of correlation between induced expression changes and activity in TFK-1 cells highlights the complexity of alterations induced by CDDP treatment, emphasizing the need to go deeply in transportome knowledge to find the best option to anticipate drug bioavailability and action.

Whether this type of combined effects is tumor-specific or may show broader impact on cancer treatment is something else that should be further studied. Moreover this study should be also extended to other combined therapies in which one particular agent may impact on the bioavailability of another one in combined therapies. In this regard we recently showed that FLT3 inhibitors used in the treatment of acute pediatric leukemia can impact on particular drug transporter expression (i.e. hENT1), thereby affecting cytarabine action [42].

Essentially our data strongly support the concept that a proper temporal administration pattern can either increase or diminish the uptake of a second drug, taking profit in some cases of alterations induced by the previous treatment. In this sense, direct alterations in the transportome activity profile induced by drug treatment might be taken into account for the prediction of treatment outcome and should not be ignored when patients face drug combination schedules.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Cisplatin, uridine, 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP), 4-nitrobenzyl-6-thioinosine (NBTI), dipyrindamole 1,1'-diethyl-2,2'-cyanine iodide (d22) and quinidine were obtained from Sigma-Aldrich (USA). Sorafenib tosylate and gemcitabine hydrochloride were purchased from MedChem express (Sweden). [5,6-³H]-uridine and [Methyl-³H]-N-methyl-4-phenylpyridinium iodide (³H]MPP⁺) were purchased from Campro Scientific (Germany).

Cell lines

EGI-1 and TFK-1 cell lines were obtained from DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) culture collection. TFK-1 was maintained in RPMI 1640 (Lonza Group Ltd, Switzerland) medium and EGI-1 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza Group Ltd). Both cell media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine 200 mM (Lonza Group Ltd), and 1% Pen/Strep 10000 U/mL

(Lonza Group Ltd). Mz-Cha-1 and Mz-Cha-2 were gently provided by Dr. A. Knuth and were maintained in RPMI 1640 (Lonza Group Ltd), 1% GlutaMAX™-1 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 1% Sodium Pyruvate (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.), 1% MEM non-essential aa (Lonza Group Ltd), 1% L-Gln (Lonza Group Ltd), 1% Pen/Strep 1000 U/ml (Lonza Group Ltd), 10% FBS heat inactivated. BCLC12 and BCLC7 were generated from a patient with an intrahepatic cholangiocarcinoma. Tissue was collected in the operating room immediately after tumor excision. Liver dissociation was performed following standard protocol [43] with modifications. Briefly, tumor tissues were mechanically disaggregated and digested with collagenase IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tissue homogenates were filtered and centrifuged using Ficoll high-resolution density gradients. Cells were cultured at 37°C, 21% O₂, 5% CO₂ culture conditions. Primary cultures were submitted to successive subculture. Those cell cultures that were successfully passaged were further purified by means of single cell culture to obtain a clonal line. Specific antibodies targeting cytokeratins 7, CD56 and MUC1 were used to characterize cholangiocarcinoma cell line by means of immunocytochemistry. Standard culture medium for BCLC12 and BCLC7 cell lines is DMEM and F12 (1:1) (Lonza Group Ltd). Medium was supplemented with: 1% sodium pyruvate 100 mM (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.), 1% Pen/Strep 10000 U/mL (Lonza Group Ltd), 1% Non-Essential Aminoacids (NEAA) (Lonza Group Ltd), and 10% FBS (Life Technologies, USA). Cell lines were maintained in proliferative conditions at 37 °C in a humidified atmosphere and a 5% CO₂. All cell lines were confirmed to be mycoplasma free every two weeks by PCR amplification.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated from cell lines and tumors using the SV Total RNA Isolation System (Promega, USA). A total of 1 µg of RNA was reverse transcribed to cDNA following M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) and random hexamers (Amersham Pharmacia, UK) for reverse transcription. Analysis of hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1, hENT2 and GAPDH (internal control) mRNA levels were performed by RT-PCR using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) as previously described [44]. The mRNA expression of hOCT1 was assessed using the commercial Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Relative quantification of gene expression was assessed using the $\Delta\Delta CT$ method, as described in the TaqMan user's manual (User Bulletin no. 2; Applied Biosystems). Gene expression levels for each individual sample were normalized relative to the GAPDH gene. The amounts of mRNA were expressed as arbitrary units.

Absolute quantification of gene expression was performed by using DNA plasmids containing each of the

analyzed transporters to construct standard curves based on serial dilutions of the plasmids. The standard curves allowed us to correlate CT values of the samples with the mRNA copy number of each gene per microgram of total RNA.

Transport assays

Nucleoside uptake was measured as described previously [45] by exposing replicate cultures at room temperature to [³H] labeled uridine (1 μM, 1 μCi/ml) in sodium-containing or sodium-free transport buffer (137 mM NaCl or 137 mM choline chloride, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, and 10 mM HEPES, pH 7.4). Initial rates of transport were determined using an incubation period of 1 min. Transport was stopped by washing with an excess volume of cold stop solution (173 mM choline chloride, 10 mM HEPES pH 7.4). hENT1 and hENT2 transport was discriminated inhibiting with 1 μM NBTI for hENT1 and 10 μM dipyridamole for both hENT1 and hENT2. [³H]MPP⁺ uptake rates mediated by hOCTs were measured in sodium-containing transport buffer. For hOCTs transport measurements, d22 OCTs inhibitor and quinidine OCT1 inhibitor were used.

Cells were then lysed in 100 μl of 100 mM NaOH/0.5% Triton X-100. Aliquots were used for radioactivity counting and protein determination using the BCA reaction (Pierce, USA).

Dose-response assays

Dose-response assays were performed exposing cells for 24 hours to cisplatin IC20 dose and 48 or 72 hours later cells were treated with increasing concentrations of gemcitabine or sorafenib for 24 hours. To avoid cell over-confluence, for 48 hours experiments, 2 × 10⁵ cells were seeded in 60 mm diameter culture plates 24 hours before treating cells with cisplatin, and for 72 hours experiments 1.5 × 10⁵ cells were seeded 72 hours before treating cells with cisplatin. 24 hours after cisplatin treatment, cell culture media was changed, and 5 × 10³ cells/well were seeded in 96-well culture plates. 72 hours after removing gemcitabine or sorafenib, cell viability was determined by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich).

Data were fitted to a dose-response curve using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software Inc., USA) to obtain 50% inhibitory concentration (IC50) values. Cell survival for all experiments was expressed as the percentage of viable cells relative to that in untreated cells (defined as 100%).

The coefficient of drug interaction (CDI) was used to analyze the effect of drug combination. CDI was calculated based on the absorbance in each group, as $CDI = AB/(A \times B)$, where AB is the ratio for the combination group relative to the control group, and A and B are the

ratios of each single agent group relative to the control group. Thus, a CDI value < 1 indicates synergy, a CDI value = 1 indicates additive effects, and a CDI value > 1 indicates antagonism. CDIs less than 0.7 indicate a significant synergistic effect.

Tumor growth studies

Tumor xenografts were developed by subcutaneous injection of 2 × 10⁶ TFK-1 cells, 6 × 10⁶ BCLC12 cells or 4 × 10⁶ EGI-1 cells into each posterior flank of female outbred nude mice (Charles River France, France). Tumor volume was measured three times a week and was calculated according to the equation, $V(\text{mm}^3) = \pi/6 \times W \times L^2$, where L and W are length and width of the tumor, respectively. Once tumors reached 100 mm³, mice were randomized (n=6 per group) and were treated with an intraperitoneal injection of saline, 2 mg/kg of cisplatin or 4 mg/kg of cisplatin. Tumors were collected 48 and 72h after treatment.

In combination studies, tumor xenografts were developed with EGI-1 cells as previously mentioned. Once tumors reached 70mm³, mice were randomized (n=4 per group) and two cycles of intraperitoneal injection of 4 mg/kg of cisplatin and 48h later followed by intraperitoneal injection of 100 mg/kg of gemcitabine or by oral gavage of 50 mg/kg of sorafenib. Tumor growth was followed up for 15 days after the end of the second cycle.

All animal procedures met the guidelines of European Community Directive 86/609/EEC and were previously approved by the Local Ethical Committee.

Statistical analysis

Results were statistically analyzed using excel Student *t* test for comparisons between two groups. Comparisons among more than two groups were performed with GraphPad program using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc. Differences were considered significant when *p*<0.05.

Abbreviations

cholangiocarcinoma (CCA); nucleoside transporter (NT); concentrative nucleoside transporter (CNT); equilibrative nucleoside transporter (ENT); organic cation transporter (OCT); organic anion transporting polypeptides (OATP); cisplatin (CDDP).

Author contributions

Participated in research design: NUP, LB, JB, MPA and SPT. Conducted experiments: NUP, CBP and SPT. Performed data analysis: NUP, CBP and SPT. All authors contribute to the writing of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank I. Iglesias for her technical support.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interests.

FUNDING

This study was supported by MPA grants SAF2011-23660 and SAF2014-52067-R (Ministerio de ciencia e Innovación) and FEDER (European Union). JB received grant support from Instituto de Salud Carlos III (PI14/00962), AECC (PI044031), WCR (AICR) 16-0026, secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement (2014 SGR 605), and from the Spanish Health Ministry (Plan Estratégico Nacional contra la Hepatitis C). These laboratories belong to the National Biomedical Research Institute on Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBER EHD). CIBER is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación).

REFERENCES

1. Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, Conner EA, Gillen MC, Roskams T, Roberts LR, Factor VM, Thorgerirsson SS. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology*. 2012; 142: 1021-31 e15. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.005>.
2. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, Lind GE, Folseraas T, Forbes SJ, Fouassier L, Geier A, Calvisi DF, Mertens JC, et al. Expert consensus document: cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 13: 261-80. <https://doi.org/nrgastro.2016.51>.
3. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, Peix J, Sole M, Tovar V, Alsinet C, Cornella H, Klotzle B, Fan JB, et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology*. 2013; 144: 829-40. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.001>.
4. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, Roughton M, Bridgewater J. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med*. 2010; 362: 1273-81. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908721>.
5. Roth JA, Carlson JJ. Cost-effectiveness of gemcitabine + cisplatin vs. gemcitabine monotherapy in advanced biliary tract cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2012; 43: 215-23. <https://doi.org/10.1007/s12029-010-9242-0>.
6. Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, Reinhold WC, Papp A, Weinstein JN, Sadee W. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*. 2004; 64: 4294-301. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
7. Pastor-Anglada M, Perez-Torras S. Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol*. 2015; 6: 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00013>.
8. Grane-Boladeras N, Perez-Torras S, Lozano JJ, Romero MR, Mazo A, Marin JJ, Pastor-Anglada M. Pharmacogenomic analysis of the responsiveness of gastrointestinal tumor cell lines to drug therapy: a transportome approach. *Pharmacol Res*. 2016; 113: 364-75. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.007>.
9. Marin JJ, Lozano E, Briz O, Al-Abdulla R, Serrano MA, Macias RI. Molecular bases of chemoresistance in cholangiocarcinoma. *Curr Drug Targets*. 2015. <https://doi.org/CDT-EPUB-65366>.
10. Marin JJ, Al-Abdulla R, Lozano E, Briz O, Bujanda L, Banales JM, Macias RI. Mechanisms of resistance to chemotherapy in gastric cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2016; 16: 318-34. <https://doi.org/ACAMC-EPUB-69276>.
11. Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med*. 2013; 34: 413-35. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.010>.
12. Swift B, Nebot N, Lee JK, Han T, Proctor WR, Thakker DR, Lang D, Radtke M, Gnoth MJ, Brouwer KL. Sorafenib hepatobiliary disposition: mechanisms of hepatic uptake and disposition of generated metabolites. *Drug Metab Dispos*. 2013; 41: 1179-86. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.048181>.
13. Zimmerman EI, Hu S, Roberts JL, Gibson AA, Orwick SJ, Li L, Sparreboom A, Baker SD. Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the disposition of sorafenib and sorafenib-glucuronide. *Clin Cancer Res*. 2013; 19: 1458-66. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3306>.
14. Lautem A, Heise M, Grasel A, Hoppe-Lotichius M, Weiler N, Foltys D, Knapstein J, Schattenberg JM, Schad A, Zimmermann A, Otto G, Lang H, Galle PR, et al. Downregulation of organic cation transporter 1 (SLC22A1) is associated with tumor progression and reduced patient survival in human cholangiocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2013; 42: 1297-304. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1840>.
15. Sasaki H, Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Kondo N, Sueda T. Concurrent analysis of human equilibrative nucleoside transporter 1 and ribonucleotide

- reductase subunit 1 expression increases predictive value for prognosis in cholangiocarcinoma patients treated with adjuvant gemcitabine-based chemotherapy. *Br J Cancer*. 2014; 111: 1275-84. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.399>.
16. Borbath I, Verbrugge L, Lai R, Gigot JF, Humblet Y, Piessevaux H, Sempoux C. Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression is a potential predictive tool for response to gemcitabine in patients with advanced cholangiocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2012; 48: 990-6. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.11.006>.
 17. Namwat N, Amimanan P, Loilome W, Jearanaikoon P, Sripa B, Bhudhisawasdi V, Tassaneeyakul W. Characterization of 5-fluorouracil-resistant cholangiocarcinoma cell lines. *Chemotherapy*. 2008; 54: 343-51. <https://doi.org/10.1159/000151541>.
 18. Martinez-Becerra P, Vaquero J, Romero MR, Lozano E, Anadon C, Macias RI, Serrano MA, Grane-Boladeras N, Munoz-Bellvis L, Alvarez L, Sangro B, Pastor-Anglada M, Marin JJ. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol Pharm*. 2012; 9: 1693-704. <https://doi.org/10.1021/mp300028a>.
 19. Valle JW, Borbath I, Khan SA, Huguet F, Gruenberger T, Arnold D. Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016; 27: v28-v37. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw324>.
 20. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9: 215-36. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>.
 21. Farre X, Guillen-Gomez E, Sanchez L, Hardisson D, Plaza Y, Lloberas J, Casado FJ, Palacios J, Pastor-Anglada M. Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *Int J Cancer*. 2004; 112: 959-66. <https://doi.org/10.1002/ijc.20524>.
 22. Gloeckner-Hofmann K, Guillen-Gomez E, Schmidtgen C, Porstmann R, Ziegler R, Stoss O, Casado FJ, Ruschoff J, Pastor-Anglada M. Expression of the high-affinity fluoropyrimidine-preferring nucleoside transporter hCNT1 correlates with decreased disease-free survival in breast cancer. *Oncology*. 2006; 70: 238-44. <https://doi.org/10.1159/000094541>.
 23. Heise M, Lautem A, Knapstein J, Schattenberg JM, Hoppe-Lotichius M, Foltys D, Weiler N, Zimmermann A, Schad A, Grundemann D, Otto G, Galle PR, Schuchmann M, et al. Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance. *BMC Cancer*. 2012; 12: 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-109>.
 24. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014; 740: 364-78. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
 25. Ciccolini J, Serdjebi C, Peters GJ, Giovannetti E. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 78: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3003-0>.
 26. Mackey JR, Yao SY, Smith KM, Karpinski E, Baldwin SA, Cass CE, Young JD. Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91: 1876-81.
 27. Hu H, Endres CJ, Chang C, Umopathy NS, Lee EW, Fei YJ, Itagaki S, Swaan PW, Ganapathy V, Unadkat JD. Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3). *Mol Pharmacol*. 2006; 69: 1542-53. <https://doi.org/10.1124/mol.105.018945>.
 28. Santini D, Schiavon G, Vincenzi B, Cass CE, Vasile E, Manazza AD, Catalano V, Baldi GG, Lai R, Rizzo S, Giacobino A, Chiusa L, Caraglia M, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) levels predict response to gemcitabine in patients with biliary tract cancer (BTC). *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11: 123-9. <https://doi.org/EPub-Abstract-CCDT-67>.
 29. Kobayashi H, Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Kondo N, Sueda T. Human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts survival of advanced cholangiocarcinoma patients treated with gemcitabine-based adjuvant chemotherapy after surgical resection. *Ann Surg*. 2012; 256: 288-96. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3182536a42>.
 30. Murata A, Amano R, Yamada N, Kimura K, Yashiro M, Nakata B, Hirakawa K. Prognostic predictive values of gemcitabine sensitivity-related gene products for unresectable or recurrent biliary tract cancer treated with gemcitabine alone. *World J Surg Oncol*. 2013; 11: 117. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-117>.
 31. Brandi G, Deserti M, Vasuri F, Farioli A, Degiovanni A, Palloni A, Frega G, Barbera MA, de Lorenzo S, Garajova I, Di Marco M, Pinna AD, Cescon M, et al. Membrane localization of human equilibrative nucleoside transporter 1 in tumor cells may predict response to adjuvant gemcitabine in resected cholangiocarcinoma patients. *Oncologist*. 2016; 21: 600-7. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0356>.
 32. Bhutia YD, Hung SW, Patel B, Lovin D, Govindarajan R. CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2011; 71: 1825-35. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2736>.
 33. Roskoski R Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol*

- Res. 2015; 100: 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.010>.
34. Herraes E, Lozano E, Macias RI, Vaquero J, Bujanda L, Banales JM, Marin JJ, Briz O. Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology*. 2013; 58: 1065-73. <https://doi.org/10.1002/hep.26425>.
 35. Bengala C, Bertolini F, Malavasi N, Boni C, Aitini E, Dealis C, Zironi S, Depenni R, Fontana A, Del Giovane C, Luppi G, Conte P. Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial. *Br J Cancer*. 2010; 102: 68-72. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605458>.
 36. Lee JK, Capanu M, O'Reilly EM, Ma J, Chou JF, Shia J, Katz SS, Gansukh B, Reidy-Lagunes D, Segal NH, Yu KH, Chung KY, Saltz LB, et al. A phase II study of gemcitabine and cisplatin plus sorafenib in patients with advanced biliary adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 2013; 109: 915-9. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.432>.
 37. Chakunta HR, Sunderkrishnan R, Kaplan MA, Mostofi R. Cholangiocarcinoma: treatment with sorafenib extended life expectancy to greater than four years. *J Gastrointest Oncol*. 2013; 4: E30-2. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2013.031>.
 38. El-Khoueiry AB, Rankin CJ, Ben-Josef E, Lenz HJ, Gold PJ, Hamilton RD, Govindarajan R, Eng C, Blanke CD. SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Invest New Drugs*. 2012; 30: 1646-51. <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9719-0>.
 39. Luo X, Jia W, Huang Z, Li X, Xing B, Jiang X, Li J, Si A, Yang T, Gao C, Lau WY, Shen F. Effectiveness and safety of sorafenib in the treatment of unresectable and advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: a pilot study. *Oncotarget*. 2017; 8:17246-17257. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12825>.
 40. Grimm D, Lieb J, Weyer V, Vollmar J, Darstein F, Lautem A, Hoppe-Lotichius M, Koch S, Schad A, Schattenberg JM, Worns MA, Weinmann A, Galle PR, et al. Organic Cation Transporter 1 (OCT1) mRNA expression in hepatocellular carcinoma as a biomarker for sorafenib treatment. *BMC Cancer*. 2016; 16: 94. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2150-3>.
 41. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012; 31: 1869-83. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>.
 42. Catala A, Pastor-Anglada M, Caviedes-Cardenas L, Malatesta R, Rives S, Vega-Garcia N, Camos M, Fernandez-Calotti P. FLT3 is implicated in cytarabine transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 in pediatric acute leukemia. *Oncotarget*. 2016; 7: 49786-99. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10448>.
 43. Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, Novicki DL, Rosenberg MR, Novotny A, Irons G, McLain JR, Michalopoulos G. Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1982; 68: 771-8.
 44. Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, Pastor-Anglada M. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003; 101: 2328-34. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2236>.
 45. del Santo B, Valdes R, Mata J, Felipe A, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology*. 1998; 28: 1504-11. <https://doi.org/10.1002/hep.510280609>.

Role of drug-dependent transporter modulation on the chemosensitivity of cholangiocarcinoma

SUPPLEMENTARY MATERIALS

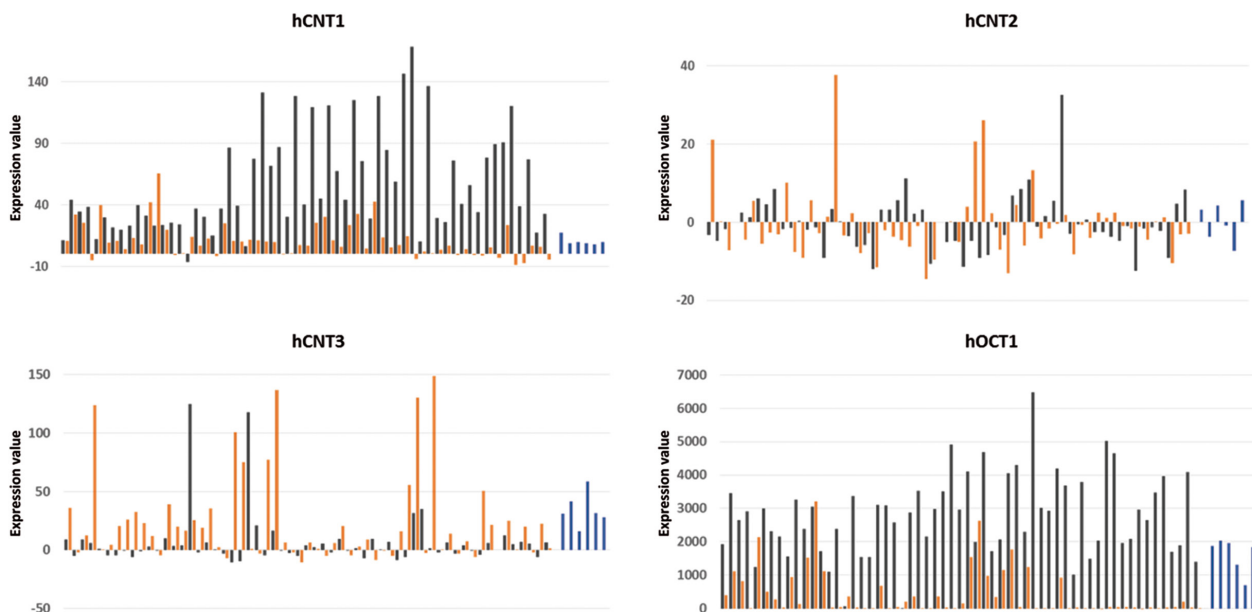
Dose-response assays

For cisplatin cytotoxic effect determination, dose-response assays were performed by seeding 5×10^3 cells/well in 96-well culture plates. Cultures were exposed to increasing concentrations of cisplatin for 24 hours, and 48 hours after drug removing cell viability was determined by MTT assay.

For dose-response curves combining cisplatin treatment for 24h and gemcitabine, 5×10^3 cells/well

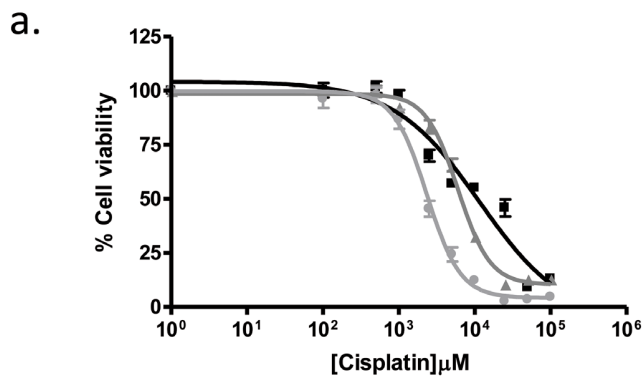
were seeded in 96-well culture plates. 24 hours after cisplatin IC₂₀ treatment, cells were exposed to increasing concentrations of sorafenib for 24 hours. 72 hours after drug removal cell viability was determined by MTT assay.

For cisplatin and 5-fluorouracil or paclitaxel combination assays, experiments were performed as explained before for cisplatin and gemcitabine or sorafenib combination in methods.



	hCNT1	hCNT2	hCNT3	hOCT1
■ Surrounding Liver	57.30 ± 5.42	-0.42 ± 0.94	6.73 ± 3.06	2763.7 ± 159.4
■ Cholangiocarcinoma tumor	11.11 ± 1.82	-0.40 ± 1.14	23.06 ± 4.94	439.4 ± 91.7
■ Normal Intrahepatic bile duct	10.38 ± 1.46	0.18 ± 2.06	34.51 ± 5.90	1620.0 ± 212.1
Paired student's t-test	<0.0001	0.99	0.007	<0.0001

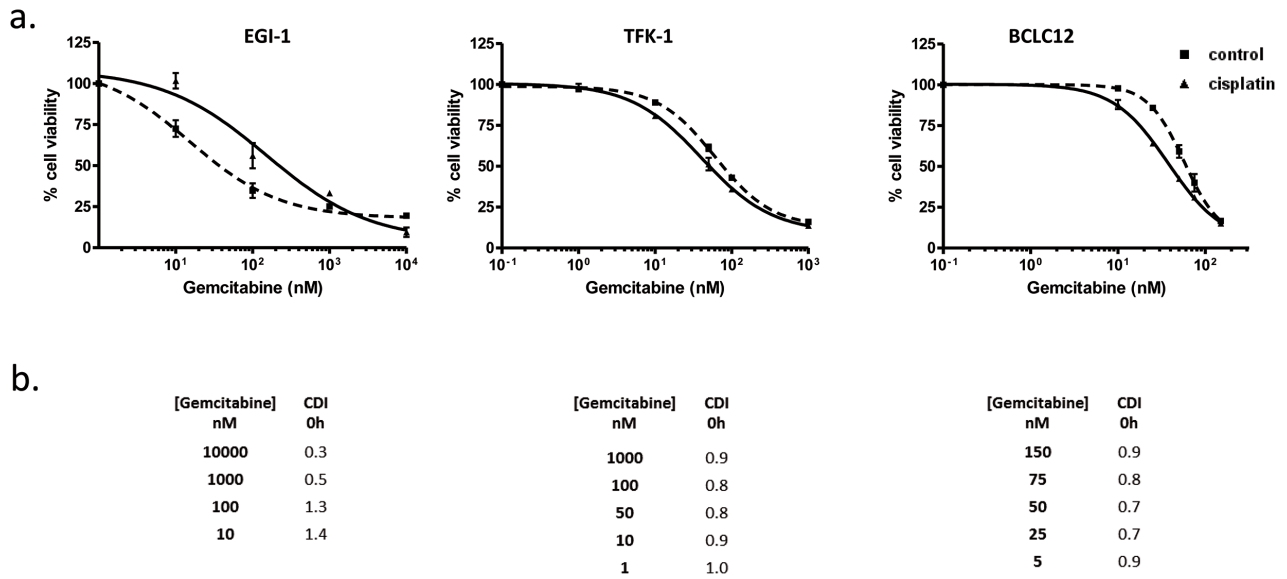
Supplementary Figure 1: Cholangiocarcinoma drug transporters expression. (A) hCNT1, hCNT2, hCNT3 and hOCT1 expression was determined in matched surrounding livers and tumors from 59 CCA patients and 6 normal intrahepatic bile ducts using previously published data from GEO: GSE26566 [1]. Table results are expressed as mean ± S.E.M. Statistical significance was determined with Paired Student's t-test.



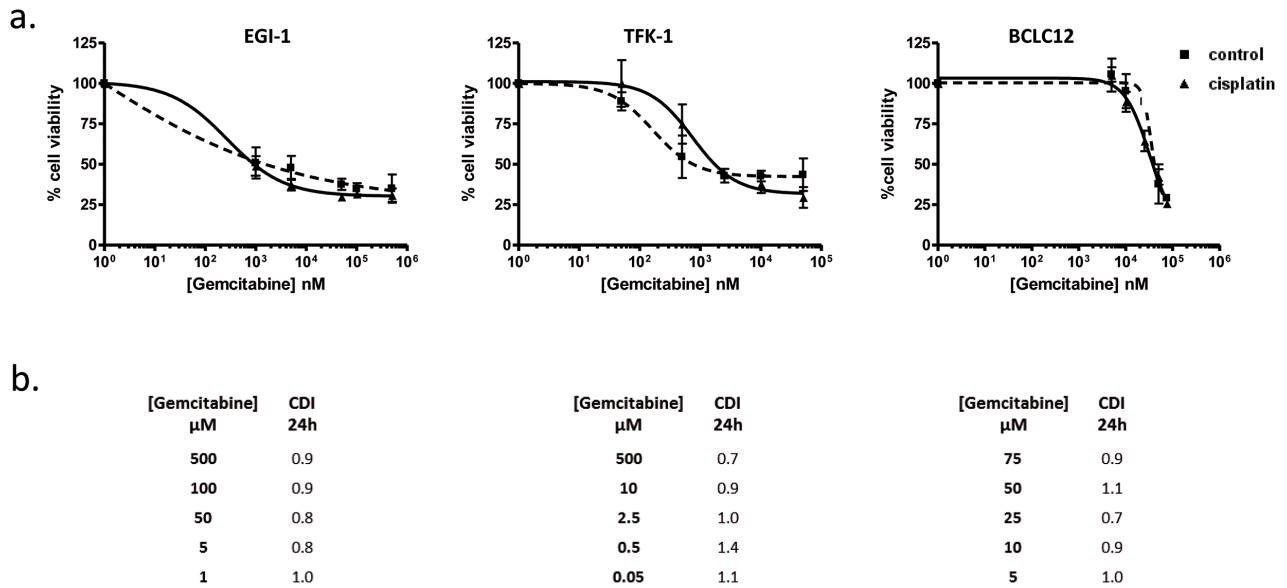
b.

Cell line	IC50 (μM)	IC20 (μM)
TFK-1	6.58 ± 0.70	3.18 ± 0.92
BCLC12	2.52 ± 0.42	1.25 ± 0.33
EGI-1	10.46 ± 3.27	2.53 ± 0.89

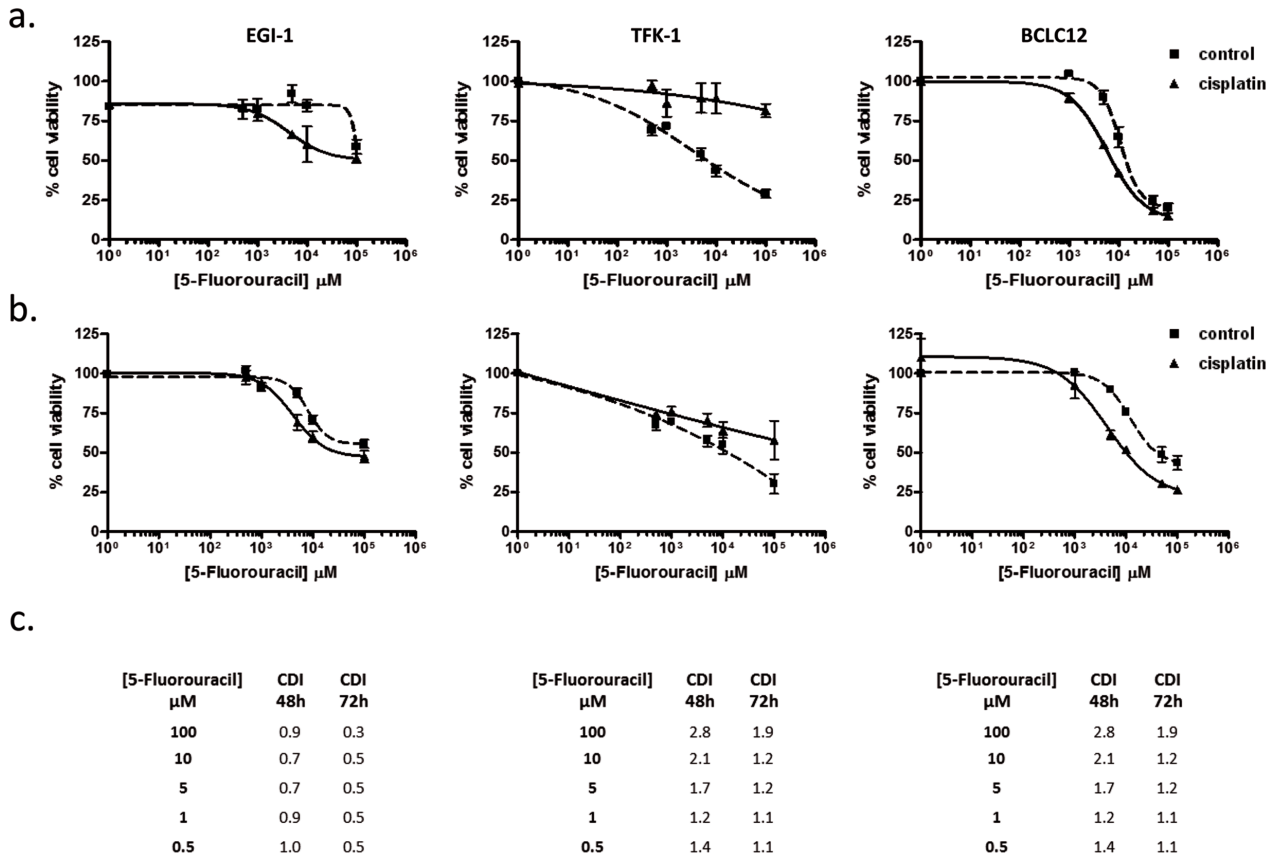
Supplementary Figure 2: Cisplatin cytotoxic effect determination. EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines were treated with increasing cisplatin doses for 24h. (A) Dose response-curves in EGI-1 (black), TFK-1 (gray) and BCLC12 (light gray). (B) IC50 and IC20 values.



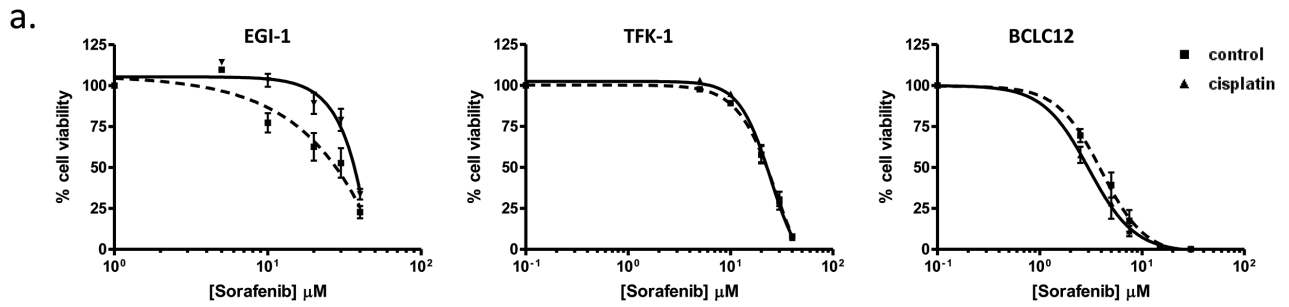
Supplementary Figure 3: Dose-response curves combining gemcitabine and cisplatin treatment simultaneously. (A) EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines were treated at the same time with IC20 cisplatin dose (solid line) or vehicle (dashed line) and with gemcitabine increasing doses. **(B)** CDI values for CDDP and gemcitabine combination treatments at 0h. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (n=3).



Supplementary Figure 4: Dose-response curves combining gemcitabine treatment after 24h of cisplatin. (A) EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines were treated with IC20 cisplatin dose (solid line) or vehicle (dashed line) and 24h later were treated with gemcitabine increasing doses. (B) CDI values for CDDP and gemcitabine combination treatments at 24h. Results are expressed as mean \pm S.E.M. (n=3).



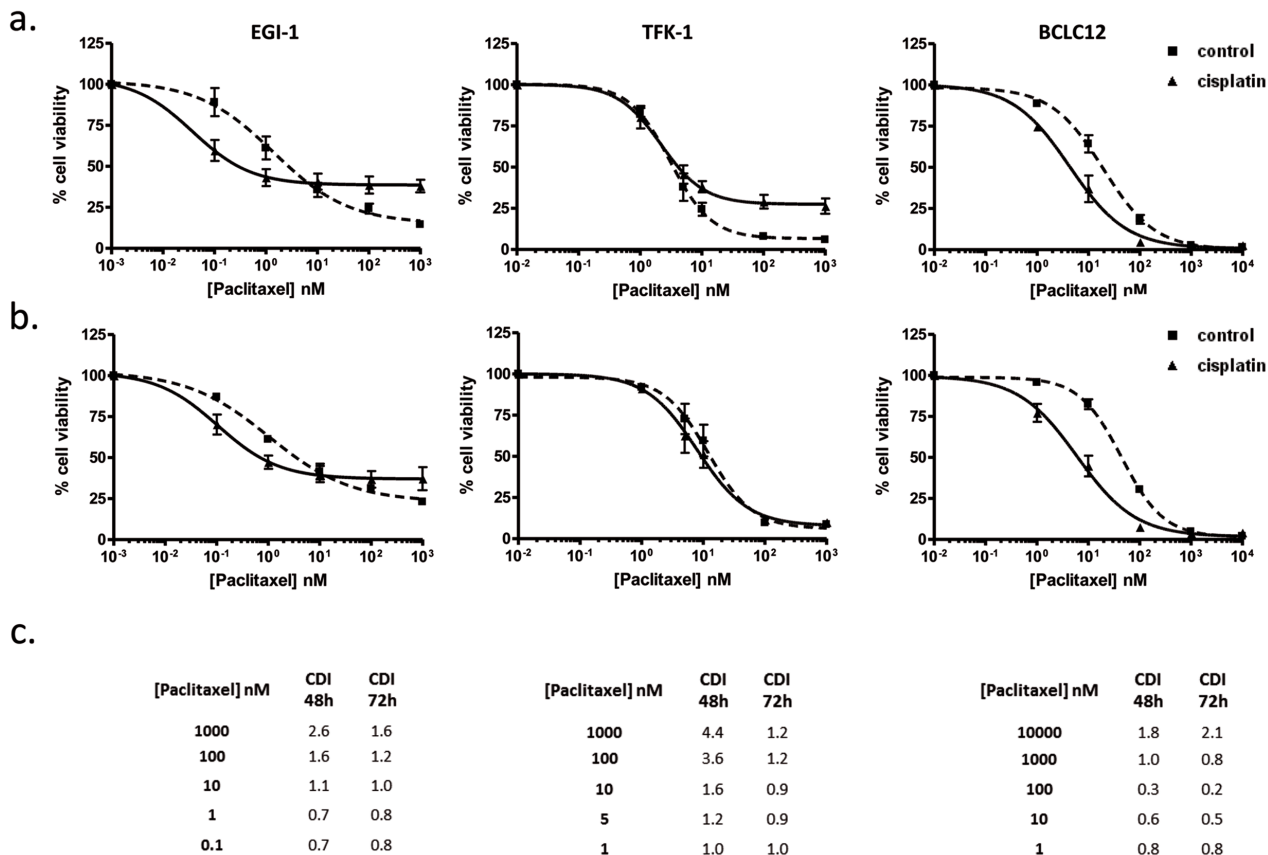
Supplementary Figure 5: 5-Fluorouracil cytotoxic effect improves with the administration temporal pattern. Dose-response curves in EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines combining cisplatin and 5-fluorouracil. Cells were treated with IC20 cisplatin dose (solid line) or vehicle (dashed line) and 48h (A) and 72h (B) later were treated with 5-fluorouracil increasing doses. (C) CDI values for CDDP and 5-fluorouracil combination treatments at 48h and 72h. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n=3).



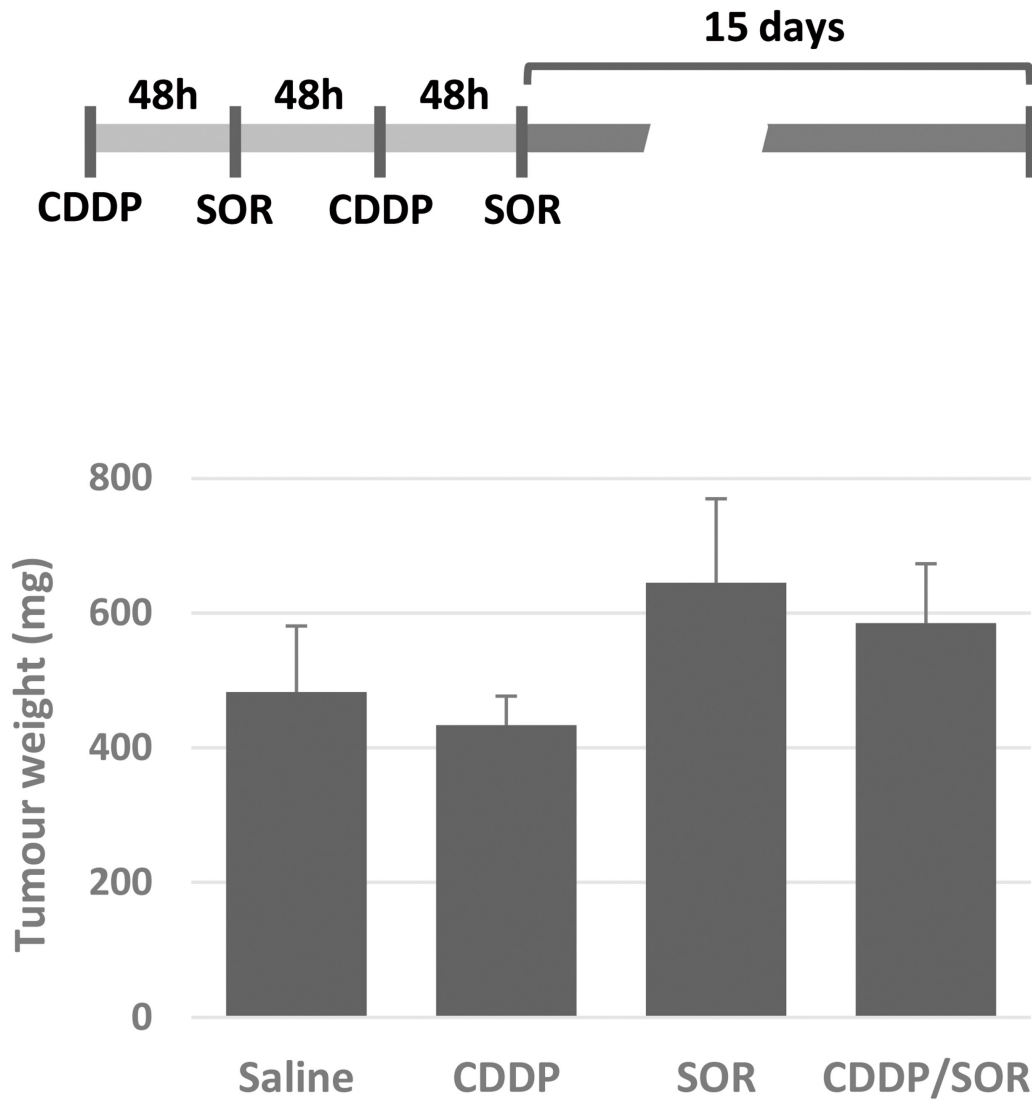
b.

[Sorafenib] μM	CDI 0h	[Sorafenib] μM	CDI 0h	[Sorafenib] μM	CDI 0h
40	1.5	40	0.9	30	2.2
30	1.5	30	1.0	15	1.4
20	1.4	20	1.0	7.5	0.6
10	1.3	10	1.1	5	0.7
5	1.0	5	1.1	2.5	0.8

Supplementary Figure 6: Dose-response curves combining sorafenib and cisplatin treatment simultaneously. (A) EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines were treated at the same time with IC20 cisplatin dose (solid line) or vehicle (dashed line) and with sorafenib increasing doses. **(B)** CDI values for CDDP and sorafenib combination treatments at 0h. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n=3).



Supplementary Figure 7: Paclitaxel cytotoxic effect improves with the administration temporal pattern. Dose-response curves in EGI-1, TFK-1 and BCLC12 cell lines combining cisplatin and paclitaxel. Cells were treated with IC20 cisplatin dose (solid line) or vehicle (dashed line) and 48h (A) and 72h (B) later were treated with paclitaxel increasing doses. (C) CDI values for CDDP and paclitaxel combination treatments at 48h and 72h. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n=3).



Supplementary Figure 8: Sorafenib treatment induces tumor growth in EGI-1 derived tumors. Combination treatment of cisplatin and sorafenib in EGI-1 derived tumors following the indicated treatment schedule. Tumor weight at the end of the experiment. Bars are means \pm S.E.M. (n=8). Statistical significance was determined with ANOVA.

Supplementary Table 1: Characteristics of patients and tumors

	Cholangiocarcinoma patients n=8
Gender (M/F)	3/5
Age	68 ± 11.77
Tumor size	6,11 ± 2.69
Tumor differentiation degree good/poor/bad	2/3/3
Cirrhosis yes/no	2/6