



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

**Regulació del promotor del gen  
Dihidrofolat Reductasa en la proliferació cel·lular:  
relació amb la resistència generada pel metotrexat**

Verónica Noé Mata



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

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

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

**REGULACIO DEL PROMOTOR DEL GEN *DIHIDROFOLAT  
REDUCTASA* EN LA PROLIFERACIO CEL.LULAR.  
RELACIO AMB LA RESISTENCIA GENERADA PEL  
METOTREXAT**

**VERONICA NOE I MATA**

**FACULTAT DE FARMACIA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**Tesi presentada per la Llicenciada  
Verónica Noé i Mata per optar  
al grau de Doctor en Farmàcia.**

**Aquesta Tesi ha estat realitzada  
en la Unitat de Bioquímica  
del Departament de Ciències Fisiològiques  
Humanes i de la Nutrició.  
Facultat de Farmàcia  
Universitat de Barcelona,  
sota la direcció del Professor  
Dr. Carlos J. Ciudad**

**Barcelona, Juliol de 1995**

**Verónica Noé i Mata**

**Carlos J. Ciudad**

**A la meva familia  
A la Mamen**



**Vull agrair**

**Al Dr. Carles Ciudad, el director d'aquest treball, per donar-me sempre totes les oportunitats, els consells, els ànims i el seu recolzament, per saber ésser exigent amb el treball i amable amb la persona, per ensenyar-me tot el que sé i per moltes coses més. Espero tenir la oportunitat de continuar treballant amb ell durant molt més temps.**

**A les Cristinas (A i R) i l'Angela, per ésser les millors amigues i companyes que he pogut trobar al laboratori, per totes les llaunes de Coca-Cola compartides i pel seu suport en els moments més crítics. Treballar amb totes tres ha estat divertit i productiu alhora, i entre totes hem sigut capaces d'establir un ambient perfecte. També vull agrair-li's que m'hagin deixat disposar del temps i la concentració necessaris per escriure la tesi al laboratori. Sense elles, tot hagués estat molt més dur.**

**A tots els membres de la Unitat de Bioquímica**

**- Dr. Fausto G. Hegardt, Cap del Departament quan em vaig incorporar, Diego, Pedro, Dolors, Guille, Nuria Casals, Cristina Mascaró, José Antonio, Joan Carles, Gladys, Clarice, Concha, Sean, Carlos Buesa, Angel, Judith, Maria Elena, Merche i Raquel.**

**- Albert Tauler, Sofia, Cristina Salvadó, Manel i Diego.**

**- Dr. Joan Aguilar, Pepita, Laura, Teresa, Pilar, Ana, Nuria Obradors, Eva, Rosa, Tomás i Montse.**

**- Maribel, Isidoro i Domi.**

**- Albert Ferrer, Montse, Encarna, Gemma, Nuria Cunillera, Toni, i Angela Masferrer.**

**- Eva, Santi i Pilar.**

**També als que fa temps que van marxar, José, Elena i Gabriel.**

**Al Dr. Joan Carles Laguna per la seva amistat.**

**A la Rosa i la Bibi, per ésser tant bones amigues.**

**Al Dr. Larry Chasin, Chao, Ofra i tots els companys de la Columbia University per tots els estius compartits amb ells.**

**A la Kathleen, per ésser la millor "bibliotequera" que coneixo, i per tota la seva ajuda els primers dies a la Columbia.**

## PRESENTACIO

El treball que s'ha realitzat s'ha centrat en l'estudi de la resistència a la quimioteràpia, prenent com a model el tractament amb metotrexat, que actua per inhibició de l'enzim dihidrofolat reductasa, involucrat en la síntesi de DNA.

L'estrategia del nostre estudi ha consistit en incrementar de manera artificial la resistència al metotrexat en cèl.lules CHO en cultiu, mitjançant la seva incubació amb diferents efectors que tenen la capacitat d'incrementar la resistència al metotrexat, i posteriorment, assajar compostos que poguessin contrarrestar l'increment provocat en el número de colònies resistents per aquests efectors. D'aquesta manera, hem observat que el desenvolupament de la resistència al metotrexat depèn d'una via bioquímica que involucra l'augment dels nivells de calci intracel.lulars i l'activació de la proteïna quinasa C. Hem demostrat que els inhibidors de la proteïna quinasa C són capaços de contrarrestar l'increment de la resistència originat pel tractament amb TPA, i que un dels inhibidors assajats, la calfostina C, també és efectiu en reduir la resistència basal al metotrexat.

També hem observat que el principal mecanisme de resistència al metotrexat que desenvolupen les cèl.lules CHO és el de l'amplificació gènica a nivell del *locus dihidrofolat reductasa*, que codifica per a l'enzim diana d'atac del tractament amb metotrexat.

D'altra banda, l'estudi de la resistència al metotrexat ens ha portat a aprofundir en la regulació del promotor del gen *dhfr*. Hem observat que els factors de transcripció Sp1 i E2F s'uneixen al promotor mínim del gen, i que la importància relativa de la unió de Sp1 és molt superior a la de E2F. Posteriorment, hem estudiat la regulació del promotor en el procés de proliferació, prenent com a model l'estimulació de cèl.lules quiescents per addició de sèrum fetal. Aquest model pot representar el procés que segueix una cèl.lula normal de l'organisme durant la proliferació tumoral.

Hem determinat que la unió de Sp1 al promotor mínim del gen *dhfr* s'incrementa al llarg de la proliferació, i que en aquestes mateixes condicions, l'activitat transcripcional del gen, els nivells de mRNA corresponents i l'estabilitat d'aquest mRNA també augmenten.

També hem establert que Sp1, en la seva unió al promotor del gen *dhfr*, es troba formant part d'un complex transcripcional amb la proteïna supressora de tumors Retinoblastoma, i aquest complex es pot detectar a totes les fases del cicle. Els nivells de proteïna Sp1 i Retinoblastoma també s'incrementen amb l'estimulació de les cèl.lules quiescents per addició de sèrum.

Proposem un model de regulació del promotor del gen *dhfr* en el procés de proliferació basat en la interacció entre el factor de transcripció Sp1 i la proteïna RB, que completa el model existent sobre la relació entre la proteïna RB i el factor E2F al llarg del cicle cel.lular. Segons el nostre model, RB exerceix el control de la proliferació cel.lular no només a través dels seus estats de fosforilació, sino també pels seus nivells de proteïna. L'associació observada entre RB i Sp1 concorda amb la capacitat descrita de RB per estimular la transcripció mitjançada per Sp1.

Finalment, hem establert una correlació entre la resistència al metotrexat i la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr*. L'ester de forbol TPA, que incrementa la resistència, també incrementa la unió al promotor per part de Sp1, factor que controla crucialment la transcripció del gen *dhfr*. Aquesta observació estaria d'acord amb un dels mecanismes proposats per explicar el desenvolupament de l'amplificació gènica, segons el qual un increment en la transcripció de gens específics seguit de recombinació i reparació podria donar lloc a estructures amplificades.



## ABREVIATURES

AMPC	Adenosina 3'-5' monofosfat
APH	Afidicolina
<i>aprt</i>	Adenosina fosforribosil transferasa
ATP	Adenosina 5' trifosfat
bp, kb	Parells de bases, kilobases
BSA	Albúmina sèrica bovina
CAD	Carbamil fosfat sintetasa- aspartat transcarbamilasa dihidro-orotasa
CAK	Quinasa activadora de les quinases depenents de ciclins
CAT	Cloramfenicol acetil transferasa
CDK	Quinasa depenent de ciclins
CHO	Ovari de hamster Chinès
Da, kDa	Daltons, kilodaltons
DAG	Diacil glicerol
DAS	Sulfur de dialil
DEPC	Dietil pirocarbonat
<i>dhfr</i> , DHFR	Dihidrofolat reductasa
DMs	Doble minut
DMSO	Dimetil sulfòxid
dNTPS	Desoxirribonucleòtids trifosfat
DTT	Ditiotreitòl
EDTA	Etilè diamino tetraacetat
EGTA	Etilè glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil èter) N, N'-tetraacetat
x g	Gravetat
- GHT	Glicina, Hipoxantina, Timidina
H-7	1-(5-Isoquinolilsulfonil)-2-metilpiperazina
HB	Tampó hipotònic
12-HETE	Acid 12-hidroxi-eicosatetraenoïc
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
hnRNA	RNA heteronuclear
HSRs	Regions de tinció homogènea
HU	Hidroxiurea
mA	Miliamper
MDR	Multidrug resistance
M, mM, $\mu$ M, nM	Molar, milimolar, micromolar, nanomolar

MOPS	Acid morfolino propanosulfònic
MPF	Factor promotor de la mitòsi
MTX	Metotrexat
nm	Nanòmetre
<sup>32</sup> P	Isòtop <sup>32</sup> del fòsfor
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Antigen nuclear de cèl.lules proliferatives
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PKC	Proteïna quinasa C
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoroanhidre
PS	Fosfatidil serina
RB	Retinoblastoma
RCE	Retinoblastoma control element
RT	Transcriptasa inversa
SDS	Sulfat dodecil sòdic
TBE	Tris borat EDTA
TBST	Tris clorur Tween
TE	Tris EDTA
TPA	Forbol 12-miristat 13-acetat
Tris	Tris (hidroximetil) aminometà
U	Unitats internacionals d'activitat enzimàtica
UTR	Regió no traduïda

## TAULA DE CONTINGUTS

<b>1. INTRODUCCIO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ESTRUCTURA DEL GEN <i>dhfr</i></b>	<b>2</b>
1.1.1. Estructura del promotor del gen <i>dhfr</i>	2
1.1.2. Factors de transcripció que s'uneixen al promotor del gen <i>dhfr</i>	4
<b>1.2. EXPRESSIO BASAL DEL GEN <i>dhfr</i></b>	<b>6</b>
<b>1.3. EXPRESSIO REGULADA DEL GEN <i>dhfr</i></b>	<b>6</b>
<b>1.4. CICLE CEL.LULAR</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1. Fases del cicle cel.lular</b>	<b>9</b>
1.4.1.1. La fase G1 del cicle cel.lular	9
1.4.1.2. Inhibidors dels complexos ciclina-CDK de la fase G1	12
1.4.1.3. La fase S del cicle cel.lular	13
1.4.1.4. Les fases G2/M del cicle cel.lular	14
1.4.1.4.1. Activació del MPF	15
1.4.1.4.2. Inactivació del MPF	15
<b>1.5. CANVIS MOLECULARS DE PROTEINES INVOLUCRADES EN LA PROGRESSIO DEL CICLE CEL.LULAR I RELACIONADES AMB EL GEN <i>dhfr</i></b>	<b>16</b>
<b>1.5.1. LA PROTEINA RETINOBLASTOMA</b>	<b>16</b>
1.5.1.1. Característiques de la proteïna Retinoblastoma	16
1.5.1.2. Regulació de RB al llarg del cicle cel.lular	17
1.5.1.3. Complexes de RB amb altres proteïnes	18
<b>1.5.2. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIO E2F</b>	<b>19</b>
1.5.2.1. Característiques del factor E2F	19
1.5.2.1. Regulació d'E2F	20
<b>1.5.3. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIO Sp1</b>	<b>21</b>
1.5.3.1. Característiques del factor Sp1	21
1.5.3.2. Regulació de Sp1	22
1.5.3.2.1. Coactivadors	22
1.5.3.2.2. Formació de multímers	22
1.5.3.2.3. Mecanismes de fosforilació	22
1.5.3.2.4. Interaccions amb altres proteïnes cel.lulars	23
<b>1.6. MECANISMES DE RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA</b>	<b>24</b>
<b>1.6.1. L'AMPLIFICACIO GENICA</b>	<b>25</b>
1.6.1.1. Característiques de la resistència per amplificació	26
1.6.1.2. Possibles mecanismes per a l'amplificació gènica	27
1.6.1.3. Estructura dels gens amplificats	28

1.6.2. EL FENOTIPUS MDR	29
1.6.2.1. Característiques del fenotipus MDR	29
1.6.2.2. Característiques de la P-glicoproteïna	29
1.6.2.3. Implicació de la proteïna quinasa C en el fenotipus MDR	30
1.6.2.4. Possibles mecanismes addicionals d'adquisició del fenotipus MDR	31
<b>2. MATERIALS I METODES</b>	<b>33</b>
2.1. LINIES CEL·LULARS	33
2.2. MEDIS DE CULTIU	33
2.3. INCUBACIONS AMB EFECTORS	34
2.4. ESTABLIMENT DE LES CONDICIONS DE SINCRONITZACIO	34
2.5. OBTENCIO DE NUCLIS	35
2.6. ASSAIG DE CITOMETRIA	35
2.7. OBTENCIO D'EXTRACTES NUCLEARS	37
2.8. OBTENCIO DE SONDES DE DNA	38
2.9. ANALISI DE RETARDACIO DE LA MOBILITAT ELECTROFORETICA	39
2.10. ANALISI DE SUPERRETARDACIO DE LA MOBILITAT ELECTROFORETICA	39
2.11. OBTENCIO DE RNA TOTAL	40
2.12. DETERMINACIO QUANTITATIVA DE mRNA PER RT-PCR	40
2.13. DETERMINACIO DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL PER RT-PCR QUANTITATIVA	42
2.14. ASSAIG DE WESTERN BLOT	43
2.15. ASSAIG DE DETERMINACIO DE L'ACTIVITAT DE LA PROTEINA QUINASA C	44
2.16. ASSAIG DE DETERMINACIO DEL NUMERO DE COPIES DEL GEN <i>dhfr</i> MITJANÇANT PCR QUANTITATIVA	47
2.17. ASSAIG D'IMMUNOPRECIPITACIO	48
2.18. ASSAIG D'IMMUNOFLUORESCENCIA	49
2.19. PROCESSAMENT D'IMATGE	50
<b>3. RESULTATS</b>	<b>51</b>
ESTUDI DE LES VIES BIOQUIMIQUES INVOLUCRADES EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA RESISTENCIA AL MTX	51
3.1. ESTABLIMENT DE LES CORBES DE SUPERVIVENCIA AL MTX PER LES CEL·LULES K1	51
3.2. INCREMENT DE LA FREQUÈNCIA DE RESISTENCIA AL MTX PER DIFERENTS EFECTORS	52

3.2.1. Efecte de l'hidroxiurea	53
3.2.2. Efecte de l'afidicolina	54
3.2.3. Efecte del TPA 55	
3.2.4. Determinació del grau d'amplificació del gen <i>dhfr</i> en colònies resistents al MTX	58
3.2.4.1. Endegament d'un mètode de determinació del grau d'amplificació gènica mitjançant P.C.R. quantitativa	58
3.2.4.2. Determinació del grau d'amplificació generat pel tractament amb HU, APH o TPA	62
3.2.5. Efecte de l'EGTA	65
3.2.6. Efecte d'ionòfors de calci i de l'angiotensina II	66
3.2.7. Efecte del TPA, A23187 i angiotensina II sobre l'activitat PKC en cèl.lules CHO	68
3.3. EFECTE D'INHIBIDORS DE LA PKC SOBRE LA RESISTENCIA AL MTX	70
3.3.1. Estudi de la toxicitat d'inhibidors de la PKC	70
3.3.2. Efecte de l'H-7 72	
3.3.3. Efecte de l'àcid glicirritènic	72
3.3.4. Efecte de l'estaurosporina	74
3.3.5. Efecte de la calfostina C	76
3.3.6. Efecte dels inhibidors de la PKC sobre la mateixa activitat en cèl.lules CHO	77
3.3.6.1. Efectes produïts en incubació cel.lular	77
3.3.6.2. Efecte produït en extractes cel.lulars	78
3.3.7. Efecte de la calfostina C en condicions basals	80
3.4. LIPOPEROXIDACIO	82
3.4.1. Efecte de l'àcid araquidònic i el 12-HETE sobre la resistència al MTX	82
3.4.2. Efecte de l'àcid araquidònic i el 12-HETE sobre l'activitat PKC de les cèl.lules CHO	83
3.4.3. Efecte d'inhibidors de la lipoperoxidació sobre l'increment de la resistència al MTX generat per l'àcid araquidònic	84
ESTUDI DE LA REGULACIO DEL PROMOTOR DEL GEN <i>dhfr</i> EN LA PROLIFERACIO CELLULAR	88
3.5. ESTRUCTURA DEL PROMOTOR MINIM DEL GEN <i>dhfr</i> I DELS MUTANTS DERIVATS	88
3.6. ASSAIGS DE RETARDACIO DE LA MOBILITAT ELECTROFORETICA	91
3.6.1. Assaigs amb el fragment 410f	91

3.6.2. Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb els fragments 26f, 414f i 413f	94
3.6.3. Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb els fragments Sp1f i e2Ff	96
3.7. SINCRONITZACIO DE LES CEL.LULES K1	101
3.8. ASSAIG DE RETARDACIO DE LA MOBILITAT ELECTROFORETICA AMB EXTRACTES NUCLEARS OBTINGUTS AL LLARG DE LA PROLIFERACIO CELLULAR	104
3.8.1. Assaigs amb el fragment 410f	104
3.8.2. Assaigs amb els fragments Sp1f i e2Ff	104
3.9. ESTUDI DE LA TRANSCRIPCIO DEL GEN <i>dhfr</i> AL LLARG DE LA PROLIFERACIO MITJANÇANT LA TECNICA DE RT-PCR	106
3.10. DETERMINACIO DELS NIVELLS DE mRNA CORRESPONENT AL GEN <i>dhfr</i> AL LLARG DE LA PROLIFERACIO PER RT-PCR	107
3.11. ESTUDI DE L'ESTABILITAT DEL mRNA CORRESPONENT AL GEN <i>dhfr</i>	109
3.12. ASSAIGS DE SUPERRETARDACIO AMB LES SONDES 410f I Sp1f	110
3.13. DETERMINACIO DELS NIVELLS DE Sp1 I RETINOBLASTOMA AL LLARG DE LA PROLIFERACIO CELLULAR PER WESTERN BLOT	114
3.14. EFECTES DE LA IMMUNOPRECIPITACIO DE RB I Sp1 SOBRE LA UNIO DE Sp1 AL PROMOTOR DEL GEN <i>dhfr</i>	117
3.15. ASSAIGS D'IMMUNOFLUORESCENCIA	119
3.16. RELACIO ENTRE TRANSCRIPCIO I AMPLIFICACIO	121
<b>4. DISCUSSIO</b>	<b>124</b>
4.1. ESTUDI DE LES VIES BIOQUIMIQUES INVOLUCRADES EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA RESISTENCIA	124
4.2. DETERMINACIO DEL GRAU D'AMPLIFICACIO GENICA ASSOLIT AMB EL TRACTAMENT AMB DIFERENTS EFECTORS	128
4.3. PAPER DE LA PKC EN ELS DIFERENTS MECANISMES DE RESISTENCIA A LES DROGUES	129
4.4. EFECTE DE LA LIPOPEROXIDACIO SOBRE LA RESISTENCIA AL MTX	130
4.5. ESTUDI DEL PROMOTOR MINIM DEL GEN <i>dhfr</i> EN CONDICIONS BASALS	131
4.6. REGULACIO DEL GEN <i>dhfr</i> EN EL PROCES DE PROLIFERACIO CELLULAR	133
4.7 REGULACIO DE L'EXPRESSIO DEL GEN <i>dhfr</i> EN EL PROCES DE PROLIFERACIO CELLULAR	135

<b>4.8. PAPER DE LA PROTEINA RETINOBLASTOMA EN LA REGULACIO DEL PROMOTOR DEL GEN <i>dhfr</i></b>	<b>137</b>
<b>4.9. MODEL PER A LA REGULACIO DEL PROMOTOR DEL GEN <i>dhfr</i> EN LA PROLIFERACIO CEL·LULAR</b>	<b>139</b>
<b>4.10. RELACIO ENTRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIO Sp1 I EL MECANISME DE RESISTENCIA AL MTX</b>	<b>140</b>
<b>5. CONCLUSIONS</b>	<b>142</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>146</b>

# **1. INTRODUCCIO**



El gen *dihidrofolat reductasa (dhfr)* pertany a la categoria de gens constitutius, els productes dels quals són necessaris per al creixement de tots els tipus cel·lulars. En concret, la proteïna DHFR és un enzim clau en la síntesi *de novo* de glicina, purines i timidilat, i es troba per tant implicada en la replicació del DNA. L'enzim DHFR catalitza la reducció depenent de NADPH de folat a dihidrofolat i seguidament a tetrahidrofolat. Els folats reduïts són necessaris en les reaccions de transferència de grups monocarbonats. La seva oxidació enzimàtica a l'estat de dihidrofolat únicament té lloc per acció de la timidilat sintasa en la síntesi *de novo* del deoxitimidilat. Aquesta reacció és la principal consumidora de tetrahidrofolat, i en aquestes condicions, el requeriment cel·lular de DHFR és el més elevat.

Degut a que l'enzim DHFR és essencial en la producció del timidilat, un dels precursors del DNA, les cèl·lules en fase replicativa tenen un requeriment superior de l'activitat DHFR (Johnson, 1984) i aquesta diferència entre les cèl·lules en proliferació activa i les cèl·lules en estat quiescent han fet de la DHFR una diana per al tractament de condicions hiperproliferatives com la neoplasia. La droga metotrexat (MTX) és un anàleg del folat que actua com a inhibidor competitiu de l'enzim DHFR ( $K_i < 10^{-9}$  M), i que s'utilitza ampliament en el tractament de l'artritis i de diferents tipus de càncer, particularment, coriocarcinomes i leucèmies limfocítiques agudes (Schweitzer *et al.*, 1990). Després de varies administracions del tractament amb MTX, alguns pacients desenvolupen resistència a la droga. Amb la utilització de models de cultius cel·lulars, s'ha pogut establir que l'amplificació del DNA que conté el gen *dhfr* és el mecanisme més comú per a l'adquisició de la resistència al MTX. L'amplificació del gen *dhfr* també es pot produir en pacients amb càncer (Curt *et al.*, 1983; Horns *et al.*, 1984), encara que intervenen altres mecanismes en el desenvolupament de la resistència a les dosis terapèutiques de MTX, com poden ésser la reducció del transport cap a l'interior de la cèl·lula, l'increment de l'expulsió de la droga cap a l'exterior o la mutació de l'enzim (Allegra, 1990).

## 1.1. ESTRUCTURA DEL GEN *dhfr*

El gen *dhfr* de hamster es va clonar i caracteritzar a partir de la línia cel·lular MK42, una línia de CHO amplificada a nivell del locus *dhfr* (Carothers *et al.*, 1983). Aquest gen es troba localitzat al cromosoma 2 de les cèl·lules CHO (Roberts *et al.*, 1980) amb una organització de 6 exons i 5 introns, i un tamany total d'aproximadament 26 kb. Els tamanyes aproximats dels 5 introns del gen són 0.3; 2.5; 8.6; 2.6 i 9.4 kb, respectivament.

La localització relativa dels diferents exons es va establir a partir dels clons de cDNA corresponents a les dues espècies predominants de mRNA a les cèl·lules MK42, amb tamanyes de 2.350 i 1.100 bp, respectivament. La diferència de tamanyes entre els mRNAs és deguda a l'absència de les seqüències més en 3' a l'espècie de mRNA més curta i revela l'utilització de diferents llocs de poliadenilació.

El gen *dhfr* codifica per a una proteïna de 21 kDa amb 187 residus d'aminoàcids.

### 1.1.1. Estructura del promotor del gen *dhfr*

El gen *dhfr* de hamster produeix transcrits múltiples que es diferencien en els seus extrems 5'. Aproximadament un 85% dels transcrits comencen a l'inici major de la transcripció i la resta comença a l'inici menor localitzats a -63 bp, i a -107 bp respecte a l'inici de la traducció, respectivament (Mitchell *et al.*, 1986).

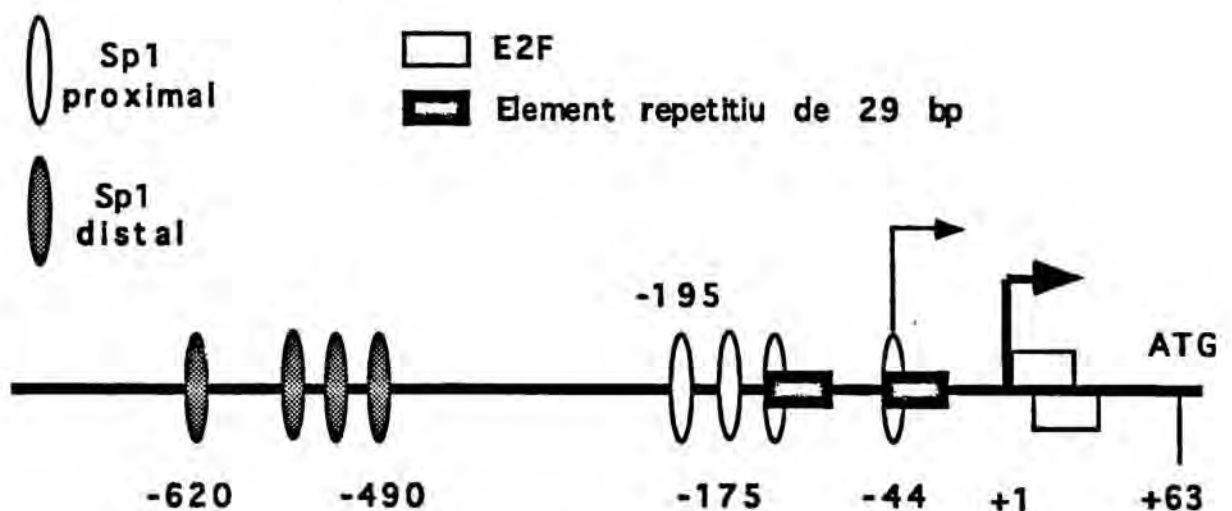
El promotor del gen *dhfr* de hamster careix de caixa TATA, un element habitualment emprat com a senyal que dirigeix l'iniciació de la transcripció per la RNA polimerasa II (McGrogan *et al.*, 1985).

La regió de DNA que conté el promotor del gen *dhfr* es caracteritza per l'abundància de G + C, acompanyada d'una alta densitat de dinucleòtids CpG sense metilar, fet poc usual en el DNA genòmic de vertebrats.

El promotor del gen *dhfr* en mamífers (ratolí, hamster i home) presenta 4 motius de seqüències conservades:

- 1) Varies caixes GC, que constitueixen llocs d'unió per al factor de transcripció Sp1 (Dyran & Tjian, 1985).
- 2) Una o més seqüències de l'element CAA, on sembla que s'uneix un factor encara no identificat.
- 3) Una regió pròxima al lloc d'inici de la transcripció on s'uneix el factor de transcripció E2F.
- 4) Una seqüència a la regió 5' no traduïda (UTR).

Dues de les seqüències conservades es localitzen en una estructura repetitiva de 29 bp que inclou una caixa GC a l'extrem 5' de l'estructura i el motiu CAA a l'extrem 3' de la mateixa. Una d'aquestes estructures repetitives es troba a 49 bp de l'inici major de la transcripció, i la segona a 47 bp de l'inici menor de la transcripció. Existeixen altres caixes GC, riques en G i que segueixen el consens GRGGCGG/TRG (en el qual R equival a A o G) fora de l'estructura repetitiva de 29 bp, localitzades a -195 i -175 bp respecte a l'inici major de la transcripció, respectivament, de manera que són 4 els llocs d'unió del factor Sp1 en zones pròximes a l'inici de transcripció. També existeixen múltiples caixes GC distals, riques en C que segueixen el consens CCGCCC, a la regió des de -490 a -620 bp del promotor (Mitchell *et al.*, 1986).



ESQUEMA 1. ESTRUCTURA DEL PROMOTOR DEL GEN *dhfr* DE HAMSTER

### **1.1.2. Factors de transcripció que s'uneixen al promotor del gen *dhfr***

Els estudis relacionats amb l'interacció de factors de transcripció amb el promotor del gen *dhfr* han establert la gran importància del factor Sp1 en l'activitat d'aquest promotor.

Encara que l'estructura del promotor del gen *dhfr* inclou múltiples caixes GC d'unió per Sp1, s'ha demostrat mitjançant experiments de delecció progressiva de la regió 5', que la seqüència d'unió més pròxima a l'inici major de la transcripció, situada entre les posicions -48 i -42 relatives a l'inici major de la transcripció, és la té un pes més important en l'activitat del promotor. La delecció d'aquesta caixa GC més proximal comporta la pèrdua de l'activitat transcripcional, tal com es va comprovar en assaigs de transfecció (Ciudad *et al.*, 1988; Swick *et al.*, 1989).

Les construccions que només conserven les 48 bp del promotor que inclouen la caixa GC més proximal en relació amb l'inici major de la transcripció, donen lloc a transcrits correctament iniciats i a colònies viables en assaigs de transfecció, encara que els transcrits originats corresponen exclusivament a l'utilització de l'inici major de la transcripció (Ciudad *et al.*, 1988).

Les mutacions puntuals a la caixa GC més proximal en relació a l'inici major de la transcripció, mostren que la unió del factor de transcripció Sp1 està relacionada amb l'activitat transcripcional del promotor. Les mutacions en el lloc consensus d'unió de Sp1 comporten una reducció en els nivells de RNA corresponents al gen *dhfr* i la pèrdua de la capacitat d'unió al factor de transcripció (Ciudad *et al.*, 1992). Totes aquestes dades indiquen que un únic lloc d'unió de Sp1 en el gen *dhfr* de hamster és necessari per a una correcta iniciació de la transcripció a l'inici major.

També s'ha observat que l'addició de mitramicina, una droga que interacciona amb les seqüències de DNA riques en GC, inhibeix la unió de Sp1 a les seves seqüències de reconeixement i aboleix de manera selectiva l'activitat transcripcional del promotor del gen *dhfr* (Blume *et al.*, 1991).

En el gen *dhfr* de hamster també es troben varies seqüències CAA. L'introducció de mutacions a nivell de l'element CAA més proximal, que es localitza a la posició -29 respecte a l'inici major de la transcripció, no té pràcticament efecte en el nivell de transcripció, en comparació amb la construcció que conté el promotor mínim del gen de hamster (Ciudad *et al.*, 1992). La mutació d'aquest l'element CAA no comporta una alteració del lloc d'inici major de la transcripció, el que indica que aquesta seqüència no és un substitut funcional de la clàssica caixa TATA en el posicionament de l'iniciació de la transcripció.

Fins a l'actualitat, no ha estat possible detectar la unió de proteïnes als elements CAA, encara que en footprints amb Sp1 parcialment purificat s'ha observat la protecció de la regió CAA a l'igual que la caixa GC (Gunderson *et al.*, 1988).

Un tercer factor capaç d'unir-se al promotor del gen *dhfr* és el factor de transcripció E2F, que juga un important paper en la progressió del cicle cel.lular a través de la seva interacció amb la proteïna Retinoblastoma.

El gen *dhfr* de hamster conté una seqüència conservada, TTTCGCGCCAAA, immediatament en 3' de l'inici major de la transcripció (+1), que conté dos consenus d'unió sobreposats pel factor E2F. La mutació d'aquesta seqüència aboleix la interacció amb E2F i comporta una reducció de la transcripció i de l'expressió del gen, però no afecta a l'inici major ni a l'utilització relativa dels dos inicis de transcripció del promotor (Blake *et al.*, 1989). Alguns estudis han suggerit l'existència d'un factor anomenat HIP1 (housekeeping initiator protein 1), que podria unir-se a nivell de l'inici major de la transcripció, per dirigir aquesta (Means & Farnham, 1990; Means *et al.*, 1992), encara que aquest factor és probablement E2F, ja que la seqüència d'unió reconeguda i l'efecte sobre la transcripció del gen són els mateixos per als dos factors.

Tal com s'ha descrit, l'unió de proteïnes específiques a l'element CAA o al lloc d'unió de E2F no és responsable de la determinació del lloc d'inici major de la transcripció en el gen *dhfr*, el que sugereix que una de les proteïnes activadores és la que s'encarrega d'aquesta funció. S'ha proposat que el lloc d'unió proximal de Sp1 podria jugar un paper en el

posicionament de l'inici major de la transcripció en el promotor de hamster (Blake *et al.*, 1990).

## 1.2. EXPRESSIO BASAL DEL GEN *dhfr*

El transcrit primari corresponent al gen *dhfr* té un tamany de 25 kb. A partir d'aquest transcrit s'originen tres tipus de missatgers mitjançant la utilització de senyals d'aturada múltiples en direcció 3'. La diferència principal entre aquests mRNAs radica en l'extensió de la regió 3' no traduïda, encara que només un dels llocs de poliadenilació en 3' es troba precedit per l'hexanucleòtid AAUAAA corresponent al senyal consensu de poliadenilació (Venolia *et al.*, 1987). Els tamany dels mRNAs corresponents al gen *dhfr* es poden separar en dues categories: dos transcrits majors de 2.350 i 1.100 bp, respectivament i un transcrit menor de 1.850 bp. El transcrit de 2.350 bp és l'únic precedit pel senyal consensu de poliadenilació.

La inclusió del primer intró incrementa l'expressió de construccions de minigen de hamster de 7 a 10 vegades en assaigs de transfecció (Venolia *et al.*, 1987). L'eliminació d'aquest primer intró en un minigen de hamster origina transcrits incorrectament iniciats (Ciudad *et al.*, 1992). Per tant, el primer intró té una importància clara en l'expressió eficaç del gen *dhfr* en cèl.lules, encara que no s'ha determinat si la estimulació és de tipus transcripcional o post-transcripcional.

Mitjançant la tècnica de RT-PCR s'ha pogut establir que l'últim intró eliminat en el procés d'empalmament per donar lloc al mRNA és l'intró 1 (Kessler *et al.*, 1993).

## 1.3. EXPRESSIO REGULADA DEL GEN *dhfr*

Donat que l'enzim DHFR es troba involucrat en la ruta de biosíntesi de nucleòtids, la seva activitat és indispensable en el procés de replicació del DNA i està íntimament involucrada en la progressió del cicle cel.lular. L'activitat DHFR s'incrementa durant la fase S del cicle cel.lular que correspon a la fase de replicació del DNA. Aquest increment en l'activitat DHFR a conseqüència de l'increment de la

síntesi de la proteïna DHFR podria ésser degut a dos mecanismes: un increment en l'activitat transcripcional o bé un increment en l'estabilitat del mRNA corresponent al gen *dhfr*. Mitjançant aquests mecanismes, es produiria un increment en els nivells de missatger del gen *dhfr* que originarien, en última instància, un augment dels nivells de proteïna DHFR i per tant, de la seva activitat enzimàtica.

Encara que s'ha demostrat que la síntesi de proteïna DHFR es troba regulada en funció del cicle cel·lular (Wiedemann & Johnson, 1979; Mariani *et al.*, 1981), els estudis realitzats per determinar si l'increment observat en l'activitat DHFR a la fase S és una conseqüència d'un increment de l'activitat transcripcional o d'un augment en l'estabilitat del missatger han arribat a conclusions contradictòries.

Aquesta discordància en els resultats pot ésser deguda en part a la utilització de models diferents per a l'obtenció de cèl·lules sincronitzades en algun punt del cicle cel·lular.

Es poden utilitzar tres tipus de models per estudiar la regulació gènica al llarg del cicle cel·lular: I) cèl·lules sincronitzades en la fase G<sub>0</sub> mitjançant la deprivació de sèrum fetal o d'aminoàcids essencials o pel creixement fins a confluència, II) cèl·lules seleccionades a les diferents fases del cicle mitjançant el procés d'elutriació per centrifugació i III) cèl·lules seleccionades en la fase de mitosi mitjançant sacsejament mitòtic. Depenent del model utilitzat s'observen diferents comportaments.

En estudis realitzats a partir de fibroblasts de ratolí en estat quiescent, s'ha observat que la producció de mRNA corresponent al gen *dhfr* es troba controlada a nivell de la transcripció del gen quan les cèl·lules són estimulades mitjançant l'addició de sèrum fetal a tornar a l'estat proliferatiu. En aquestes condicions, es produeix un increment de 4 vegades en la transcripció del gen *dhfr* (Santiago *et al.*, 1983). En la mateixa direcció, s'ha observat que en poblacions de fibroblasts de ratolí sincronitzades per selecció mitòtica es produeix un increment de 7 vegades en la transcripció del gen *dhfr* quan les cèl·lules entren en la fase S (Farnham & Schimke, 1985).

Amb cèl·lules 3T6 de ratolí sincronitzades en G<sub>0</sub> per deprivació de sèrum fetal, Hendrickson *et al.* (1980) van observar un increment de 4

vegades en el nivell de mRNA corresponent al gen *dhfr* en arribar a la fase S. Aquest increment no tenia lloc a conseqüència de la variació en l'estabilitat del missatger, ja que la seva vida mitja era la mateixa en cèl.lules quiescents en Go i en cèl.lules en creixement exponencial.

El grup de Kellems (Leys & Kellems, 1981; Leys *et al.*, 1984) van analitzar la transcripció i el processament del gen *dhfr* en la línia cel.lular S180 de fibroblasts de ratolí. Les cèl.lules es sincronitzaven en fase estacionaria per creixement fins a confluència, i posteriorment, eren estimulades al sembrar-les en medi fresc a més baixa densitat. En aquestes condicions, no es van trobar canvis a nivell de la transcripció del gen *dhfr* a conseqüència de l'estimulació, però es va determinar l'increment tant de l'estabilitat relativa del RNA nuclear com del nivell de processament dels transcrits a mRNA. Segons aquest grup, la quantitat de mRNA corresponent al gen *dhfr* es regula mitjançant un augment en la seva pròpia estabilitat sense que es produeixi un increment en la transcripció.

En oposició a aquests resultats, un altre estudi que utilitza cèl.lules proliferatives seleccionades per elutriació centrífuga estableix que els nivells de mRNA corresponents al gen *dhfr* no varien quan les cèl.lules progressen de la fase G1 a la fase S, i tampoc es produeix un increment net en els nivells de proteïna DHFR en aquestes condicions (Feder *et al.*, 1989).

Fins a l'actualitat no existeix cap treball que hagi estudiat al mateix temps tant la transcripció com l'estabilitat del missatger per explicar l'increment en els nivells de proteïna DHFR que es produeix a la fase S del cycle cel.lular. De tots els estudis realitzats, però, es desprèn la idea que el gen *dhfr* és molt sensible a tots els canvis relacionats amb el medi de cultiu, i que la seva regulació en cèl.lules en creixement exponencial és diferent a la que segueixen les cèl.lules en estat quiescent quan són estimulades a proliferar.

#### **1.4. CICLE CEL.LULAR**

Actualment, existeix un gran interès per determinar la relació entre l'activació de gens concrets i la progressió al llarg del cycle cel.lular. S'ha observat que l'activació de determinats factors de transcripció es



produeix en punts específics del cicle, concretament a la fase G1 i interfase G1/S, segons un patró establert. L'expressió i regulació d'aquests factors de transcripció permet l'activació d'altres gens que codifiquen per a les proteïnes necessàries per a la correcta progressió del cicle. Es tracta, per tant, d'un mecanisme perfectament controlat que regula la proliferació cel·lular. A continuació es descriuen les diferents fases del cicle cel·lular amb especial èmfasi en la seva regulació.



### **1.4.1. Fases del cicle cel·lular**

A conseqüència de l'estímul proliferatiu dels mitògens, es produeix un programa de processos bioquímics estretament regulat que portarà a l'inici de la replicació del DNA i en última instància a la divisió cel·lular. Aquest procés constitueix el cicle cel·lular i es pot dividir en 3 fases principals: G1, S i G2/M.

La progressió al llarg del cicle cel·lular es troba estretament relacionada amb un cicle bioquímic subjacent en el qual les quinases dependents de ciclines (CDKs) s'activen de manera seqüencial a través de diferents ciclines. D'acord amb aquest model, cada complex successiu ciclina-CDK fosforila la única sèrie de substrats que són essencials per a cada procés del cicle en concret. La regulació de la transició entre els diferents estats cel·lulars es localitza als diferents punts de chequeig, com poden ésser l'inici i l'acompliment de la replicació del DNA (fase S) i de la divisió cel·lular (mitosi), (Nurse *et al.*, 1994).

#### **1.4.1.1. La fase G1 del cicle cel·lular**

La fase G1 del cicle cel·lular és una fase bàsicament de preparació per al procés de replicació del DNA, que tindrà lloc a la fase S.

Les cèl·lules de mamífers són sensibles a tota una sèrie d'estímuls extracel·lulars, com poden ésser els factors de creixement, els antagonistes de mitògens, els inductors de la diferenciació i altres efectors, fins a assolir el punt de restricció al final de la fase G1, després del qual la progressió en el cicle és independent dels senyals de

l'entorn. Els reguladors clau de la progressió al llarg de la fase G1 són, per una part, tres ciclines de tipus D, D1, D2 i D3, que es complexen en holoenzims amb les quinases CDK4 i CDK6 (Bates *et al.*, 1994), i per un altre part la ciclina de tipus E que es combina amb la quinasa CDK2 més tard en G1.

Les tres ciclines del tipus D s'indueixen com a part de la resposta retardada als mitògens d'una manera depenent del tipus cel·lular. Aquestes ciclines es sintetitzen mentre es mantingui l'estímul del factor de creixement i oscil·len de forma moderada al llarg del cicle amb nivells màxims a la proximitat de l'interfase G1/S. Tanmateix, aquest tipus de ciclines és ràpidament degradat ja que la seva vida mitja és molt curta, aproximadament de 30 minuts (Matsushime *et al.*, 1991; Won *et al.*, 1992). S'ha proposat que les ciclines de tipus D podrien actuar com a sensors dels factors de creixement (Sherr, 1993).

La destrucció de les ciclines D en resposta a la deprivació de factors de creixement durant la fase G1 bloqueja l'entrada en la fase S, però la seva degradació més tard en el cicle no té cap efecte d'aturada.

L'expressió de la quinasa CDK4 s'indueix a conseqüència de l'estímul dels mitògens (Matsushime *et al.*, 1992 ; Geng & Weinberg, 1993). Encara que la síntesi de les ciclines D comença en la transició des de la fase G<sub>0</sub> cap a la fase G1, l'activitat de la quinasa associada a aquestes ciclines no es manifesta fins a la meitat de la fase G1 i posteriorment, s'incrementa a mesura que les cèl·lules s'aproximen a l'interfase G1/S (Matsushime *et al.*, 1994).

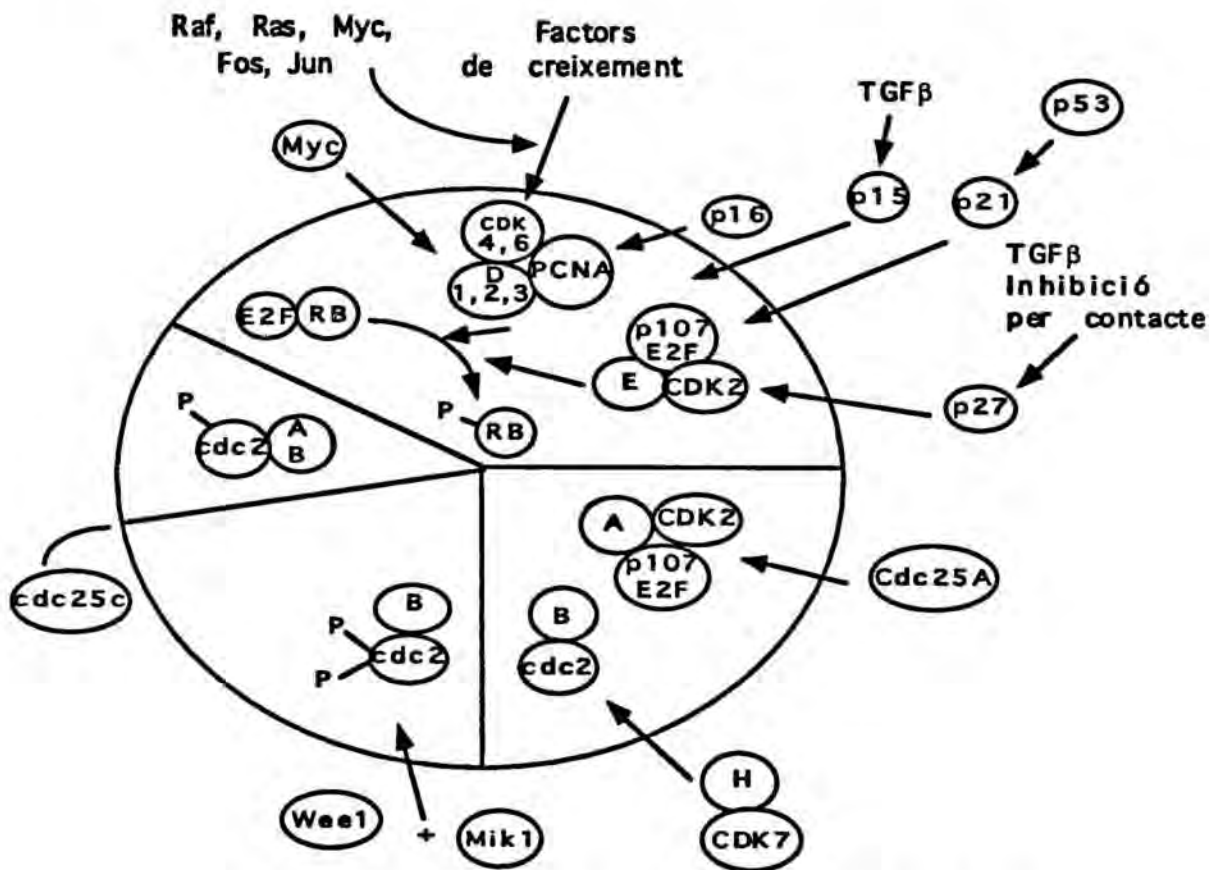
Les ciclines de tipus D són fonamentals per a la regulació del cicle cel·lular de la proteïna supressora de tumors Retinoblastoma (RB). RB es troba hipofosforilat al llarg de la fase G1, es fosforila just abans de la fase S i es manté hiperfosforilat fins al final de la mitosi. La forma hipofosforilada de RB bloqueja les cèl·lules a la fase G1 i la seva fosforilació les allibera (Hinds & Weinberg, 1994). Els complexos de les ciclines D amb les CDKs són per tant excel·lents candidats per actuar com a proteïnes quinases sobre la proteïna RB a la fase G1. RB (Kato *et al.*, 1993) i E2F-1 (Fagan *et al.*, 1994) són els únics substrats coneguts que són fosforilats pel complex ciclina D-CDK4 *in vitro*, i aquest complex actua a la majoria de llocs de fosforilació de RB que són fosforilats *in vivo* a l'interfase G1/S. S'ha proposat que el paper

fonamental de la ciclina D1 és l'inactivació de RB de manera que les cèl.lules puguin entrar en la fase S i replicar el seu DNA.

A diferència de les ciclines D, la ciclina E s'expressa de manera periòdica i es complexa amb la quinasa CDK2, que arriba a un nivell màxim d'activitat a l'interfase G1/S (Dulic *et al.*,1992; Koff *et al.*, 1992). Un cop les cèl.lules entren en la fase S, la ciclina E es degrada i la quinasa CDK2 es complexa aleshores amb la ciclina A. La ciclina E sembla ésser indispensable per a la transició G1/S a les cèl.lules de mamífers. La inhibició de la funció de la quinasa CDK2 també evita l'entrada de les cèl.lules en la fase S (Pagano *et al.*, 1993).

Tant el complex ciclina E-CDK2 com els complexos de ciclina D-CDK4 es fosforilen a nivell d'un únic residu de treonina, i aquesta modificació és necessària per a la seva activació. La responsable d'aquest procés de fosforilació és la quinasa activadora de CDK (CAK), un enzim constituït per varies subunitats (Fisher & Morgan, 1994).

A l'esquema següent es mostra la regulació del cicle cel.lular.



ESQUEMA 2. REGULACIO DEL CICLE CEL.LULAR

#### 1.4.1.2. Inhibidors dels complexos ciclina-CDK de la fase G1

Recentment s'han descobert inhibidors dels complexos ciclina-CDK a nivell de la fase G1 i que semblen exercir un important paper en la regulació de la progressió del cicle cel·lular.

Encara que les complexos binaris entre les ciclines i les CDKs tenen activitat catalítica, altres proteïnes copurifiquen amb aquest complexos aïllats a partir de cèl·lules normals (Xiong *et al.*, 1992). Una d'aquestes proteïnes és p21<sup>Cip1</sup> i la seva expressió s'indueix durant la transició de G<sub>0</sub> a G1 (Li *et al.*, 1994). p21 s'uneix als complexos ciclina D-CDK4 i ciclina E-CDK2 durant la fase G1, de manera que els complexos que només contenen una molècula p21 són catalíticament actius però els complexos amb múltiples subunitats p21 són inactius, i les modificacions en l'estequiometria de p21 són suficients per a la conversió de les formes actives en inactives i *vice versa* (Zhang *et al.*, 1994).

p21 és un inhibidor universal de les CDKs i la seva expressió gènica es troba regulada positivament per la proteïna supressora de tumors p53 (El-Deiry *et al.*, 1993). Mitjançant la inhibició de l'activitat de les CDKs a través de p21 després de l'inducció de p53 en resposta a un dany en el DNA cel·lular, s'evita la fosforilació de la proteïna RB i l'alliberació del factor de transcripció E2F (El-Deiry *et al.*, 1994).

A les cèl·lules normals, p21 es troba formant part d'un complex quaternari que inclou, a més d'una ciclina i CDK, a l'antigen nuclear de cèl·lules proliferatives (PCNA), que actua tant a nivell de la replicació del DNA com en els mecanismes de reparació i constitueix una de les subunitats de la DNA polimerasa  $\delta$ . p21 inhibeix de forma directa la replicació del DNA a través de la seva unió al PCNA, que comporta la inhibició d'aquest darrer (Waga *et al.*, 1995), però sense bloquejar la seva funció en el procés de reparació (Li *et al.*, 1995).

Un altre regulador de la progressió en G1 és p27<sup>Kip1</sup>, idèntic en un 42% a p21 a nivell de l'extrem amino-terminal, que inhibeix, en funció de la seva estequiometria, una varietat de complexos ciclina-CDK *in vitro*, i la seva sobreexpressió bloqueja la progressió a través de G1 (Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima & Hunter, 1994). Els nivells de p27 són alts en cèl·lules quiescents i disminueixen a mesura que les cèl·lules

progressen en G1 fins arribar a S (Firpo *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1994; Slingerland *et al.*, 1994). A mesura que les cèl.lules entren en el cicle, p27 s'uneix als complexos ciclina-CDK, i l'activitat CDK4 o CDK6 es manifesta quan es redueixen els nivells de p27. Si p27 s'uneix al complex ciclina D-CDK4, es promou l'activitat del complex ciclina E-CDK6, de manera que l'ordre d'activació queda correctament regulat.

També existeixen inhibidors específics per les CDK4 i CDK6, que constitueixen una família de proteïnes de 15-20 kDa amb motius repetitius d'anikrina (Serrano *et al.*, 1993). El primer membre descrit d'aquesta família és p16<sup>Ink4a</sup>, que aparentment inhibeix la CDK4 de manera competitiva a nivell de la unió de la ciclina D. Els nivells de p16 són elevats a les cèl.lules que careixen de proteïna RB funcional, el que suggereix que RB podria suprimir l'expressió de p16, que seria l'efecte recíproc a l'estimulació de l'expressió de la ciclina D deguda a RB (Parry *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994).

Un altre membre de la família del gen *ink4* és la proteïna p15<sup>Ink4b</sup>, que també actua com a inhibidor específic de les CDK4 i CDK6. p15 podria ésser el principal efector del bloqueig del cicle cel.lular en G1 en resposta al TGF- $\beta$ . S'ha observat que l'expressió de p15 s'indueix 30 vegades després del tractament amb TGF- $\beta$ , i que la seva unió a CDK4 i CDK6 augmenta fins a anular l'activitat de les quinases *in vivo* (Hannon & Beach, 1994).

#### **1.4.1.3. La fase S del cicle cel.lular**

Durant la fase S del cicle el contingut sencer de DNA del nucli s'ha de replicar de forma completa i precisa en un període de temps limitat. Aquest procés té lloc mitjançant l'inici de la replicació de forma bidireccional en llocs múltiples al llarg de cada cromosoma. La fase S inclou la replicació del DNA però també la duplicació de l'estructura complexa dels cromosomes i la seva duració varia en funció de l'especie, i en una mateixa especie, en funció de l'estat de desenvolupament.

Es considera que la quinasa dependent de ciclins CDK2 és una de les més directament involucrades en la replicació del DNA (Fang & Newport, 1991), i és activada de manera seqüencial per les ciclins de tipus E i

A. Es creu que les ciclines de tipus E actuen després de les de tipus D a nivell de l'interfase G1/S i juguen un paper important en l'inici de la replicació (Heichman & Roberts, 1994).

La ciclina de tipus A és requerida de forma continuada per a la progressió a través de la fase S, i posteriorment, a la transició G2/M (Pagano *et al.*, 1992). La ciclina A es localitza a la fase S als punts del nucli on es produeix la replicació del DNA, el que sugereix que pot participar directament en l'organització, l'activació o la regulació de les estructures replicatives (Cardoso *et al.*, 1993).

Tant la ciclina A (Devoto *et al.*, 1992) com la ciclina E interaccionen amb p107 i E2F (Lees *et al.*, 1992). La ciclina E estimula potencialment la transcripció de gens necessaris per a la fase S i que depenen del factor E2F, mentre que la ciclina A inhibeix la transcripció d'aquests mateixos gens quan es produeix l'activació del complex ciclina A-CDK2, més tard en la fase S.

La ciclina A podria tenir també un paper addicional en el procés d'apoptosi. S'ha observat que l'activitat proteïna quinasa que depèn de la ciclina A augmenta quan les cèl·lules inicien l'apoptosi (Meikrantz *et al.*, 1994) i la sobreexpressió de la ciclina A indueix l'apoptosi en presència d'un baix contingut de sèrum fetal en el medi de cultiu (Hoang *et al.*, 1994).

#### **1.4.1.4. Les fases G2/M del cicle cel·lular**

El cicle mitòtic és una via bioquímica que genera, independentment d'estímuls extracel·lulars, la progressió ordenada dels processos relacionats amb la duplicació i la divisió. La entrada en la mitosi està controlada pel factor promotor de la mitosi (MPF), constituït per la ciclina de tipus B i la proteïna quinasa Cdc2. Com la quinasa Cdc2 es troba present de forma constitutiva en el cicle, és l'acumulació i destrucció periòdiques de la ciclina B que determinen l'oscil·lació de l'activitat del MPF al llarg del cicle cel·lular.

El cicle mitòtic es pot definir mitjançant tres transicions que impliquen a la ciclina B: la ciclina B activa al MPF i s'inicia la profase. Posteriorment, el MPF activa un sistema proteolític dependent de

ubiquitina que provoca la destrucció de la ciclina B i l'inici de l'anafase. Finalment, s'atura la destrucció de la ciclina i es torna a l'inici del cicle.

#### **1.4.1.4.1. Activació del MPF**

El complex ciclina B-Cdc2 s'acumula en estat inactiu durant les fases S i G2, mitjançant la fosforilació de la Cdc2 a nivell dels residus Tyr-15 (Y15) i Thr-14 (T14) (Draetta *et al.*, 1988). La fosforilació de la quinasa Cdc2 té lloc per acció de les proteïnes quinases Wee1 i Myc1 (Featherstone & Russell, 1991; Lundgren *et al.*, 1991). Al final de la fase G2, la proteïna fosfatasa Cdc25C s'estimula i catalitza la defosforilació de Y15/T14 que resulta en l'activació de la Cdc2 (Gaultier *et al.*, 1991). A les cèl·lules normals, l'alteració del DNA a conseqüència de radiació o d'agents alquilants bloqueja la defosforilació de Y15/T14, de manera que les cèl·lules s'aturen a la fase G2 i no arriben a la mitosi. Tanmateix, en moltes línies tumorals, es produeix l'activació del complex ciclina B-Cdc2 independentment de l'estat del DNA i les cèl·lules entren en mitosi amb el seu DNA danyat (O'Connor *et al.*, 1993), el que sugereix un possible defecte en la regulació de la defosforilació de Y15/T14.

La fosfatasa Cdc25C, que catalitza la defosforilació de Cdc2, també es troba regulada mitjançant un mecanisme complex de fosforilació i defosforilació.

Per generar la forma activa del MPF, és necessària la fosforilació del residu Thr-161 de la Cdc2, que té lloc per acció de la quinasa activadora de Cdc2 (CAK) (Fesquet *et al.*, 1993), que també necessita fosforilar-se per assolir la forma activa. L'activació del MPF indueix la divisió a través de l'alteració de l'estructura i de les funcions cel·lulars mitjançant la fosforilació mitòtica (Earnshaw & Pluta, 1994).

#### **1.4.1.4.2. Inactivació del MPF**

Un cop s'ha produït la reorganització del citoesquelet i els cromosomes condensats es troben aliniats al plateau de la metafase, el MPF activa el sistema de degradació depenent de ubiquitina de les ciclines B de manera que s'indueix l'anafase i es produeix l'inactivació del MPF. Les etapes restants de la divisió cel·lular com la citoquinèsi tenen lloc amb la reversió de la fosforilació mitòtica posterior a l'inactivació del MPF.

L'extrem N-terminal de les ciclines de tipus B conté una seqüència curta conservada, anomenada caixa de destrucció, que quan es delecta o es muta, evita la degradació de les ciclines per acció del sistema proteolític específic de la mitosi. Aquesta seqüència intacta és indispensable perquè la ciclina actuï de diana per a la seva degradació a través de la via dependent de ubiquitina (Glotzer *et al.*, 1991).

La separació de les cromàtides filles depèn de l'activació del sistema proteolític dependent de ubiquitina que destrueix la ciclina B. Aquests processos, a diferència d'altres fenòmens estructurals de la mitosi, són irreversibles i per tant l'activació del sistema proteolític és la última etapa de control per bloquejar la sortida de la mitosi si es produeix alguna alteració del mecanisme normal.

## **1.5. CANVIS MOLECULARS DE PROTEINES INVOLUCRADES EN LA PROGRESSIO DEL CICLE CEL·LULAR I RELACIONADES AMB EL GEN *dhfr***

### **1.5.1. LA PROTEINA RETINOBLASTOMA**

#### **1.5.1.1. Característiques de la proteïna Retinoblastoma**

El gen que codifica per a la proteïna Retinoblastoma (RB) es va identificar originalment com el *locus* genètic de predisposició al retinoblastoma o tumors a la retina. La mutació o delectió dels dos al·lels del gen es produeix a molts retinoblastomes i altres tipus de càncer en els humans, el que indica que la pèrdua de la funció de RB és un dels esdeveniments principals en la patogenèsi de moltes formes de tumors (Lee *et al.*, 1988). La reintroducció del gen *RB* normal en cèl·lules tumorals que careixen de la proteïna RB funcional és capaç de reduir el seu creixement (Huang *et al.*, 1988), i el subministrament de proteïna RB addicional, mitjançant mètodes de transfecció o microinjecció, comporta freqüentment el bloqueig de la progressió cel·lular a la fase G1 (Goodrich *et al.*, 1991; Hinds *et al.*, 1992; Qian *et al.*, 1992; Qin *et al.*, 1992). Donades aquestes característiques, el gen *RB* es considera un gen supressor de tumors, ja que la seva funció normal és la regulació negativa de la proliferació cel·lular.



El gen *RB* codifica per a una fosfoproteïna nuclear de 105-110 kDa (Friend *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1987; Fung *et al.*, 1987). L'estat de fosforilació de la proteïna RB es troba regulat en funció de les diferents fases del cicle cel.lular (Buchkovich *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1989; DeCaprio *et al.*, 1989).

Donada la localització nuclear de la proteïna RB i la seva capacitat aparent per unir-se al DNA, s'ha suggerit que RB podria trobar-se involucrat en el control transcripcional. En experiments de transfecció, s'ha observat que RB pot reprimir la transcripció del gen *c-fos* (Robbins *et al.*, 1990). RB també es troba involucrat en la repressió transcripcional dels promotor de *c-myc* i del TGF- $\beta$ 1 (Kim *et al.*, 1991). D'aquesta manera, RB intervindria en la repressió transcripcional de gens que s'expressen a l'inici de la fase G1, i es limitaria la progressió al llarg del cicle cel.lular.

#### 1.5.1.2. Regulació de RB al llarg del cicle cel.lular

La proteïna RB es fosforila de manera específica durant el cicle cel.lular (Buchkovich *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1989; DeCaprio *et al.*, 1989), de manera que la forma hipofosforilada de la proteïna es troba majoritàriament a la fase G1, i la seva forma hiperfosforilada és l'estat predominant a les fases S i G2/M. La fosforilació de RB a l'interfase G1/S és un requeriment indispensable perquè les cèl.lules entrin en la fase S, i les formes hiperfosforilades de la proteïna es mantenen fins que les cèl.lules finalitzen la mitosi. Posteriorment es produeix una defosforilació enzimàtica que torna la proteïna RB a la seva forma hipofosforilada (Ludlow *et al.*, 1993).

La quinasa dependent de ciclins *cdc2* pot fosforilar *in vitro* la proteïna RB (Hu *et al.*, 1992), encara que també participen altres quinases en el procés de fosforilació perquè *cdc2* no actua a nivell de l'interfase G1/S, on es produeix la fosforilació inicial de RB. S'ha descrit que la proteïna RB pot interaccionar amb les ciclins D que actuen a la fase G1 (Ewen *et al.*, 1993). Les ciclins de tipus D s'associen amb la quinasa dependent de ciclins CDK4, i el complex resultant és capaç de fosforilar la proteïna RB *in vitro* (Matsushime *et al.*, 1992). Els complexos ciclina D-CDK podrien estar per tant involucrats en la fosforilació de RB al final

de la fase G1, i regularien indirectament l'entrada de les cèl·lules a la fase S.

Un altre possible regulador de l'estat de fosforilació de la proteïna RB és p53, que es considera també un gen supressor de tumors. p53 provoca el bloqueig de la progressió del cicle cel·lular a nivell de la fase G1 i l'acumulació de la forma hipofosforilada de RB quan es produeix un dany en el DNA. D'aquesta manera, s'evita que les cèl·lules segueixen el procés de replicació i de mitosi, que transmetria l'alteració del DNA a les generacions posteriors. S'ha observat que les cèl·lules que presenten una alteració o una deficiència de p53, no acumulen la forma hipofosforilada de RB com a part de la resposta al dany del DNA cel·lular, i per tant no queden bloquejades en G1 (Slebos *et al.*, 1994).

Encara que existeixen molts estudis sobre el paper de la proteïna RB en la regulació del creixement cel·lular, el mecanisme mitjançant el qual RB exerceix aquesta regulació és àmpliament desconegut. Una de les hipòtesis és, per analogia amb les oncoproteïnes virals, que la proteïna RB interacciona amb varies proteïnes cel·lulars i regula el creixement cel·lular a través d'aquests complexos.

### **1.5.1.3. Complexos de RB amb altres proteïnes**

La proteïna RB és capaç d'unirse a proteïnes d'origen viral provinents de l'adenovirus E1A, l'antigen T del virus SV40 i el papilomavirus E7 humà (DeCaprio *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989), i s'ha descrit que les regions de les proteïnes virals necessàries per unir-se a RB també són essencials en el procés de transformació (Green, 1989). Aquesta característica suporta la teoria que l'inactivació de RB es troba involucrada en la transformació tumoral.

L'antigen T llarg del virus SV40 es complexa exclusivament amb la forma hipofosforilada de RB (Ludlow *et al.*, 1989), el que suggereix que la forma activa com a supressor és la forma hipofosforilada.

Altres proteïnes cel·lulars també poden unir-se a la forma hipofosforilada de RB, i els complexos resultants poden ésser dissociats per les oncoproteïnes virals (Nevins, 1992). Fins a l'actualitat, s'han pogut caracteritzar varies de les proteïnes cel·lulars

que interaccionen amb RB: Rb1 i Rb2 (DeFeo-Jones *et al.*, 1991), una proteïna de 46 kD (Huang *et al.*, 1991), c-Myc i N-myc (Rutsgli *et al.*, 1991), ATF-2 (Kim *et al.*, 1992), la quinasa cdc2 (Hu *et al.*, 1992), fosfatasa de tipus I (Durfee *et al.*, 1993), factors miogènics (Gu *et al.*, 1993), ciclins de tipus D (Dowdy *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1993; Matsushime *et al.*, 1992), RbAp48 (Qian *et al.*, 1993) i el factor de transcripció E2F-1 (Helin *et al.*, 1992; Kaelin *et al.*, 1992; Shan *et al.*, 1992).

De tots aquests complexos de la proteïna RB amb proteïnes cel·lulars, el més ben caracteritzat és el que involucra al factor de transcripció E2F, i actualment està ben establert que part de l'activitat antiproliferativa de RB es troba mitjançada per la seva interacció amb E2F.

## **1.5.2. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ E2F**

### **1.5.2.1. Característiques del factor E2F**

El factor de transcripció E2F va ésser originalment identificat com una proteïna cel·lular d'unió al DNA, capaç de reconèixer la seqüència TTTCGCGC al promotor de l'adenovirus E2 (Kovesdi *et al.*, 1986).

Posteriorment, s'han descobert seqüències potencials de reconeixement per al factor de transcripció E2F, que segueixen el consens TTT(G/C)(G/C)CG(G/C), als promotors de diferents gens que codifiquen per a proteïnes involucrades en la proliferació cel·lular, com són la dihidrofolat reductasa, la DNA polimerasa  $\alpha$ , la timidina quinasa, la timidilat sintasa, c-myc, c-myb, la ciclina A, la quinasa cdc2, i RB (Nevins, 1992, Helin & Harlow, 1993). Molts d'aquests gens són necessaris per a la síntesi del DNA i s'activen al final de la fase G1. Aquesta activació en el cas de la dihidrofolat reductasa i la quinasa cdc2 és depenent de les seqüències de reconeixement de E2F (Blake & Azizkhan, 1989; Means *et al.*, 1992; Dalton, 1992).

Actualment es coneixen diferents membres que pertanyen a la família de factors de transcripció E2F, encara que el factor E2F-1 compleix les característiques generals descrites per E2F (Lees *et al.*, 1993). S'ha observat que la sobreexpressió de E2F-1 en cèl·lules en estat quiescent induïx la seva entrada en la fase S (Johnson *et al.*, 1993),

comportament que es relaciona amb la capacitat de E2F, conjuntament amb RB, per regular els gens implicats en la progressió a nivell de l'interfase G1/S.

#### 1.5.2.2. Regulació d'E2F

L'activació transcripcional mitjançada pel factor E2F és inhibida per interacció directa amb la proteïna RB (Hiebert *et al.*, 1992), i aquesta unió segueix un patró depenent de les diferents fases del cicle cel·lular. E2F s'uneix exclusivament a la forma hipofosforilada de RB a nivell de la fase G1 (Chellappan *et al.*, 1991; Chittenden *et al.*, 1991), i aquest complex pot ésser dissociat de manera específica per la proteïna E1A d'origen viral (Bagchi *et al.*, 1990; Chellapan *et al.*, 1991; Bandara & La Thangue, 1991). La unió entre RB i E2F-1 es produeix a nivell de l'extrem carboxi-terminal de E2F-1, on es localitza el seu domini de transactivació (Flemington *et al.*, 1993; Hagemeyer *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993). A mesura que les cèl·lules superen l'interfase G1/S, es produeix la fosforilació de RB i apareix la forma lliure de E2F, que pot aleshores actuar com a activador transcripcional. A través d'aquest mecanisme, E2F pot controlar l'expressió de gens necessaris per a la proliferació, i RB pot inhibir la proliferació mitjançant la inhibició de l'activitat de E2F. Quan les condicions de l'entorn són favorables, RB adopta la seva forma hiperfosforilada al final de la fase G1, de manera que no hi hagin noves interaccions amb E2F, i es produeix l'acumulació de la forma transcripcionalment activa de E2F.

El factor de transcripció E2F també forma part d'altres complexos cel·lulars en els que intervien la proteïna p107 i diferents ciclines i quinases depenents de ciclines. p107 és una proteïna estructuralment relacionada amb RB, que pot unir-se a E1A i a l'antigen T llarg del virus SV40 (Harlow *et al.*, 1986; Ewen *et al.*, 1989; Dyson *et al.*, 1989) i que també pot unir-se de manera específica a les mateixes proteïnes cel·lulars que RB (Kaelin *et al.*, 1991; Ewen *et al.*, 1992). A nivell de la fase S del cicle cel·lular, E2F es troba complexat amb p107, la ciclina A i la CDK2. Aquest complex es troba restringit a la fase S, té activitat quinasa H1 i pot unir-se a seqüències específiques del DNA (Shirodkar *et al.*, 1992; Devoto *et al.*, 1992). També s'ha descrit l'existència d'un tercer complex en el que participa E2F, conjuntament amb p107, la

ciclina E i la CDK2. Aquest complex es forma a la fase G1 i desapareix a mesura que les cèl·lules entren en la fase S del cicle (Lees *et al.*, 1992).

El factor de transcripció E2F-1 també es troba regulat mitjançant un mecanisme de fosforilació (Fagan *et al.*, 1994), segons el qual la forma defosforilada de E2F-1 s'uneix apropiadament a la proteïna RB, i la fosforilació, al final de la fase G1, de dos residus de serina inhibeix la interacció de E2F-1 amb RB però facilita la seva unió a la proteïna E4 d'origen viral.

### **1.5.3. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ Sp1**

#### **1.5.3.1. Característiques del factor Sp1**

El factor de transcripció Sp1 es va aïllar originalment a partir de cèl·lules HeLa en base a la seva capacitat per activar el promotor del virus SV40 (Dyanan & Tjian, 1983). Posteriorment, es va demostrar que Sp1 reconeix i s'uneix de manera específica a una seqüència de 10 nucleòtids, rica en GC, que es troba repetida 6 vegades en el promotor del virus SV40 (Dyanan & Tjian, 1983). A partir de l'estudi de les seqüències de diferents promotors que responien al factor Sp1, es va establir un consensu d'unió per al factor Sp1, que correspon a l'hexanucleòtid GGGCGG. Aquesta seqüència, malgrat la seva assimetria, és funcional en qualsevol orientació (Kadonaga *et al.*, 1986). Els promotors que responen al factor Sp1 sovint contenen múltiples llocs d'unió per a aquest factor a la seva seqüència, encara que el lloc d'unió més important és normalment el més pròxim a l'inici de la transcripció (Kadonaga *et al.*, 1987).

El factor de transcripció Sp1 és una proteïna de 95-105 kDa (Briggs *et al.*, 1986), que conté tres estructures en dits de zinc. L'activitat d'unió específica al DNA de Sp1 depèn de la presència de  $Zn^{2+}$  (Kadonaga *et al.*, 1987) i es localitza als 168 residus finals d'aminoàcids de l'extrem carboxi terminal. Mitjançant assaigs de transfecció amb diferents mutants de Sp1, es va establir que existien 4 regions importants per l'activació transcripcional, i les dues zones més actives es caracteritzen per l'abundància de residus de Glutamina (Courey & Tjian, 1988). També s'ha descrit que la delecció progressiva de l'extrem amino terminal afecta inicialment a la unió d'alta afinitat i

posteriorment, a l'activitat transcripcional de Sp1. Tanmateix, la capacitat d'unió específica de seqüència no es veu alterada ja que només requereix la presència dels motius en dits de zinc (Kadonaga *et al.*, 1988).

### **1.5.3.2. Regulació de Sp1**

#### **1.5.3.2.1. Coactivadors**

Existeixen diferents tipus de mecanismes que participen en la regulació de l'activitat del factor de transcripció Sp1. S'ha descrit l'existència de coactivadors en el procés d'activació transcripcional mitjançada per Sp1. Aquests coactivadors, encara no identificats, es troben a les fraccions parcialment purificades del TFIID, un factor de transcripció general que s'uneix a les caixes TATA (Pugh & Tjian, 1990).

#### **1.5.3.2.2. Formació de multímers**

Un altre mecanisme que regula l'activitat de Sp1 és la formació de multímers que tenen acció sinèrgica (Pascal & Tjian, 1991). Una primera molècula de Sp1 es lliga al DNA i posteriorment, per interaccions directes proteïna-proteïna que no suposen noves unions amb el DNA, es formen complexos d'ordre superior. L'activació sinèrgica es produeix en els promotors que presenten varies seqüències d'unió per Sp1 i també comporta la formació de multímers. S'ha observat que multímers lligats a seqüències diferents d'unió per Sp1 poden interaccionar entre ells per formar una interfase protèica que incrementa de manera sinèrgica l'activació transcripcional mitjançada per Sp1.

#### **1.5.3.2.3. Mecanismes de fosforilació**

El factor de transcripció Sp1 es troba també regulat a través d'un mecanisme de fosforilació progressiva a mesura que la proteïna s'uneix a les caixes GC del DNA, i en el que intervé una quinasa depenent de DNA (Jackson *et al.*, 1990). Aquest procés de fosforilació és el responsable de l'existència de les dues espècies polipeptídiques de 95 i 105 kDa que corresponen a Sp1 i que representen estats de fosforilació diferents de la mateixa proteïna. La fosforilació de Sp1 no afecta la seva afinitat ni especificitat d'unió a les caixes GC, ni s'ha observat que tingui efecte

en activar la transcripció. Tanmateix, seria factible que la fosforilació de Sp1 jugués un paper en la transcripció ja que la regió fosforilada correspon a la fracció de la molècula que conté els dos dominis d'activació transcripcional més potents. La fosforilació podria provocar un canvi conformacional de la molècula de manera que presentés o regulés la funció de les regions activadores riques en glutamines.

#### **1.5.3.2.4. Interaccions amb altres proteïnes cel·lulars**

La regulació del factor de transcripció Sp1 també comporta la participació d'altres proteïnes cel·lulars, concretament els productes dels gens supressors de tumors RB i p53. La proteïna RB és capaç de regular la transcripció dels promotors dels gens *c-fos*, *c-myc* i TGF- $\beta$ 1, que contenen una seqüència comú, GCCACCC, anomenada element de control de RB (RCE). S'ha observat que el factor que interacciona amb les seqüències RCE d'aquests promotors, i anomenat inicialment RCF-1, és en realitat el factor de transcripció Sp1 (Kim *et al.*, 1992). D'aquesta manera RB regula positivament l'activitat transcripcional mitjançada pel factor de transcripció específic Sp1. En la mateixa direcció Udvadia *et al.* (1993) demostren que Sp1 s'uneix als promotors dels gens *c-fos*, *c-myc* i TGF- $\beta$ 1 a nivell de les seqüències RCE *in vitro* i estimula la seva transcripció *in vivo*. L'activació de la transcripció mitjançada per Sp1 s'afavoreix amb la coexpressió transitoria de RB tant amb els promotors anteriors com amb el promotor del gen *dhfr*. La cotransfecció de RB amb Sp1 provoca un increment significatiu de la transcripció del gen *dhfr*, i de manera independent de la presència de llocs d'unió per E2F a la seqüència del promotor. També s'ha descrit que l'activació del promotor del gen *c-jun* a través de Sp1 s'incrementa amb l'expressió transitoria de RB (Chen *et al.*, 1994). Aquest estudi sugereix que l'estímul que RB exerceix sobre la transactivació mitjançada per Sp1 és degut al fet que RB allibera Sp1 d'un inhibidor de la seva activitat i no a una interacció directa entre RB i Sp1.

p53, la proteïna codificada per un altre gen supressor de tumors, també és capaç d'interaccionar amb el factor de transcripció Sp1. S'ha descrit la formació d'heterocomplexes entre Sp1 i p53 que afavoreixen la unió de Sp1 a les seves seqüències de reconeixement al DNA (Borellini & Glazer, 1993).

La transcripció mitjançada per Sp1 pot ésser estimulada per RB, que és el principal responsable de la regulació de la progressió al llarg del cicle cel.lular. Tanmateix, i fins a l'actualitat, els estudis realitzats sobre la unió de Sp1 a diferents promotors de gens que s'activen a l'interfase G1/S, com són el de la timidina quinasa o el de la dihidrofolat reductasa, estableixen que Sp1 té un paper constitutiu en el cicle cel.lular (Dou *et al.*, 1991; Slansky *et al.*, 1993). L'activació de la transcripció d'aquests gens a l'interfase G1/S és deguda segons aquests autors a altres proteïnes o factors de transcripció.

## **1.6. MECANISMES DE RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA**

Un dels greus problemes de la quimioteràpia anticancerosa és l'aparició de resistència al tractament. Aquesta resistència pot ésser deguda a 4 tipus de mecanismes:

- Mutacions que provoquen la reducció del transport de la droga cap a l'interior de les cèl.lules.
- Mutacions que afecten al gen que codifica per a l'enzim que constitueix la diana d'atac del tractament, de manera que la forma mutada de l'enzim és menys sensible a l'inhibició per part de la droga.
- Expressió del fenotipus MDR (multidrug resistance) que comporta la sobreexpressió de la P-glicoproteïna, que actúa com a bomba expulsora de la droga cap a l'exterior de la cèl.lula.
- Amplificació gènica del *locus* que codifica per a l'enzim diana d'atac del tractament, de manera que s'incrementen el número de còpies del gen per cèl.lula. A conseqüència de l'amplificació gènica, es produeix un increment en els nivells de l'enzim diana a les cèl.lules resistents, encara que l'increment en la quantitat de proteïna no és proporcional al número de còpies amplificades.

Mitjançant aquests diferents mecanismes, algunes cèl.lules de la població inicialment sotmesa a la droga es fan resistents al tractament, i és necessari augmentar la dosi de la droga per mantenir la seva efectivitat. L'augment de les dosis es troba però limitat pels efectes secundaris tòxics de les drogues quimioteràpiques.



En el cas del metotrexat (MTX), una droga quimioteràpica que actúa com a inhibidor competitiu de l'enzim dihidrofolat reductasa (DHFR), l'aparició de resistència en cèl.lules en cultiu pot ésser deguda a tres dels mecanismes anteriorment mencionats, en funció del tipus de selecció aplicada. Quan les cèl.lules es sotmeten a una elevada concentració de MTX en una única etapa de selecció, les cèl.lules resistents que emergeixen posteriorment, expressen nivells normals d'una forma alterada de l'enzim DHFR, amb una constant de dissociació pel MTX incrementada (Flintoff *et al.*, 1976). Si les cèl.lules es sotmeten a un procés de selecció gradual que s'inicia amb concentracions relativament baixes de MTX, apareixen cèl.lules resistents amb un nivell augmentat d'enzim DHFR, que presenta la mateixa estructura que la de les cèl.lules normals (Alt *et al.*, 1976). En aquestes condicions, l'increment en els nivells d'enzim a les cèl.lules resistents és degut a l'aparició de múltiples còpies del gen que codifica per a aquest enzim (Kellems *et al.*, 1979).

Els dos mecanismes de resistència més estudiats són el de l'amplificació gènica i l'expressió del fenotipus MDR, ja que el conjunt d'aquests dos mecanismes representa la majoria dels casos de resistència que apareixen amb l'utilització de drogues quimioteràpiques.

### 1.6.1. L'AMPLIFICACIO GENICA

Els gens amplificats són sovint els responsables, en cultius de cèl.lules de mamífers, de la resistència a diferents drogues i també s'ha observat que els oncogens es troben freqüentment amplificats en els tumors avançats. En els dos casos, l'amplificació confereix a les cèl.lules afectades un avantatge selectiu respecte a les cèl.lules normals.

Existeixen varios casos descrits de gens amplificats, a més del gen *dhfr*, en cèl.lules somàtiques de mamífers, com són els gens que codifiquen per CAD (Wahl *et al.*, 1979), la metalotioneína (Beach & Palmiter, 1981), l'HGPRT (Brennard *et al.*, 1982), la hidroximetilglutaril CoA reductasa (Chin *et al.*, 1982), l'adenosina deaminasa (Yeung *et al.*, 1983), la glutamina sintetasa (Young & Ringold,

1983), la ornitina descarboxilasa (McConlogue *et al.*, 1984) i la UMP sintetasa (Kanalas & Suttle, 1984). La selecció gradual acompanyada d'una sobreproducció de l'enzim que són característiques del procés d'amplificació, també s'han descrit per als gens de la ribonucleòtid reductasa (Lewis & Srinivasan, 1983), de la timidilat sintasa (Rossana *et al.*, 1982) i de l'asparragina sintetasa (Andrulis & Siminovitch, 1982), encara que en aquests estudis no s'ha procedit a la confirmació de l'amplificació mitjançant la quantificació del número de còpies dels gens involucrats.

#### **1.6.1.1. Característiques de la resistència per amplificació**

Les propietats generals que caracteritzen l'amplificació gènica serien les següents:

- Selecció en varies etapes: l'amplificació gènica s'obté generalment amb seleccions progressives amb concentracions gradualment creixents de la droga, i un elevat grau d'amplificació s'assoleix després de múltiples etapes de selecció. L'amplificació s'observa de manera característica quan les cèl.lules es troben sotmeses a condicions de creixement restrictives, com són l'utilització d'un medi selectiu que no conté els productes finals de l'activitat DHFR, en el cas de la selecció amb MTX.
- La resistència és el resultat de la sobreproducció de l'enzim diana: en el cas del MTX, les cèl.lules resistents amb còpies amplificades del gen *dhfr* són capaces d'assolir uns nivells suficients d'enzim lliure per sintetitzar el tetrahidrofolat necessari als processos biosintètics de la cèl.lula.
- El fenotipus resistent i l'amplificació gènica poden ésser fenòmens estables o inestables, en funció de la localització de les còpies amplificades del gen. En alguns casos, el creixement de les cèl.lules resistents en absència de la droga comporta la pèrdua de les còpies amplificades del gen. Quan l'amplificació és inestable, les còpies suplementaries del gen es localitzen en elements extracromosòmics, anomenats cromosomes de doble minut (DMs), que careixen de centròmers i es repliquen en el cicle cel.lular (Levan *et al.*, 1987; Barker *et al.*, 1980). Degut a l'absència de centròmers, els DMs es

reparteixen de forma desigual a les cèl.lules filles en el moment de la mitosi i es poden perdre sota condicions de creixement no selectives (Schimke *et al.*, 1981). Les còpies amplificades estables es localitzen als cromosomes i constitueixen estructures anomenades regions de tinció homogènea (HSRs) (Biedler & Spengler, 1976; Nunberg *et al.*, 1978; Dolnick *et al.*, 1979).

La majoria de cèl.lules inicialment seleccionades per la seva resistència al MTX contenen còpies inestables del gen *dhfr* i posteriorment, mitjançant el manteniment de la selecció, la població emergent conté còpies amplificades estables (Kaufman & Schimke, 1981).

#### **1.6.1.2. Possibles mecanismes per a l'amplificació gènica**

Existeixen quatre tipus de mecanismes possibles que podrien portar al desenvolupament de l'amplificació gènica (Alt *et al.*, 1978):

- Captació del DNA de les cèl.lules mortes que posteriorment es replica i s'integra de manera anàloga al procés de transfecció de DNA (Johnston *et al.*, 1986). També es podrien produir processos de fusió cel.lular.
- Intercanvi desigual de les cromàtides filles en el que es produeix de manera recíproca un guany i una pèrdua de gens entre les dues subunitats recombinants. El guany de gens en una de les cromàtides s'equilibra amb la pèrdua d'aquests gens a l'altre cromàtide.
- Replicació desproporcionada en la que intervenen més d'un inici de replicació en una determinada regió cromosòmica durant un mateix cicle cel.lular. Aquest darrer model no implica un fenomen recíproc de guany i pèrdua de gens.

En suport a la teoria de la sobrerreplicació, s'ha observat que la freqüència d'amplificació del gen *dhfr* es pot incrementar de manera considerable mitjançant el pretractament de les cèl.lules amb diferents tipus d'agents com la hidroxidurea (Mariani & Schimke, 1984), la llum UV (Tlsty *et al.*, 1984), carcinògens químics (Kleinberger *et al.*, 1988), hipoxia (Rice *et al.*, 1985), raigs X (Lucke-Huhle & Herrlich, 1987) i inhibidors de la síntesi de DNA (Johnston *et al.*, 1986). Aquests

tractaments es caracteritzen per generar una subpoblació de cèl·lules amb un contingut de DNA superior a  $4n$  abans de la mitosi, i a partir d'aquesta subpoblació emergeixen les cèl·lules amb una freqüència incrementada d'amplificació gènica (Hill & Schimke, 1985; Johnston *et al.*, 1986; Rice *et al.*, 1986; Hoy *et al.*, 1987).

- Increment de la transcripció de gens que codifiquen per la diana d'atac de la droga que puguin originar, finalment, estructures amplificades. De fet, s'ha observat que els gens transcripcionalment actius són millors substrats per a la recombinació (Stewart & Roeder, 1989) i la reparació del DNA (Mellon *et al.*, 1987), i per tant poden servir com a punt de partida pel procés d'amplificació gènica (Eastman *et al.*, 1991).

### 1.6.1.3. Estructura dels gens amplificats

Mitjançant tècniques de "chromosome walking" i d'anàlisi de fragments de restricció, s'ha pogut establir que el DNA amplificat és essencialment una representació línia de la seqüència normal (Federspeil *et al.*, 1984; Giulotto *et al.*, 1986; Van der Bliëk *et al.*, 1986; Looney & Hamlin, 1987). Tots aquests estudis coincideixen en el fet que les estructures amplificades, o amplicons, analitzats tenen un tamany molt superior al del gen que codifica pel producte subjecte a la selecció. Els tamany dels amplicons, dins d'una mateixa línia cel·lular resistent, poden oscil·lar entre varios centenars fins a 10.000 kb.

En el cas del gen *dhfr*, les còpies amplificades poden presentar dos tipus d'estructures:

- Amplicons de tipus I, amb un tamany de 260 kb i una organització cap-cua.
- Amplicons de tipus II, amb un tamany de 220 kb i que podrien ésser versions truncades dels amplicons de tipus I. Aquest tipus és el més abundant i la seva organització és tant cap-cap com cua-cua (Looney & Hamlin, 1987).

## **1.6.2. EL FENOTIPUS MDR**

### **1.6.2.1. Característiques del fenotipus MDR**

El fenotipus MDR, o multidrug resistance, es manifesta en cèl·lules tumorals després de l'exposició a una droga d'origen natural, i es caracteritza principalment per una menor acumulació intracel·lular de la droga, que sovint s'acompanya amb la sobreexpressió d'una glicoproteïna de membrana. Aquesta glicoproteïna amb un pes de 170 kDa i anomenada P-glicoproteïna, actua com una bomba expulsora de la droga (Bradley *et al.*, 1989; Endicott & Ling, 1989). Encara que les cèl·lules adquireixen el fenotipus resistent a conseqüència de la selecció amb un únic agent citotòxic, manifesten posteriorment una resistència creuada amb una gran varietat de drogues quimioteràpiques que no es troben relacionades ni a nivell estructural ni funcional.

Les drogues més freqüentment involucrades en l'adquisició del fenotipus MDR són alcaloides o antibiòtics obtinguts a partir de plantes o de fongs, com els alcaloides de la Vinca, les antraciclines, les epipodofilotoxines i la dactinomicina (Baker & Ling, 1978; Biedler & Peterson, 1981). També s'han observat fenòmens de resistència creuada amb agents alquilants com el melfalan, les mostasses nitrogenades i la mitomicina C, però de forma ocasional.

La sobreexpressió de la P-glicoproteïna s'ha observat tant en cultius cel·lulars (Ling *et al.*, 1983; Peterson *et al.*, 1983), com en cèl·lules obtingudes de pacients que manifestaven resistència al tractament quimioteràpic (Bell *et al.*, 1985; Bourhis *et al.*, 1989; Rutledge *et al.*, 1990).

### **1.6.2.2. Característiques de la P-glicoproteïna**

La P-glicoproteïna de 170 kDa característica del fenotipus MDR, és en realitat una família de proteïnes molt homogènea, codificades per una família de gens *mdr* (Ng *et al.*, 1989). L'aparició del fenotipus MDR i per tant la sobreexpressió de la P-glicoproteïna es troba sovint associada amb l'amplificació dels gens *mdr* (Van der Bliek *et al.*, 1986).

La P-glicoproteïna pot ésser fosforilada, i s'ha descrit que el seu grau de fosforilació augmenta amb el tractament amb agents que bloquegen els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  i amb ésters de forbol (Hamada *et al.*, 1987). S'ha observat que a mesura que s'incrementa la fosforilació de la P-glicoproteïna per acció dels bloquejadors de canals de  $\text{Ca}^{2+}$ , es produeix paral·lelament un augment de l'acumulació intracel·lular de la droga (Center, 1985). Aquesta característica dels bloquejadors dels canals de  $\text{Ca}^{2+}$  o antagonistes del  $\text{Ca}^{2+}$  permet el restabliment de la sensibilitat cel·lular a les drogues i la reversió del fenotipus MDR (Tsuruo *et al.*, 1981; 1982; 1983).

### **1.6.2.3. Implicació de la proteïna quinasa C en el fenotipus MDR**

S'ha descrit que l'expressió del fenotipus MDR s'acompanya de canvis en l'activitat de la proteïna quinasa C (PKC), i diferents línies cel·lulars resistents per MDR presenten elevats nivells d'activitat PKC (Ito *et al.*, 1987; Fine *et al.*, 1988; Aquino *et al.*, 1988). També s'ha observat la modulació del fenotipus resistent amb l'utilització d'agents que modifiquen l'activitat de la PKC, com són el TPA, que inicialment l'activa i posteriorment, amb una exposició llarga, provoca la degradació de l'enzim, i inhibidors de la PKC com l'H-7 (Ferguson & Cheng, 1987; Kessel, 1987; Fine *et al.*, 1988; O'Brian *et al.*, 1989) i l'estaurosporina (Ma *et al.*, 1991).

L'activació de la PKC *in vivo* comporta la fosforilació de la P-glicoproteïna i la reducció de l'acumulació intracel·lular de la droga (Hamada *et al.*, 1987), mentre que la seva inhibició pot revertir parcialment el fenotipus MDR (Chambers *et al.*, 1990). S'ha descrit una correlació entre el fenotipus MDR i canvis selectius en l'expressió dels diferents isoenzims de la PKC, segons els quals es produeix un increment en l'activitat PKC depenent de  $\text{Ca}^{2+}$  a conseqüència de l'augment de l'expressió de la PKC  $\alpha$  i paral·lelament, es redueix l'activitat independent de  $\text{Ca}^{2+}$  deguda a una reducció específica de l'expressió de les isoformes  $\delta$  i  $\epsilon$  (Blobe *et al.*, 1993).

#### **1.6.2.4. Possibles mecanismes addicionals d'adquisició del fenotipus MDR**

Una característica comuna del fenotipus MDR és la reducció neta de l'acumulació intracel·lular de les drogues com a conseqüència d'un increment en l'expulsió i de la sobreexpressió de la P-glicoproteïna associada a la membrana. Tanmateix, existeixen evidències de la participació d'altres mecanismes en el desenvolupament d'aquest tipus de resistència, en els que intervenen altres proteïnes cel·lulars.

A diferents línies cel·lulars que presenten el fenotipus MDR, s'ha detectat la sobreexpressió de proteïnes de membrana, diferents de la P-glicoproteïna, amb tamanyos variables entre 300 i 85 kDa, i alteracions en el receptor del factor de creixement epidèrmic. Encara que les modificacions a les línies MDR afecten bàsicament a proteïnes de membrana, també s'han observat alteracions en proteïnes citosòliques i nuclears (McClellan & Hill, 1992):

- Sobreexpressió de la sorcina.

La sorcina és una proteïna citosòlica de 22 kDa amb un punt isoelèctric de 5.7, i la seva sobreexpressió es troba normalment associada a processos d'amplificació gènica. La sorcina és una proteïna d'unió específica al  $Ca^{2+}$ , amb una elevada afinitat per aquest catió i la seva activació pot estar mitjançada pel AMPc.

- Alteració de les glutatión-S-transferases (GST).

Les GST són enzims citoplasmàtics que actuen com a detoxificadors mitjançant la conjugació del xenobiòtic o l'agent quimioteràpic amb el glutatión. Existeixen diferents isoenzims de les GST,  $\alpha$  i  $\epsilon$  són isoenzims bàsics,  $\mu$  és un isoenzim neutre i  $\pi$  i  $\rho$  són isoenzims àcids.

S'han descrit línies MDR amb un increment en l'activitat GST per sobreexpressió de la forma aniònica  $\pi$ .

- Alteració de la tubulina.

S'ha observat l'expressió de formes mutants de la subunitat  $\beta$  de la tubulina, que no permeten la unió de les drogues quimioteràpiques antimitòtiques que actuen a aquest nivell.

- Alteracions de la topoisomerasa II.

La topoisomerasa II es pot veure afectada per modificacions tant qualitatives com quantitatives en el fenotipus MDR, de manera que la seva sensibilitat a les drogues quedi reduïda.

- Pèrdua del receptor d'estrògens que s'acompanya de una reducció en l'expressió del citocrom P-450.

El desenvolupament del fenotipus MDR es troba per tant associat amb modificacions de moltes proteïnes cel·lulars i de les respostes cel·lulars normals, de manera que s'altera el comportament en front dels agents citotòxics.



## **2. MATERIALS I METODEDES**

## 2.1. LÍNIES CEL·LULARS

Tots els experiments es van realitzar amb cèl·lules CHO (Chinese Hamster Ovary), bàsicament amb la línia K1, la línia original que conté dues còpies del gen *dihidrofolat reductasa* (*dhfr*).

Altres línies cel·lulars emprades en aquest treball van ésser les DG44, UA21 i MK42. Totes elles deriven de la línia K1 per diferents mutacions. Així la línia DG44 és mutant per delecció del locus *dhfr* (Urlaub *et al.* 1986), la línia UA21 només conserva un dels al·lels (Urlaub *et al.* 1983) i la MK42 és una línia amplificada amb múltiples còpies del gen *dhfr* (Nunberg *et al.* 1978). Totes aquestes línies tenen un període de divisió d'aproximadament 15 hores.

## 2.2. MEDI DE CULTIU

Com a medi de creixement de les línies cel·lulars es va utilitzar rutinàriament medi Ham's F12 (GIBCO) amb 100 U/ml de penicil·lina G i 100 µg/ml d'estreptomicina, suplementat amb sèrum fetal al 7% (v/v) (GIBCO). Quan les cèl·lules arribaven a confluència, es procedia a la tripsinització del cultiu mitjançant el tractament amb tripsina al 0.05% (SIGMA) en PBS i es re-semblaven a densitats subconfluents.

En els experiments que comportaven una selecció de les colònies resistents al metotrexat, s'utilitzava medi selectiu Ham's F12 que no conté glicina, hipoxantina ni timidina (-GHT, GIBCO) suplementat amb un 5% de sèrum dialitzat (v/v). La diàlisi del sèrum tenia com a objecte eliminar els compostos de baix pes molecular i es realitzava en PBS a 4 °C durant tres dies amb canvi del mateix cada 12 hores.

La concentració de metotrexat (MTX) emprada en la selecció amb la línia K1 era de  $3 \times 10^{-7}$  M. Aquesta concentració permetia la formació de colònies resistents amb una freqüència aproximada de  $10^{-5}$  respecte al número de cèl·lules presents a l'inici de la selecció.

### **2.3. INCUBACIONS AMB EFECTORS**

Les solucions concentrades dels efectors es preparaven en medi de cultiu Ham's F12 o en dimetil sulfòxid (DMSO, SIGMA) en funció de la solubilitat del compost, sempre en condicions estèrils. La concentració de les solucions preparades en DMSO era tal que el percentatge de DMSO final en el medi d'incubació de les cèl.lules no superés el 1%.

Els tractaments amb efectors es realitzaven 14 hores després de sembrar 175.000 cèl.lules K1 per placa de 90 mm, o 200.000 cèl.lules per placa de 100 mm. El temps del tractament depenia de l'efector considerat i posteriorment es deixava un temps d'expressió de 15 hores previament a la selecció en presència de metotrexat. Les cèl.lules es mantenien en medi selectiu i metotrexat fins a l'aparició de colònies visibles, normalment unes 3 setmanes, amb canvis de medi cada 7 dies. Després d'aquest període de selecció, les colònies es fixaven amb formaldehid al 2%, es tenyien amb violeta de genciana al 0.5% i es comptaven. Els resultats s'expressen com a percentatges respecte al control de cèl.lules no tractades amb l'efector.

Tots els efectors assajats eren utilitzats a concentracions que no afectaven la viabilitat cel.lular.

### **2.4. ESTABLIMENT DE LES CONDICIONS DE SINCRONITZACIO**

En els experiments de sincronització es sembraven  $3 \times 10^5$  cèl.lules K1 per placa de 90 mm i es mantenien en medi Ham's F12 amb un contingut de sèrum fetal del 0.5% durant 7 dies. En aquestes condicions s'aconseguien poblacions cel.lulars amb un percentatge de sincronització entre el 80-90% de cèl.lules en fase Go. Posteriorment, s'alliberaven les cèl.lules per addició de medi fresc suplementat amb un 7% de sèrum i es recollien les cèl.lules a diferents temps, a fi d'obtenir poblacions que es trobessin a cada fase de la proliferació cel.lular.

Les cèl.lules recollides per tripsinització es congelaven a  $-80$  °C en medi complet amb un 10% de DMSO fins al moment del seu processament. Si les mostres es destinaven a l'obtenció de RNA total, les cèl.lules es recollien en 1 ml de reactiu Ultraspec (Biotechx) i es conservaven també a  $-80$  °C.

## 2.5. OBTENCIO DE NUCLIS

Les mostres corresponents a les poblacions aïllades en cada fase del cicle es descongelaven a 37 °C i es centrifugaven a 800 x g durant 5 minuts en una centrifuga GS-6R (Beckman), s'aspirava el sobrenadant i el pellet cel.lular es resuspenia en 5 ml de tampó HB amb la següent composició: NaCl 15 mM, KCl 60 mM, EDTA 0.5 mM i Tris-HCl 15 mM pH 7.4. Es repetia la centrifugació a 800 x g durant 5 minuts i el sediment resultant es resuspenia en 5 ml de tampó HB amb 0.1% de tritó X-100. Les mostres es centrifugaven a 1.000 x g durant 10 minuts i el sediment nuclear obtingut es rentava amb 5 ml de tampó HB. Es tornava a centrifugar a 1.000 x g durant 10 minuts i el sediment final es resuspenia en 1 ml de tampó HB per cada  $10^6$  nuclis.

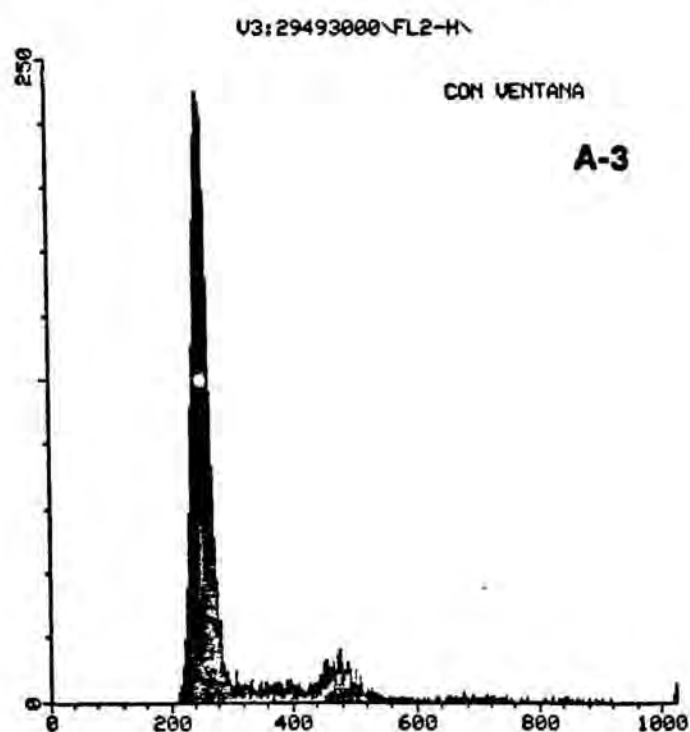
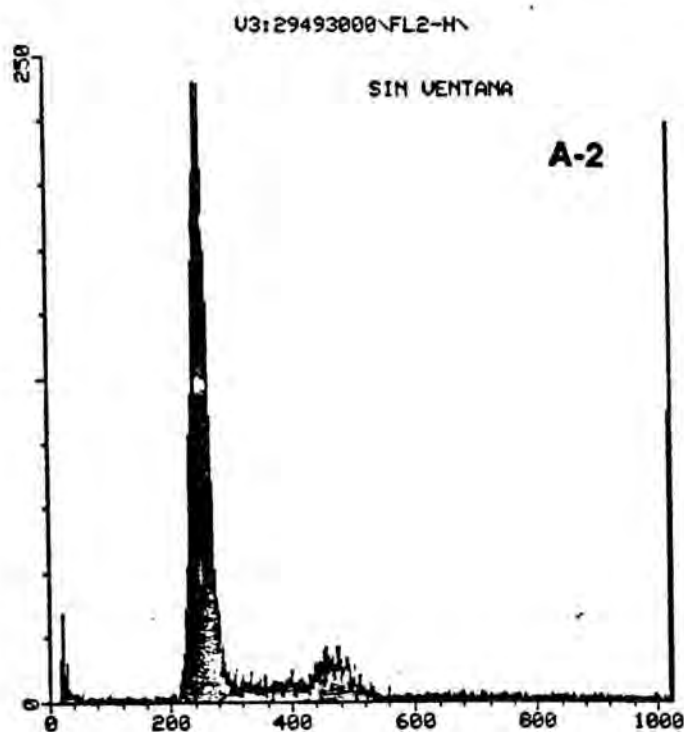
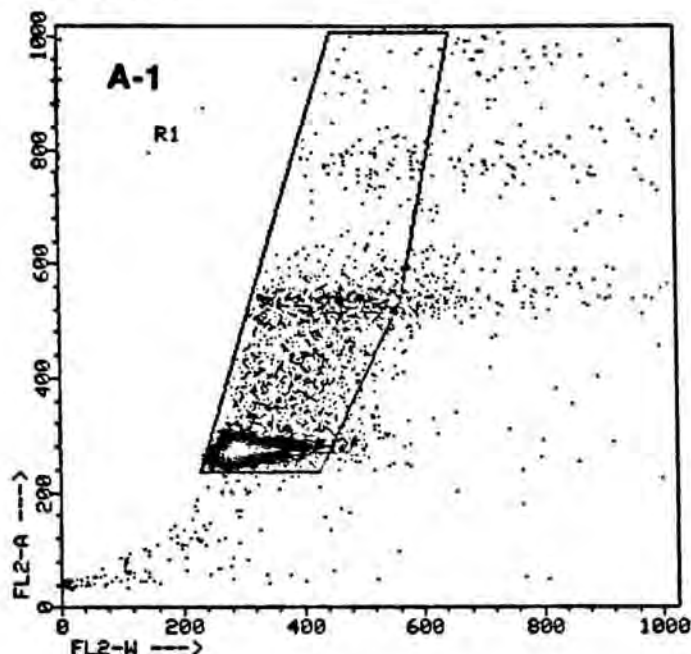
## 2.6. ASSAIG DE CITOMETRIA

L'anàlisi de la sincronització es realitzava mitjançant citometria de flux, que relaciona el contingut de DNA als nuclis cel.lulars amb les diferents fases del cicle cel.lular. Així un contingut de DNA equivalent a  $2n$  correspon a la fase  $G_0$ - $G_1$  i un contingut de  $4n$  correspon a les fases  $G_2$ / $M$ . Els continguts de DNA compresos entre  $2$  i  $4n$  corresponen a la fase  $S$ .

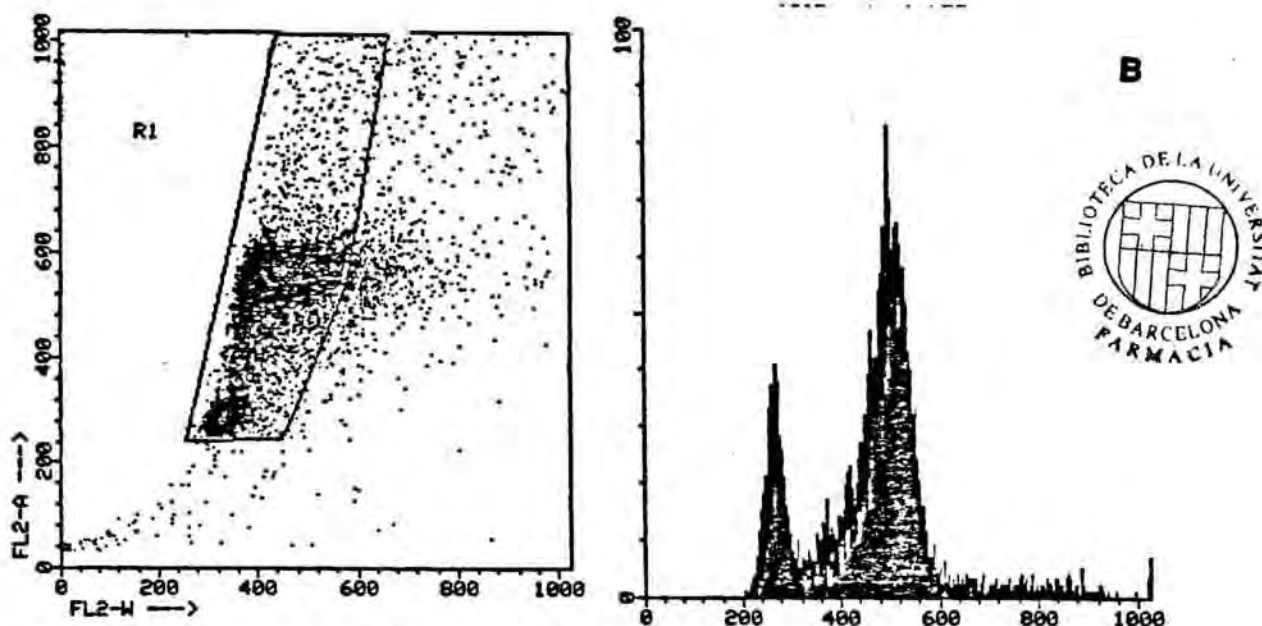
Un cop obtinguts els nuclis, s'incubava amb iodur de propidi (SIGMA) a una concentració final de  $25 \mu\text{g/ml}$  i es mantenien les mostres en gel protegides de la llum durant 15-30 minuts. L'iodur de propidi s'intercala a les molècules de DNA i emeteix fluorescència després d'excitació amb llum a una longitud d'ona de 488 nm (Krishan *et al.*, 1975). A continuació es procedia a l'anàlisi citomètrica en un aparell Becton Dickinson.

A la Fig. A-1, es presenta la relació entre el número de nuclis captats i la fluorescència corresponent al seu contingut de DNA. Es pot observar un nuvòl de nuclis amb una fluorescència al voltant del valor 250, i un altre nuvòl al voltant del valor 500, que corresponen a un contingut de DNA nuclear de  $2n$  i  $4n$ , respectivament. El baix percentatge de nuclis a la fracció  $4n$  d'aquesta mostra és degut a que les cèl.lules estaven sincronitzades a la fase  $G_0$  en un 80%.

El percentatge normal en cèl.lules en creixement exponencial és del 46% en G1, 39% en S i 15% en G2/M. Els punts observats a la Fig. A-1, per sota del nuvòl  $2n$  corresponen a debris cel.lulars, i els punts per sobre del nuvòl  $4n$  a la formació d'agregats. Aquests events es poden suprimir en el càlcul final després de definir una finestra que exclou aquests punts, per tal d'obtenir resultats més acurats. A les Fig. A-2 i A-3 es representa la distribució per àrees de la fluorescència de la població de nuclis abans i després de definir la finestra d'exclusió dels debris cel.lulars i els agregats.



A la Fig. B, es presenten diagrames homòlegs a les Fig. A-1 i A-3, però en aquest cas, obtinguts a partir d'una població de cèl.lules a la fase S del cicle cel.lular.



## 2.7. OBTENCIO D'EXTRACTES NUCLEARS

Els extractes nuclears a partir de cèl.lules CHO es van preparar d'acord amb la tècnica descrita per Dignam *et al.* 1983, amb lleugeres modificacions. El procediment seguit per a la obtenció de nuclis era el mateix que el descrit anteriorment, excepte que la resuspensió final dels nuclis es feia amb una relació de 2.5 ml de tampó per  $10^9$  nuclis. Un cop obtinguts els nuclis es procedia a l'extracció de les proteïnes nuclears amb una concentració final de KCl de 360 mM durant 30 minuts a 4 °C i amb agitació constant. En les nostres condicions i tenint en compte que partiem de  $2-4 \times 10^6$  cèl.lules, els nuclis es resuspenien en 30-40  $\mu$ l de tampó HB i una 1/10 part d'aquest volum en KCl 4 M de manera que s'assolia la concentració final de 360 mM. Finalment es realitzava una ultracentrifugació a 100.000 x g (ultracentrífuga L-70, Beckman) en rotor d'angle fixe durant 30 minuts a fi de separar la cromatina de les proteïnes nuclears. Es reservaven 5  $\mu$ l dels sobrenadants per a la determinació de la quantitat de protèina segons el mètode de Bradford, utilitzant el reactiu de BioRad, i la resta es congelava en N<sub>2</sub> líquid per després mantenir-la a -80 °C fins a la seva utilització en assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica o de Western Blot.

## 2.8. OBTENCIO DE SONDES DE DNA

Les sondes de DNA necessàries en la prova de retardació de la mobilitat electroforètica consistien en fragments del promotor del gen *dhfr*. Aquestes sondes es generaven mitjançant reaccions de P.C.R. utilitzant oligonucleòtids específics que hibridaven a la regió 5' del promotor i a la 3' a nivell de l'inici de la traducció.

La construcció p410, subclonada en el vector pUC119, conté un mutant per delecció del minigen *dhfr* que s'exten fins a 48 bp en direcció 5' de l'inici major de la transcripció del promotor (Ciudad *et al.*,1988). La sonda 410f té 150 bp i constitueix el promotor mínim del gen *dhfr* amb una seqüència proximal conservada formada per una caixa GC d'unió per Sp1, l'element CAA i una seqüència de reconeixement per E2F. També es va generar la sonda gcf, de 150 bp, obtinguda a partir de la construcció pGC per mutació puntual a la caixa GC. Per digestió del fragment 410f amb l'enzim de restricció Hpa II, es van obtenir Sp1f de 59 bp, i e2Ff, de 91 bp.

A partir de les construccions p26, p414 i p413, es van obtenir els fragments 26f de 205 bp, 414f de 144 bp i 413f de 118 bp, respectivament, segons el mateix procediment descrit per a la obtenció del fragment 410f.

Les diferents sondes es purificaven en gel de poliacrilamida al 5%, es tallaven les bandes corresponents als fragments amplificats i digerits i s'extreien de l'acrilamida en presència de TE i NaCl 0.25 M a 37 °C amb agitació durant tota la nit. Posteriorment, s'eliminava el residu de poliacrilamida i es precipitava el DNA amb etanol al 70% a -20 °C durant 2 hores. El DNA precipitat es resuspensia en un volum final de 50 µl de TE.

El marcatge radioactiu de les sondes es realitzava a partir de 100 ng de DNA amb gamma-[<sup>32</sup>P]-ATP (3.000 Ci/mmol, Amersham) per acció de l'enzim T4 polinucleòtid quinasa (BRL) en un volum de reacció de 10 µl. Posteriorment, les sondes es diluïen fins a 100 µl i es purificaven passant-les per columnes de Sephadex G-50. La radioactivitat incorporada es determinava en un comptador de centelleig LKB després d'afegir 5 ml de Biogreen (Schauriau).

## **2.9. ANALISI DE RETARDACIO DE LA MOBILITAT ELECTROFORETICA**

Les reaccions d'unió entre els extractes nuclears i les sondes marcades es realitzaven en un volum de 20  $\mu$ l, en presència de 2  $\mu$ g de poli [d(I-C)] (poli [d(I-C)]-ds, Pharmacia) com a DNA inespecífic, 5% de glicerol, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 60 mM, 2  $\mu$ g d'extracte protèic nuclear, 0.5-1 ng (20.000 cpm) de sonda de DNA i Tris-HCl 25 mM, pH 8. La sonda radioactiva s'afegia 15 minuts després de l'addició de l'extracte nuclear. Després de 30 minuts d'incubació amb la sonda radioactiva, les mostres es sotmetien a una electroforèsi en gel de poliacrilamida (5% de poliacrilamida: bis 30:1, 5% de glicerol en 0.5 X TBE (Tris borat 89 mM pH 8, EDTA 2.5 mM) durant 3-4 hores a una intensitat no superior a 20 mA i a 4 °C (Ciudad *et al.*, 1992). El gel es preparava amb antel.lació i es recorria a temperatura ambient fins a assolir un valor d'intensitat constant de 20 mA.

En el cas de la sonda e2Ff s'utilitzava com a DNA inespecífic 4  $\mu$ g de DNA de timus de vedella (Boehringer Mannheim) sonicat 3 x 20" amb una intensitat de 10 microns en un sonicador MSE, amb intervals d'1 minut entre cada pols de sonicació, tot a 4 °C, i la quantitat d'extracte nuclear en el volum de reacció era de 4  $\mu$ g.

Les bandes retardades es visualitzaven per autoradiografia utilitzant pel.lícules de RX, X-OMAT S, de Kodak.

## **2.10. ANALISI DE SUPERRETARDACIO DE LA MOBILITAT ELECTROFORETICA**

Les condicions pels assaigs de superretardació eren les mateixes que les descrites a l'apartat 9 excepte que l'incubació amb anticossos policlonals es realitzava 15 minuts després de l'addició de la sonda radioactiva. Quan s'utilitzaven anticossos monoclonals, la reacció amb els extractes nuclears tenia lloc 15 minuts abans d'afegir la sonda radioactiva. En tots els casos, l'electroforèsi es realitzava en gels de poliacrilamida al 4% a una intensitat constant de 20 mA.

Els anticossos emprats i les quantitats corresponents en els assaigs de superretardació van ésser N9 (4  $\mu$ l), un sèrum policlonal de conill



contra la proteïna humana Retinoblastoma, amablement cedit pel Dr. DeCaprio, 2892-E (1  $\mu$ l), un sèrum policlonal de conill contra la proteïna Sp1 expressada en bacteris, amablement cedit pel Dr. Jackson, i XZ77 (10  $\mu$ l), un anticòs monoclonal de rata contra RB, amablement cedit pels Dr. Harlow i Dr. Dyson. També es van utilitzar en aquest tipus d'assaig dos anticòs monoclonals de rata contra E2F, KH20 i KH95 (8  $\mu$ l), amablement cedits pels Dr. Harlow i Dr. Dyson, i un anticòs policlonal també dirigit contra aquesta proteïna (1  $\mu$ l), amablement cedit pel Dr. DeCaprio.

## 2.11. OBTENCIO DE RNA TOTAL

Per a l'obtenció del RNA total es va utilitzar el reactiu Ultraspec (Biotechx) i es va seguir el procediment detallat pel fabricant. El RNA així obtingut es va resuspendre en un volum final de 50  $\mu$ l d'aigua tractada amb dietil pirocarbonat (DEPC, Fluka). La concentració de RNA de les diferents mostres es va determinar mitjançant la mesura de la seva absorbància a 260 nm. La qualitat dels RNAs obtinguts es va visualitzar en gel d'agarosa al 1% i formaldehid al 2%, utilitzant una solució amortidora de pH a base d'àcid morfolinopropano sulfònic (Acetat sòdic 5 mM, EDTA 0.5 mM i MOPS 20 mM, pH 7.4).

## 2.12. DETERMINACIO QUANTITATIVA DE mRNA PER RT-PCR

A partir del RNA total es va realitzar la reacció de la transcriptasa inversa amb una barreja d'oligonucleòtids inespecífics (random hexamers) per obtenir així tots els cDNAs corresponents a tots els RNAs presents en cada mostra.

La reacció de síntesi de cDNA es va realitzar a partir de 1  $\mu$ g de RNA total en un volum de reacció de 20  $\mu$ l, en presència de DTT 10 mM, 125 ng de Random Hexamers (Promega), dNTPs 500  $\mu$ M (SIGMA), 20 U de RNAsin (Promega), 200 U de transcriptasa inversa M-MLV (BRL), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM i Tris-HCl 50 mM, pH 8.3 (Kessler *et al.*, 1993). La síntesi es va realitzar a 37 °C durant 60 minuts i posteriorment es van utilitzar els cDNAs obtinguts com a material de partida per a la reacció de P.C.R. en que es van utilitzar oligonucleòtids específics pel gen *dhfr*

a fi d'amplificar les seqüències corresponents al missatge madur. Tot utilitzant oligonucleòtids que hibriden a les seqüències exòniques és possible valorar l'expressió del gen de forma equivalent a l'assolida mitjançant la realització de la tècnica del Northern.

Per determinar el missatge madur es van utilitzar els següents oligonucleòtids:

5'-CGCCAAACTTGGGAAGCA-3' a nivell de l'exó 1 i

5'-AGAATAACTCATAGATCTAA-3' a nivell de l'exó 6.

Com a control per normalitzar els resultats, es va realitzar també la mateixa tècnica amb oligonucleòtids específics per a un gen constitutiu i que no varia amb el cicle cel·lular, l'*aprt* (adenina fosforribosil transferasa).

La combinació d'oligonucleòtids emprada en el cas del gen *aprt* era:

5'-ATCCGCAGTTTCCCCGACTT-3' a nivell de l'exó 1 i

5'-AGTGGTGAGGTGGTGGAGT-3' a nivell de l'exó 5.

La reacció de P.C.R. es realitzava en un volum de 50  $\mu$ l que contenia 5  $\mu$ l de cDNA, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 50 mM, dNTPs 200  $\mu$ M, alfa-[<sup>32</sup>P]-dATP 1.25  $\mu$ Ci (3.000 Ci/mmol, Amersham), 1 unitat de Taq polimerasa (BRL), 500 ng de cada oligonucleòtid i Tris-HCl 20 mM pH 8.4. Els components de la reacció es van separar en dues fases mitjançant l'utilització d'una perla de parafina sòlida amb una temperatura de fusió de 58-60 °C (Fluka). La fase inferior estava constituïda pel MgCl<sub>2</sub>, els dNTPs, els dos parells d'oligonucleòtids i l'alfa-[<sup>32</sup>P]-dATP i la meitat de la solució amortidora de pH. La fase superior estava formada per la resta de la solució amortidora, el cDNA i la Taq polimerasa. Amb aquesta metodologia s'evita que els oligonucleòtids i el cDNA entrin en contacte fins a arribar a temperatures superiors a la de fusió de la parafina, i prevenir així la possibilitat d'hibridacions inespecífiques que originen finalment fragments de DNA amplificat no correctes.

La reacció de P.C.R. consistia en una denaturalització inicial a 94 °C durant 1 minut, i 25 cicles de reacció consistents en denaturalització a 92 °C durant 1 minut, hibridació dels oligonucleòtids a 59 °C durant 1' 15" i etapa de síntesi a 72 °C durant 1' 50".

A continuació, es va procedir a la separació electroforètica de alíquotes de 5  $\mu$ l dels productes obtinguts per PCR en gels al 5% de poliacrilamida i 1 X TBE, es van visualitzar mitjançant autoradiografia i es van quantificar per anàlisi d'imatge amb el programa Bioprofil de Vilbert-Lourmat.

### 2.13. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL PER RT-PCR QUANTITATIVA

La tècnica de RT-PCR quantitativa també permet la determinació de l'activitat transcripcional quan s'utilitzen oligonucleòtids que hibriden amb seqüències no exòniques. D'aquesta manera, és possible quantificar els transcrits de hnRNA, indicatius de l'activitat transcripcional, i sintetitzats en un moment determinat de la proliferació cel·lular.

Per a aquest tipus d'anàlisi era necessari un tractament previ del RNA total amb DNAsa per eliminar les restes d'aquest substrat que podien actuar com a contaminant en la reacció de P.C.R. A partir de 10  $\mu$ g de RNA total es realitzava el tractament amb 26 U de DNAsa I lliure de RNAses (Boehringer Mannheim), en presència de MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 336 U de RNAsin i Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 en un volum final de reacció de 100  $\mu$ l (Kessler *et al.*, 1993). Després de la incubació a 37 °C durant una hora, es realitzava una extracció amb 100  $\mu$ l de Fenol-Cloroform en presència de SDS al 0.1%, i es procedia a la precipitació del RNA en etanol al 70% i acetat amònic 1M. Un cop precipitat, es resuspensia el RNA en 50  $\mu$ l d'aigua tractada amb DEPC i es determinava la seva concentració a partir de la lectura de l'absorbància a 260 nm. Posteriorment, es va procedir a la reacció de la transcriptasa inversa amb 1  $\mu$ g del RNA tractat amb DNAsa i a la de P.C.R., segons el procediment descrit per a la determinació quantitativa de mRNA. Per a la reacció de P.C.R. es van utilitzar la següent combinació d'oligonucleòtids:

5'-CGCCAAACTTGGGGGAAGCA-3' a la regió no traduïda després de l'inici de transcripció i

5'-GCCAAGTGCTCGACCCGATT-3' a l'intró 1.

Aquesta combinació donava lloc a un fragment amplificat de 205 bp.

Es van realitzar 27 cicles de reacció de P.C.R. en les mateixes condicions de temperatura i temps que les establertes per a la determinació quantitativa de mRNA. Com a control en la reacció es va utilitzar una combinació de oligonucleòtids que hibridaven a nivell de seqüències intròniques flanquejants a l'exó 1 del gen *aprt* :

5'-TCACGAGCCAGCAAGGCGTT-3' a l'intró 1 i

5'-TGCATCATGAGTAGGTCCC-3' a l'intró 2 .

Aquesta combinació donava lloc a un fragment amplificat de 400 bp.

A continuació, es van sotmetre a electroforèsi alíquotes de 5 µl dels productes obtinguts per P.C.R. en un gel al 5% de poliacrilamida i 1 X TBE a 15 V/cm durant 90 minuts. Els fragments de DNA amplificats es van visualitzar per autoradiografia utilitzant pel·lícules de RX de Kodak. La quantificació de la intensitat de les bandes radioactives es va realitzar mitjançant anàlisi d'imatge amb el programa Bioprofil de Vilbert-Lourmat. Els resultats s'expressen com la intensitat del senyal del gen *dhfr* referida a la del gen *aprt* , utilitzada com a referència.

## 2.14. ASSAIG DE WESTERN BLOT

Pels assaigs de Western Blot es van utilitzar extractes nuclears obtinguts segons el procediment descrit anteriorment (secció 2.7). La resolució de les proteïnes nuclears (20 µg) va tenir lloc mitjançant una electroforèsi basada en el sistema descrit per Laemmli (Laemmli, 1970) i que consistia en un sistema discontinu en condicions denaturants (SDS al 0.1%). El gel concentrador es va preparar amb poliacrilamida (relació acrilamida: bisacrilamida 37.5:1) al 4% i el gel separador al 7%. Com a solució amortidora de pH per l'electroforèsi s'utilitzava SDS al 0.1% i Tris-glicina (25 mM/192 mM), pH 8.3.

Les mostres dels extractes nuclears es sotmetien a electroforèsi amb una intensitat constant de 20 mA durant 3-4 hores i posteriorment es procedia a la transferència de les proteïnes a una membrana Immobilon PVDF (Millipore) utilitzant el sistema d'electrotransferència de semi-buid HEP-1 (Applied Genetechnology Systems GmbH) en un tampó Tris-glicina durant 2 hores i 30 minuts a 400 mA. Aquest procediment es

portava a terme a 4 °C i el voltatge aplicat oscil.lava entre 6 i 12 volts. Un cop efectuada la transferència, es procedia a l'assaig de revel.lat per anticossos amb el kit de quimioluminiscència BM de Boehringer Mannheim. Es va seguir el protocol detallat pel fabricant, utilitzant una dilució 1:1.500 de l'anticòs primari policlonal, anti Sp1 o anti Rb, i una dilució 1:12.000 de l'anticòs secundari lligat a peroxidasa de rabà de cavall.

Per reutilitzar les membranes, es procedia a tractar-les en una solució amortidora de pH a base de glicina 100 mM, pH 2.5 durant 20 minuts amb agitació a temperatura ambient i dos rentats amb tampó TBST de 10 minuts cadascun (NaCl 150 mM, 0.1% de Tween 20 i Tris-HCl 50 mM pH 7.5).

## **2.15. ASSAIG DE DETERMINACIO DE L'ACTIVITAT DE LA PROTEINA QUINASA C**

Els tractaments amb els diferents efectors es realitzaven a partir de  $5 \times 10^6$  cèl.lules K1 per placa de 100 mm. Posteriorment, s'efectuaven dos rentats amb PBS fred, es recullien les cèl.lules mitjançant un gratador de cèl.lules en 700  $\mu$ l de solució d'homogenització que contenia EDTA 2 mM, EGTA 0.5 mM, leupeptina 20  $\mu$ g/ml (SIGMA), aprotinina 2  $\mu$ g/ml (SIGMA), DTT 1 mM, PMSF 1 mM i Tris-HCl 20 mM pH 7.5 i es congel.laven en N<sub>2</sub> líquid mantenint-les a - 80 °C fins al moment del seu processament.

### Preparació de les solucions enzimàtiques:

Les mostres es descongel.laven ràpidament i s'homogenitzaven en un homogenitzador de vidre Potter Elvehjem. Els homogenats es passaven a tubs d'ultracentrífuga i es sotmetien a 100.000 x g a 4 °C durant 30 minuts. Els sobrenadants així obtinguts corresponien a la fracció citosòlica que es conservava en gel. Els pellets es rentaven amb 500  $\mu$ l de solució d'homogenització, es sotmetien seguidament a una nova ultracentrifugació a 100.000 x g durant 5 minuts i posteriorment es resuspenien en 100  $\mu$ l d'aquest mateix tampó + 0.1% de Nonidet-P40 per solubilitzar les membranes. Els tubs es deixaven s'agitaven en gel

durant 30 minuts i després es repetia el procés d'ultracentrifugació a 100.000 x g a 4 °C durant 30 minuts. Els sobrenadants així obtinguts corresponien a la fracció de les membranes, que també es conservava en gel fins al moment de la determinació d'activitat (30 minuts aproximadament).

L'activitat PKC es va determinar tant en la fracció citosòlica com a la de membranes mitjançant la mesura de la transferència de  $^{32}\text{P}$  del gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP (3.000 Ci/mmol, Amersham) a la Histona III-S (SIGMA).

#### Preparació dels tests d'assaig:

Les concentracions finals de la solució d'assaig per a la determinació d'activitat de les proteïnes quinases independents de calci i fosfolípids eren  $\text{Mg}(\text{AcO})_2$  10 mM, EGTA 1 mM, 24  $\mu\text{g}$  de histona com a proteïna receptora de fosfat, gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP 50  $\mu\text{M}$  (200-400 cpm/pmol) i Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. Per a la determinació de la proteïna quinasa C dependent de calci i fosfolípids, les concentracions finals de cada component a la solució d'assaig eren les mateixes que les esmentades anteriorment però suprimint l'EGTA i en presència de  $\text{CaCl}_2$  500  $\mu\text{M}$ , 0.7  $\mu\text{g}$  de diacilglicerol i 3.5  $\mu\text{g}$  de fosfatidilserina (tots dos de SIGMA).

La barreja de DAG i de PS es preparava a partir de solucions concentrades d'aquests compostos dissolts en cloroform. Aquest dissolvent s'evaporava amb corrent de  $\text{N}_2$ . A continuació s'afegia el volum de barreja de reacció (test) corresponent a la solució amortidora de pH, i es procedia a la sonicació dels fosfolípids, necessària per observar l'activació de la PKC. Les condicions de sonicació van ésser 3 x 20" amb una intensitat de 10 microns en un sonicador MSE, amb intervals d'1 min entre cada pols de sonicació, tot a 4 °C. A continuació s'afegien la resta dels components del test.

### Composició dels tests per determinar l'activitat PKC

<u>Component</u>	<u>Test -</u>	<u>Test +</u>
Mg(AcO) <sub>2</sub>	15 mM	15 mM
ATP	75 $\mu$ M	75 $\mu$ M
Histona	36 $\mu$ g	36 $\mu$ g
EGTA	1.5 mM	-
CaCl <sub>2</sub>	-	0.75 mM
DAG	-	0.7 $\mu$ g
PS	-	3.5 $\mu$ g
Tris-HCl	30 mM	30 mM
Aigua	q.s.p. 40 $\mu$ l	q.s.p. 40 $\mu$ l

Aquestes concentracions corresponen a les barreges de reacció abans d'ésser diluïdes per l'addició de la solució enzimàtica. Es preparaven quantitats suficients dels tests per portar a terme totes les determinacions experimentals necessàries.

Per a la realització de l'assaig es seguia el següent esquema operatiu: es disposaven tubs amb 40  $\mu$ l del test que es deixaven atemperar durant uns minuts en un bany a 30 °C. Tot seguit s'hi afegien, de manera seriada i cada 30", 20  $\mu$ l de les solucions enzimàtiques a valorar, citosòliques i de membranes, i les mescles es deixaven en incubació durant 4 minuts. Les reaccions s'aturaven sembrant 50  $\mu$ l de les solucions d'assaig en quadrats de paper (1x1 cm) de fosfocelelulosa Whatman P81 i submergint-los en una solució d'àcid fosfòric 75 mM a 4 °C. Es realitzaven dos rentats dels papers amb àcid fosfòric, es secaven i, després de l'addició de 5 ml de Biogreen (Schauriau), es comptava la radioactivitat incorporada en un comptador de centelleig LKB. Paral·lelament es determinava la quantitat de proteïna a les fraccions citosòliques i de membranes assajades pel mètode de Bradford amb el reactiu de BioRad. Una unitat d'activitat enzimàtica es defineix com la

quantitat d'enzim que catalitza la transferència de 1 pmol d'ATP a histona per minut a 30 °C.

## **2.16. ASSAIG DE DETERMINACIO DEL NUMERO DE COPIES DEL GEN *dhfr* MITJANÇANT PCR QUANTITATIVA**

La determinació de l'amplificació del gen *dhfr* en colònies resistents al MTX obtingudes mitjançant tractament amb diferents efectors es va realitzar utilitzant la tècnica de P.C.R. quantitativa.

Les colònies ben aïllades es van recollir mitjançant tripsina i anells de clonatge en PBS fred. Les cèl.lules es van centrifugar a 10.000 x g durant 5 minuts, es va rebutjar el sobrenadant i es van resuspendre en 20 µl de tampó de lisi que contenia NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, SDS al 0.1% i Tris-HCl 50 mM, pH 8, addicionat de 2 µl d'una solució de Proteïnasa K (Boehringer Mannheim) a 10 mg/ml. Les mostres es van incubar a 55 °C durant 15 minuts, a continuació van ésser agitades vigorosament i tornades a incubar a la mateixa temperatura durant 15 minuts més. Finalment la barreja es va bullir a 100 °C durant 5 minuts i després de deixar-la refredar, es van utilitzar 2 µl de la mescla en la reacció de P.C.R. La presència de concentracions de SDS superiors al 0.1% en el tampó de lisi inhibien la reacció de P.C.R.

La reacció de P.C.R. es realitzava en un volum de 50 µl que contenia 2 µl de la barreja de cèl.lules, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 50 mM, dNTPs 200 µM, alfa-[<sup>32</sup>P]-dATP 1.25 µCi (3000 Ci/mmol, Amersham), 1 unitat de Taq polimerasa (BRL), 500 ng de cada oligonucleòtid i Tris-HCl 20 mM pH 8.4. Els components de la reacció es van separar en dues fases mitjançant l'utilització d'una perla de parafina sòlida (temperatura de fusió 58-60 °C, Fluka). Per cada mostra, el P.C.R. dels dos gens es va realitzar en el mateix tub. La presència de la parafina sòlida permetia que els oligonucleòtids, la Taq polimerasa i la mostra de cèl.lules només entressin en contacte quan la temperatura assolía els 59 °C (temperatura d'hibridació dels oligonucleòtids). La fase inferior estava constituïda pel MgCl<sub>2</sub>, els dNTPs, el alfa-[<sup>32</sup>P]-dATP, la mostra cel.lular i la meitat de la solució amortidora de pH. La fase superior estava formada per la resta de la solució amortidora de pH, els dos parells d'oligonucleòtids i la Taq polimerasa. Es va optar per distribuir



la mostra que contenia el DNA a la fase inferior per evitar el contacte del SDS amb la Taq polimerasa abans que es formés la barreja final de 50  $\mu$ l.

Els oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació del gen *dhfr* van ésser els següents:

5'-CCTGTTAACGCAGTGTTC-3' a nivell de l'intró 1 i

5'-TCCCACGGGAGACTTCGCACT-3' a nivell de l'intró 2.

Pel gen *aprt* utilitzat com a control intern en la reacció de P.C.R. els oligonucleòtids utilitzats eren:

5'-TCACGAGCCAGCAAGGCGTT-3' dins de l'intró 1 i

5'-ACGCAGTACTCATCCAGGGT-3' dins de l'intró 2.

La reacció de P.C.R. es realitzava en 35 cicles després d'una denaturació inicial a 94 °C durant 1 minut. Cada cicle consistia en una denaturació a 92 °C durant 1 minut, hibridació dels oligonucleòtids a 59 °C durant 1 minut i síntesi a 72 °C durant 1 minut, utilitzant un termociclador MJ Research.

A continuació, es van sotmetre a electroforèsi alíquotes de 10  $\mu$ l dels productes obtinguts per P.C.R. en un gel al 5% de poliacrilamida i 1X TBE a 15 V/cm durant 90 minuts. Els fragments de DNA amplificats es van visualitzar per autoradiografia utilitzant pel·lícules de RX de Kodak. La quantificació de la intensitat de les bandes radioactives es va realitzar mitjançant anàlisi d'imatge amb el programa Bioprofil de Vilbert-Lourmat. Els resultats s'expressen com la intensitat del senyal del gen *dhfr* referida a la del gen *aprt*, utilitzada com a referència.

## 2.17. ASSAIG D'IMMUNOPRECIPITACIÓ

Els assaigs d'immunoprecipitació es van realitzar a partir d'extractes nuclears, obtinguts a partir de cèl·lules K1 en fase de creixement exponencial. Els anticossos emprats en la immunoprecipitació van ésser N9, un anticòs policlonal contra la proteïna RB i 2892-E, un anticòs policlonal contra la proteïna Sp1. La immunoprecipitació es va realitzar

amb concentracions creixents de l'anticòs que es van deixar interaccionar amb 30 µg d'extracte nuclear en presència de Nonidet P-40 al 0.1%, durant 60 minuts a 4 °C. Posteriorment, s'addicionaven 3 µl d'una suspensió al 10% de Proteïna A-insoluble (SIGMA) i es deixava incubar la barreja durant 30 minuts també a 4 °C. Aquesta quantitat de proteïna A, amb una capacitat d'unió de 1.8 mg de IgG /ml, era suficient per lligar la totalitat d'anticòs utilitzat en la immunoprecipitació. Finalment, es realitzava una centrifugació a 1.000 x g durant 10 minuts i el sobrenadant així obtingut s'utilitzava en assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica, amb les sondes 410f i Sp1f, segons el procediment descrit a l'apartat 9.

## 2.18. ASSAIG D'IMMUNOFLUORESCENCIA

Es van fer créixer  $3 \times 10^4$  cèl.lules K1 en cubres durant 12 hores en medi F12 al 7% de sèrum fetal i posteriorment, es van sincronitzar les cèl.lules mantenint-les en medi al 0.5% de sèrum fetal durant 7 dies. Després dels 7 dies de sincronització, es va afegir medi F12 fresc al 7% de sèrum fetal, i es van fixar les cèl.lules als diferents temps corresponents a les diferents fases del procés de proliferació cel.lular, amb paraformaldèhid al 3.8% en PBS que contenia MgCl<sub>2</sub> 5 mM. La fixació es va realitzar a temperatura ambient durant 10 minuts, i seguidament es van efectuar 3 rentats de 10 minuts amb PBS.

Totes les reaccions i rentats que es descriuen a continuació van tenir lloc a temperatura ambient. Les cèl.lules ja fixades van ésser permeabilitzades mitjançant un tractament amb tritó X-100 al 0.5% en PBS durant 4 minuts, seguit de 2 rentats de 5 minuts amb PBS. Aleshores, es va procedir a la incubació en solució bloquejant PNM, que contenia llet descremada en pols al 5% en tampó PN (Pinkel *et al.*, 1986) durant 20 minuts, i posteriorment, es van realitzar un rentat durant 5 minuts amb el tampó PN. Posteriorment, es va realitzar la incubació amb l'anticòs primari anti-Sp1 de conill (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una concentració de 2 µg/ml en tampó PNM durant 30 minuts, seguida de 3 rentats de 5 minuts amb el tampó PN. Finalment, les cèl.lules van ésser tractades amb l'anticòs de cabra anti-conill conjugat amb fluoresceïna (Molecular Probes, Inc.) a la dilució 1:50 en

PNM durant 30 minuts, seguit de 3 rentats de 10 minuts amb el tampó PN.

Els cubres es van montar en suports de vidre utilitzant una solució anti-desenfocant de montatge (Johnson and Noguera, 1981) Les preparacions es van visualitzar en un fotomicroscopi Zeiss Axioplan equipat amb epifluorescència. Les imatges obtingudes es van fotografiar utilitzant pel·lícula per diapositives Ektachrome 400 de Kodak.

## **2.19. PROCESSAMENT D'IMATGE**

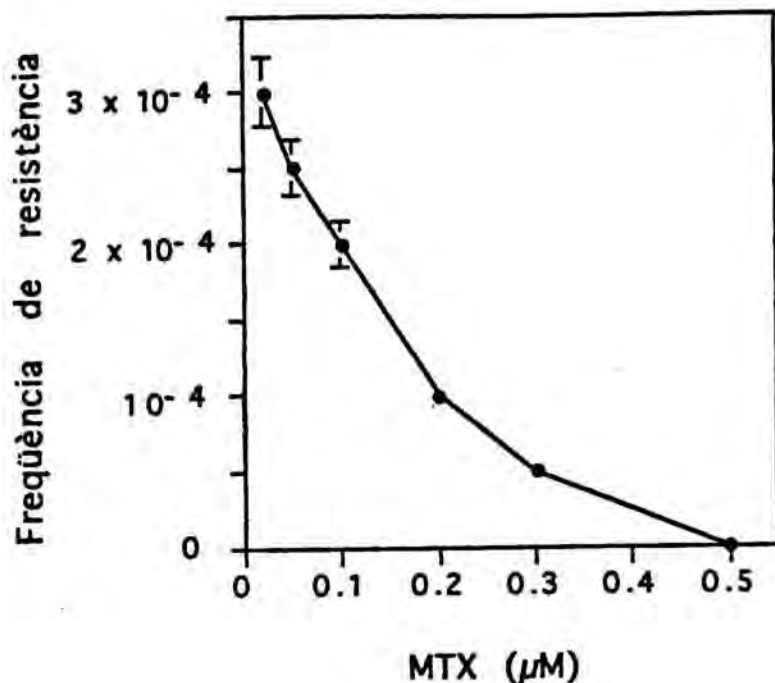
Les imatges corresponents a les autoradiografies es van captar amb una càmera de video COHU i es van densitometrar mitjançant el programa Bioprofil de Vilbert-Lourmat v.4.6. Per preparar les figures, les imatges magatzemades com a arxius .TIFF es van recuperar mitjançant el programa Graphic Converter 2.06, i montades amb el programa Canvas 3.5. Les impressions es van realitzar en una impressora Color StyleWriter 2400 a 360 dpi.

### **3. RESULTATS**

## ESTUDI DE LES VIES BIOQUIMIQUES INVOLUCRADES EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA RESISTENCIA AL MTX

### 3.1. ESTABLIMENT DE LES CORBES DE SUPERVIVENCIA AL MTX PER LES CEL.LULES K1

Com a base de l'estudi sobre la resistència al MTX que preteniem realitzar, vam procedir a establir les corbes de supervivència de la línia cel.lular K1 que conté dues còpies del gen *dhfr*. A tal efecte, vam incubar  $10^6$  cèl.lules K1 amb concentracions creixents de MTX des de  $10^{-8}$  M fins a  $5 \times 10^{-7}$  M. D'aquesta manera es poden determinar les concentracions mínimes de MTX capaces de produir la mort cel.lular i les que condueixen al desenvolupament de colònies resistents. Després de tres setmanes d'incubació cel.lular amb MTX, les colònies supervivents eren tenyides i comptades. Els resultats obtinguts es presenten a la Fig.1. Hom pot observar que una concentració de  $5 \times 10^{-7}$  M de MTX produïa el 100% de la mort cel.lular per a les cèl.lules K1. Tanmateix, una concentració de MTX de  $3 \times 10^{-7}$  M causava en aquestes cèl.lules una freqüència de desenvolupament de colònies resistents de l'ordre de  $5 \times 10^{-5}$ . Aquesta freqüència era suficientment baixa, i per tant idònea, per observar posteriorment increments en la mateixa per acció dels efectors més endavant mencionats. Per aquesta raó es va adoptar com a condició rutinaria la incubació amb una concentració de  $3 \times 10^{-7}$  M de MTX per a l'estudi de l'increment de la resistència a aquest antimetabòlit.



**Fig. 1** Corba de supervivència al MTX en cèl·lules K1

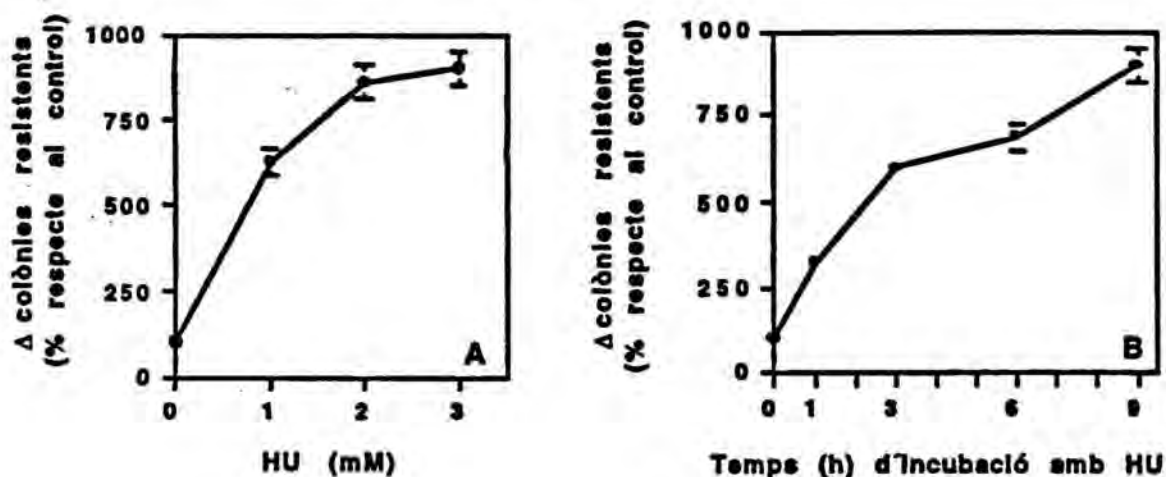
Es van incubar  $10^6$  cèl·lules K1 en medi selectiu en absència de glicina, hipoxantina i timidina (-GHT) en presència de les concentracions de MTX indicades durant 3 setmanes. Posteriorment, les colònies obtingudes es van fixar amb formaldehid al 2%, es van tenyir amb Violeta de genciana al 0.5% i es van comptar. Els resultats s'expressen com a freqüència de resistència, i són la mitja de 3 experiments diferents.

### 3.2. INCREMENT DE LA FREQUÈNCIA DE RESISTÈNCIA AL MTX PER DIFERENTS EFECTORS

Si bé la resistència al MTX pot ésser incrementada simplement mitjançant incubació amb concentracions progressivament creixents de MTX, aquesta metodologia és molt lenta i es necessiten mesos per portar-la a terme. Per accelerar el procés de resistència es va optar per incubar les cèl·lules amb diferents efectors coneguts per la seva capacitat d'incrementar la freqüència de resistència al MTX en un curt espai de temps (de l'ordre de setmanes). En aquesta categoria es troben l'hidroxiurea (HU), l'afidicolina (APH) i l'ester de forbol TPA entre d'altres. La nostra filosofia amb aquestes incubacions era la de trobar alguna via bioquímica per la qual s'incrementés la resistència i una vegada coneguda, intentar la seva inhibició. Una disminució en la resistència basal al MTX podria ésser de gran valor en aquesta quimioteràpia anticancerosa en incrementar les possibilitats d'èxit del tractament.

### 3.2.1. Efecte de l'hidroxiurea

Els inhibidors de la síntesi de DNA tenen la capacitat d'incrementar la resistència al MTX. Entre ells es troba l'hidroxiurea (HU), un inhibidor de la ribonucleòtid reductasa. En primer lloc vam assajar la toxicitat d'aquest efector sobre la línia cel.lular K1, amb la incubació de les cèl.lules amb concentracions gradualment creixents d'HU durant un període de temps de 24 hores i observació del número de colònies viables. Es va així determinar que la concentració màxima d'HU que no afectava a la viabilitat de les cèl.lules K1 era de 3 mM. Posteriorment, es va determinar l'efecte de l'HU sobre la resistència al MTX. Es van incubar 250.000 cèl.lules K1 amb concentracions creixents d'HU per un període de temps de 9 hores, i després d'un temps d'expressió de 15 hores, es va aplicar la selecció amb MTX a  $3 \times 10^{-7}$  M. La selecció es va mantenir durant 3 setmanes amb canvis de medi i MTX setmanals, fins al desenvolupament de colònies resistents visibles. Tal com es mostra a la Fig. 2a, la concentració d'HU més efectiva en la generació de colònies resistents al MTX va ésser la de 3 mM. Posteriorment, es va assajar l'efecte de l'HU a 3 mM durant diferents períodes de temps, de 3 a 9 hores. Es pot observar a la Fig. 2b que l'HU va provocar un increment en el número de colònies resistents al MTX depenent del temps d'incubació, amb un màxim a les 9 hores, encara que l'efecte assolit a les 3 hores era ja de 6 vegades respecte al control de cèl.lules no tractades amb HU. Es per aquesta raó que les posteriors incubacions amb HU es van realitzar a un temps fixe de 3 hores i a una concentració de 3 mM.



**Fig. 2 Efecte de l'HU sobre el número de colònies resistents al MTX**

**A) Dependència de la concentració d'HU**

Es van incubar 250.000 cèl.lules K1 amb concentracions creixents d'HU durant 9 hores. Després del tractament, es va deixar un temps d'expressió de 15 hores, i posteriorment, es va aplicar la selecció amb MTX, en medi -GHT i a la concentració de  $3 \times 10^{-7}$  M de MTX. El medi i el MTX es van renovar setmanalment fins al desenvolupament de colònies visibles (21 dies). Les colònies resistents obtingudes es van fixar, tenyir i comptar. Els resultats s'expressen en percentatges i el 100% representa el número de colònies resistents obtingudes en absència d'HU. Els resultats són la mitja de 3 experiments diferents.

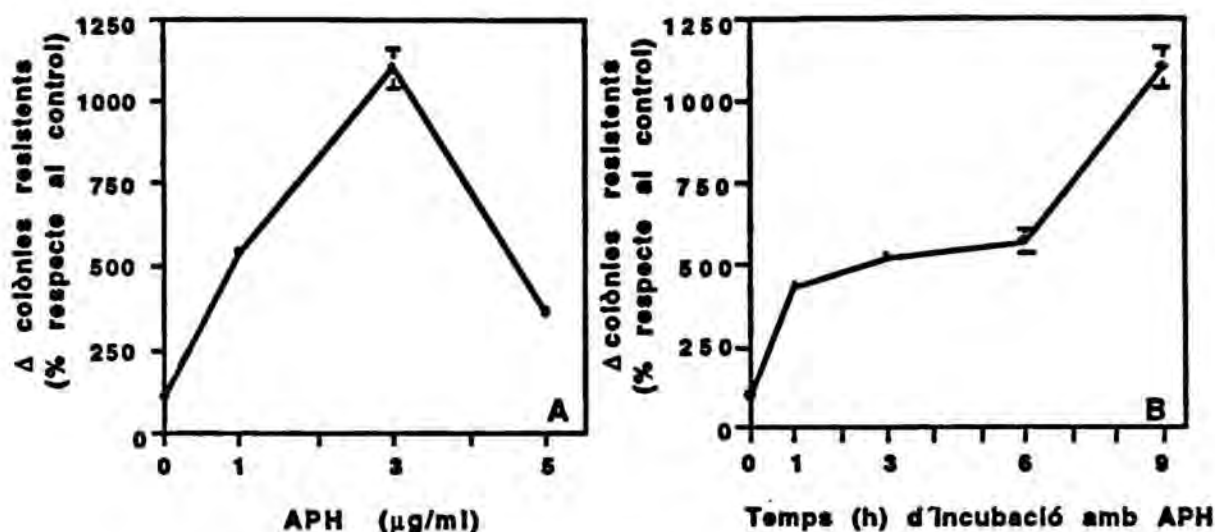
**B) Dependència del temps d'incubació amb HU**

Les cèl.lules es van incubar amb HU a la concentració de 3 mM durant els temps indicats. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

### 3.2.2. Efecte de l'afidicolina

L'afidicolina (APH) és també un inhibidor de la síntesi de DNA que actua a nivell de la DNA polimerasa alfa i que pot incrementar el número de colònies resistents al MTX. Per a aquest efector, la concentració màxima que no afectava a la viabilitat de les cèl.lules K1 era de 5  $\mu$ g/ml. En els experiments de generació de colònies resistents, però, la concentració més efectiva era de 3  $\mu$ g/ml, que va ésser la utilitzada en les posteriors incubacions (Fig. 3a). L'efecte de l'APH sobre l'increment del número de colònies resistents al MTX també era depenent del temps d'incubació amb un màxim a les 9 hores (Fig. 3b).





**Fig. 3** Efecte de la APH sobre el número de colònies resistents al MTX

A) Dependència de la concentració d'APH

Les cèl.lules K1 es van incubar amb APH a les concentracions indicades durant 9 hores. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

B) Dependència del temps d'incubació amb APH

Les cèl.lules K1 es van incubar amb APH a la concentració de 3 µg/ml durant els temps indicats. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

Rutinariament, les incubacions amb APH es van realitzar a la concentració de 3 µg/ml durant 3 hores, condicions que permetien un increment en el número de colònies de 5 vegades respecte al control de cèl.lules no tractades amb APH.

### 3.2.3. Efecte del TPA

Un altre efector que incrementa la resistència al MTX és l'ester de forbol TPA. Aquest agent no presentava cap toxicitat sobre les cèl.lules K1 fins i tot a concentracions de l'ordre de 1 µg/ml.

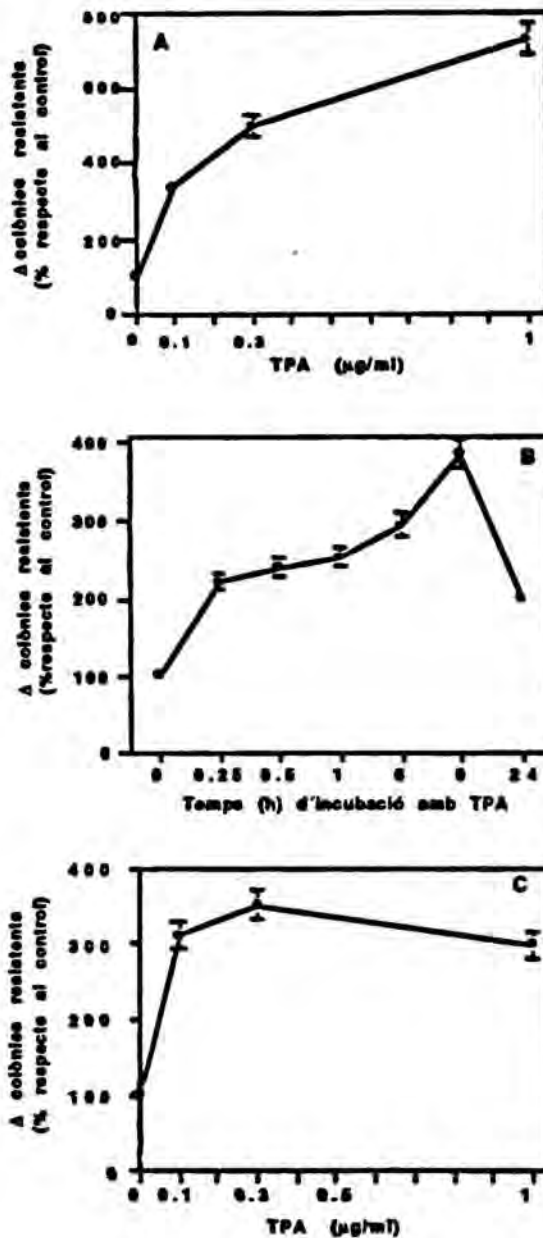
En primer lloc, vam reproduir en cèl.lules CHO l'efecte del TPA sobre la resistència al MTX observat per Varshavsky (1981) en cèl.lules 3T6. L'incubació de cèl.lules K1 de CHO amb l'ester de forbol durant una setmana provocava un increment en el número de colònies que

sobreviuen a la concentració de MTX de  $3 \times 10^{-7}$  M, i aquest efecte era depenent de la concentració de TPA, amb un màxim a  $1 \mu\text{g/ml}$  (Fig.4a).

El TPA incrementa l'activitat de la proteïna quinasa C cel.lular després de provocar la seva translocació a les membranes. Es pot per tant atribuir l'efecte del TPA sobre el número de colònies resistents al MTX a un increment de l'activitat d'aquesta quinasa. L'inconvenient que es presenta davant d'una incubació permanent amb TPA és la proteòlisi de l'enzim que té lloc en un espai de temps de 24-48 hores, i llavors, no és possible discernir si els efectes observats són deguts a l'activació de la PKC o a la seva degradació.

Per aquesta raó, vam estudiar la dependència de temps en l'increment de la resistència al MTX generada pel TPA. A la Fig. 4b es mostra que el número de colònies resistents al MTX ja s'incrementava als 15 minuts-1 hora d'incubació amb TPA a  $0.3 \mu\text{g/ml}$  i s'obtenia un valor màxim a les 9 hores, que posteriorment disminuïa de manera progressiva amb el temps d'incubació.

El número de colònies resistents a una concentració fixa de  $3 \times 10^{-7}$  M de MTX depenia també de la concentració de TPA utilitzada en la incubació a un temps fixe de 9 hores. La màxima resposta al TPA en aquestes condicions es va assolir amb una concentració de  $0.3 \mu\text{g/ml}$  (Fig. 4c).



**Fig. 4 Efecte del TPA sobre el número de colònies resistents al MTX**

**A) Dependència de la concentració de TPA**

Les cèl.lules K1 es van incubar a les concentracions de TPA indicades durant 1 setmana, en presència de MTX a la concentració de  $3 \times 10^{-7}$  M. El medi -GHT i el MTX es van renovar cada setmana fins a l'aparició de colònies resistents que van ésser tenyides i comptades. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

**B) Dependència del temps d'incubació amb TPA**

Les cèl.lules K1 es van incubar amb TPA a la concentració de  $0.3 \mu\text{g/ml}$  durant els temps indicats. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

**C) Dependència de la concentració de TPA.**

Les cèl.lules K1 es van incubar a les concentracions indicades de TPA per un període de temps de 9 hores. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

### **3.2.4. Determinació del grau d'amplificació del gen *dhfr* en colònies resistents al MTX**

Es coneixen 4 mecanismes bàsics que condueixen a resistència davant d'un tractament quimioteràpic:

- 1) Mutació del gen que correspon a la diana d'atac del tractament, de manera que la droga quimioteràpica perd part de la seva efectivitat.
- 2) Decrement del transport de la droga cap a l'interior de la cèl.lula.
- 3) Increment del grau d'expulsió de la droga cap a l'exterior de la cèl.lula per expressió del fenotipus MDR.
- 4) Amplificació gènica del *locus* que codifica per a la diana d'atac del tractament.

Tanmateix, en el cas del MTX, i especialment a concentracions no gaire elevades, està descrit que el tipus de resistència que apareix és a conseqüència d'un procés d'amplificació del gen *dhfr*. Amb aquests precedents, vam procedir a determinar el número de còpies del gen *dhfr* a les colònies resistents al MTX generades després de tractament amb HU, APH o TPA.

#### **3.2.4.1. Endegament d'un mètode de determinació del grau d'amplificació gènica mitjançant P.C.R. quantitativa**

Per a la determinació del grau d'amplificació del gen *dhfr* a les colònies resistents al MTX obtingudes per acció de diferents efectors vam posar a punt un mètode basat en la tècnica de P.C.R. quantitativa per establir el número de còpies genòmiques. El material de partida per a aquesta tècnica consistia en colònies resistents aïllades i a continuació tractades amb SDS i proteïnasa K. Les solucions resultants es van sotmetre a reaccions de P.C.R., segons la metodologia descrita a l'apartat 2.16, amb la utilització d'oligonucleòtids específics per a seqüències intròniques dels gens *dhfr* i *aprt*, per identificar els senyals genòmics corresponents a aquest dos gens.

El senyal obtingut amb el gen *aprt* es va fer servir per normalitzar els resultats. Els fragments amplificats eren de 170 bp per al gen *dhfr* i de 400 bp per a l'*aprt*.

En primer lloc es van establir les condicions per visualitzar els senyals corresponents als dos gens sense arribar a la saturació en la reacció de P.C.R. Amb mostres tractades de cèl.lules K1 es van realitzar reaccions de P.C.R. incrementant el número de cicles. El senyal pels dos gens apareixia als 35 cicles i es saturava després de 50 cicles (Fig. 5).

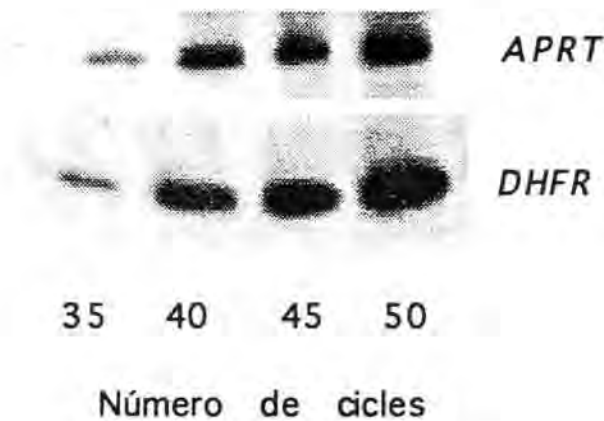
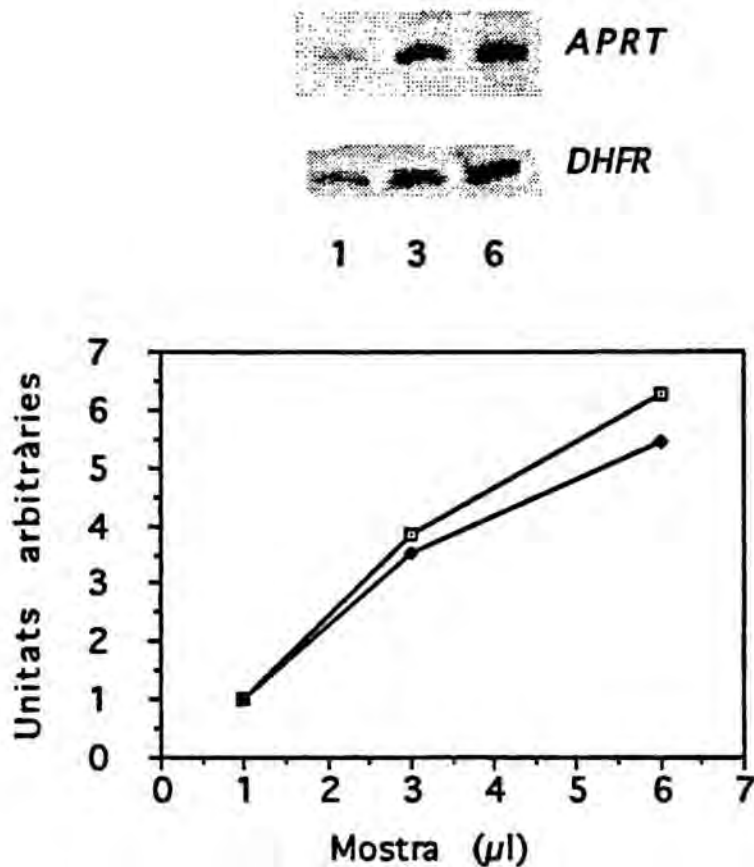


Fig. 5 Increment del senyal genòmic obtingut amb un número creixent de cicles de P.C.R.

Aliquotes de 1  $\mu$ l, que equivalen aproximadament a 5 cèl.lules K1 lisades i tractades amb Proteïnasa K, van ésser el material de partida per a l'amplificació mitjançant P.C.R., amb oligonucleòtids intrònics pels gens *dhfr* i *aprt*. Les reaccions es van realitzar en paral.lel pels dos gens en el mateix procés de P.C.R., que es va realitzar a diferents números de cicles. El fragment de DNA amplificat, de 170 bp pel gen *dhfr* i de 400 bp pel gen *aprt*, es va sotmetre a electroforèsi en un gel de poliacrilamida al 5%, que es va secar posteriorment, i contactar amb una pel.lícula de R.X. per obtenir la seva autoradiografia.

A partir dels 40 cicles s'incrementava la formació de fragments amplificats inespecífics. Per aquestes raons, es va establir en 35 el número de cicles en la reacció de P.C.R. Posteriorment, en aquestes condicions, es van variar les quantitats de mostra per validar la quantificació del mètode. El senyal detectat en el cas dels dos gens va ésser proporcional a la quantitat de DNA present a la mostra utilitzada en la reacció (Fig. 6).

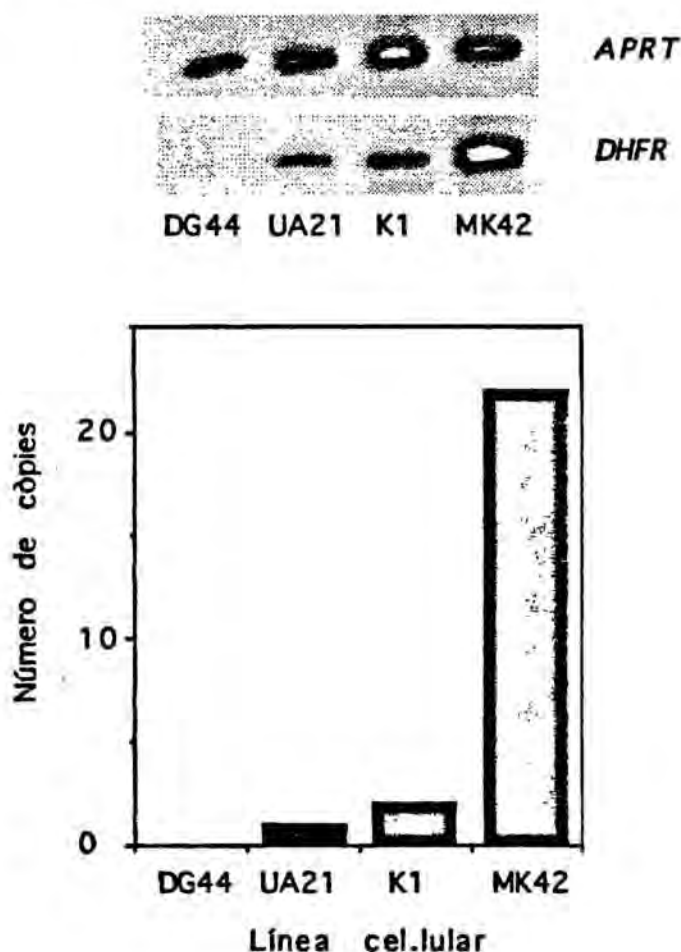


**Fig. 6** Linearitat de l'assaig de P.C.R. quantitativa amb la concentració de DNA genòmic.

Es van recollir colònies aïllades de cèl.lules K1, que posteriorment, es van lisar i portar a un volum final de 22 µl amb l'addició de Proteïnasa K. Una alíquota de la mostra es va diluir en una proporció 1:10 en Tris-HCl 10mM i EDTA 1 mM, i es van realitzar 35 cicles de P.C.R. amb diferents quantitats d'aquesta dilució (1, 3, i 6 µl). Després d'electroforèsi i autoradiografia, la intensitat del senyal pel gen *dhfr* (□) i *aprt* (◆) es van quantificar mitjançant anàlisi d'imatge.

Com a prova addicional de les propietats quantitatives d'aquest mètode es va procedir a la determinació del número de còpies del gen *dhfr* en mostres de colònies aïllades de línies cel.lulars amb un número conegut de còpies del gen. Els senyals obtinguts per al gen *dhfr* es van normalitzar amb els senyals corresponents al gen *aprt* obtinguts en paral.lel. Com la línia DG44 és un mutant per delecció del locus *dhfr*, no s'havia de detectar cap senyal amb aquestes cèl.lules en les condicions de P.C.R. establertes. Les línies UA21 i K1 portadores de 1 i 2 còpies del gen *dhfr* respectivament, es van utilitzar per comprovar la sensibilitat del mètode. Finalment, les cèl.lules MK42, que contenen múltiples

còpies del gen *dhfr* es podien emprar per determinar la capacitat del mètode per quantificar el número de còpies en línees amplificades. A la Fig. 7 es mostra l'absència de fragment amplificat corresponent al gen *dhfr* després de la reacció de P.C.R. amb mostres de cèl.lules DG44, el senyal corresponent a les cèl.lules K1 té una intensitat doble del corresponent a les cèl.lules UA21, i el senyal a partir de les cèl.lules MK42 correspon a la seva característica de línia amplificada. D'altra banda, el senyal corresponent al gen *aprt* es manté constant a les 4 línees cel.lulars.



**Fig. 7** Determinació del número de còpies gèniques en línees cel.lulars

Es van processar colònies aïllades de cèl.lules DG44, UA21, K1 i MK42 (aproximadament 100 cèl.lules), tal com es descriu a la secció de Materials i Mètodes, i el seu número de còpies del gen *dhfr* es va determinar després de la normalització dels resultats amb el senyal del gen *aprt* utilitzat com a referència. La reacció de P.C.R. es va realitzar a 35 cicles sota les condicions standard.

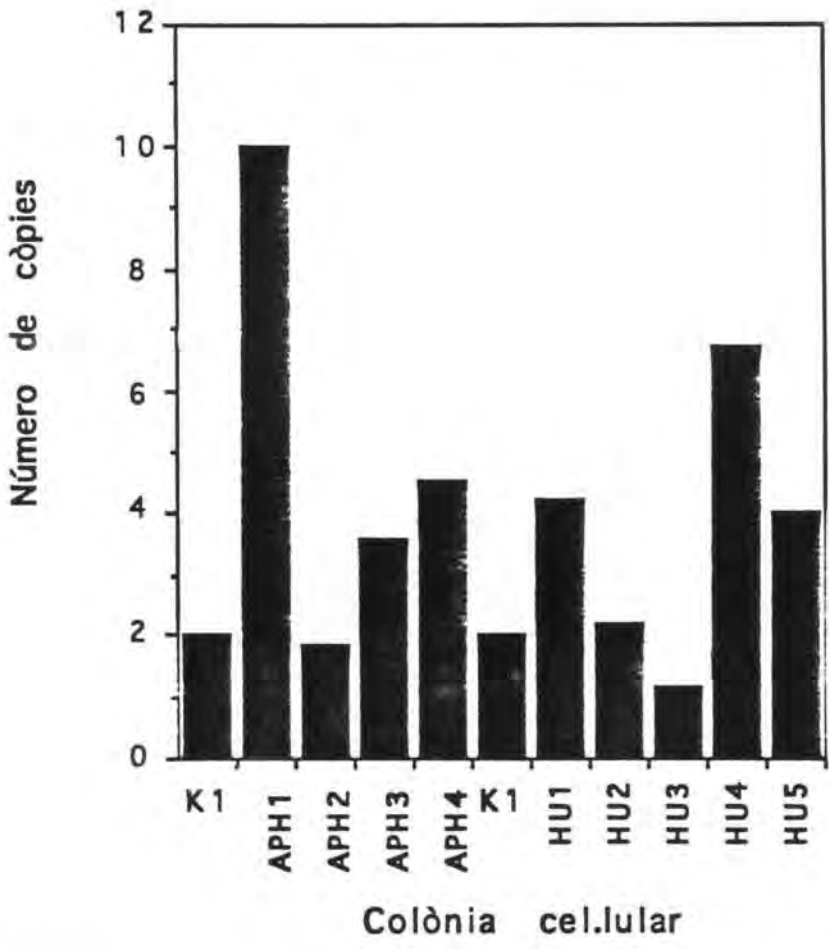
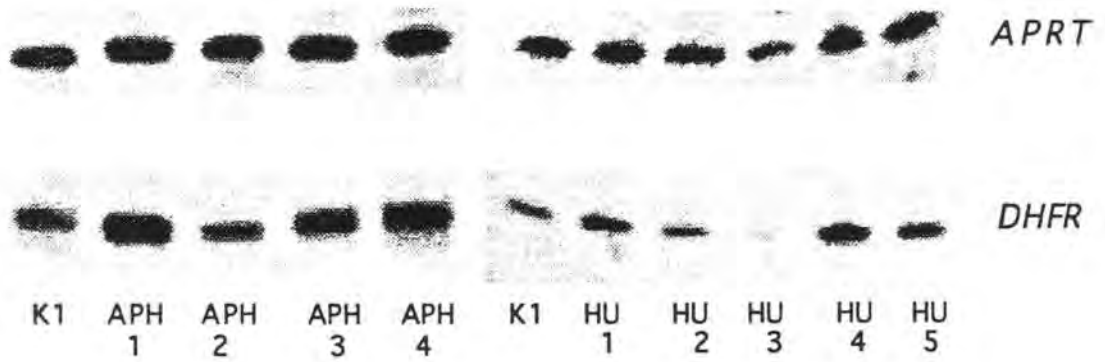
### **3.2.4.2. Determinació del grau d'amplificació generat pel tractament amb HU, APH o TPA**

L'increment del número de colònies resistents al MTX produït per efecte de l'HU i el TPA a les cèl.lules CHO podria ésser degut a un mecanisme d'amplificació gènica tal com s'havia descrit per a les cèl.lules 3T6 (Brown *et al.*, 1983, Varshavsky, 1981). Per a l'APH, no obstant, no existien dades al respecte a la bibliografia. Per tant, es va determinar el número de còpies del gen *dhfr* a les colònies resistents obtingudes per tractament amb HU, APH i TPA.

Es van incubar cèl.lules K1 amb HU a 3 mM durant 3 hores, APH a 3 µg/ml durant 3 hores, o amb TPA a 0.3 µg/ml durant 9 hores, i després d'aquests tractaments es van sotmetre a la selecció amb MTX a la concentració de  $3 \times 10^{-7}$  M fins a la aparició de colònies resistents. Diferents colònies resistents aïllades, escollides de forma aleatòria, es van utilitzar posteriorment com a material de partida per a la determinació del número de còpies del gen *dhfr* utilitzant el mètode de P.C.R. damunt esmentat. Els resultats per a l'HU i l'APH es presenten a la Fig. 8. Tant l'HU com l'APH van causar una amplificació del gen *dhfr* que oscil.lava entre 4 i 10 còpies, és a dir de 2 a 5 vegades respecte a la línia original K1.

En el cas del TPA, aquesta anàlisi va donar com a resultat que més del 70% de les colònies resistents aïllades contenien un número incrementat de còpies del gen *dhfr*, amb una mitjana de 7 còpies per cèl.lula (Taula I).





**Fig. 8** Número de còpies del gen *dhfr* en colònies resistents al MTX

Es van tractar cèl.lules K1 amb HU a la concentració de 3 mM o bé amb APH a la concentració de 3 µg/ml, durant 3 hores, i posteriorment, es va aplicar la selecció amb MTX a la concentració de  $3 \times 10^{-7}$  M en medi -GHT. Després de 16-21 dies, es va determinar el número de còpies del gen *dhfr* en colònies resistents aïllades mitjançant la tècnica de P.C.R. quantitativa segons les condicions standard. El número de còpies del gen *dhfr* s'expressa com el quocient entre les intensitats corresponents als senyals del gen *dhfr* i *aprt*.

Taula I  
 Número de còpies del gen *dhfr* a les colònies resistents al MTX

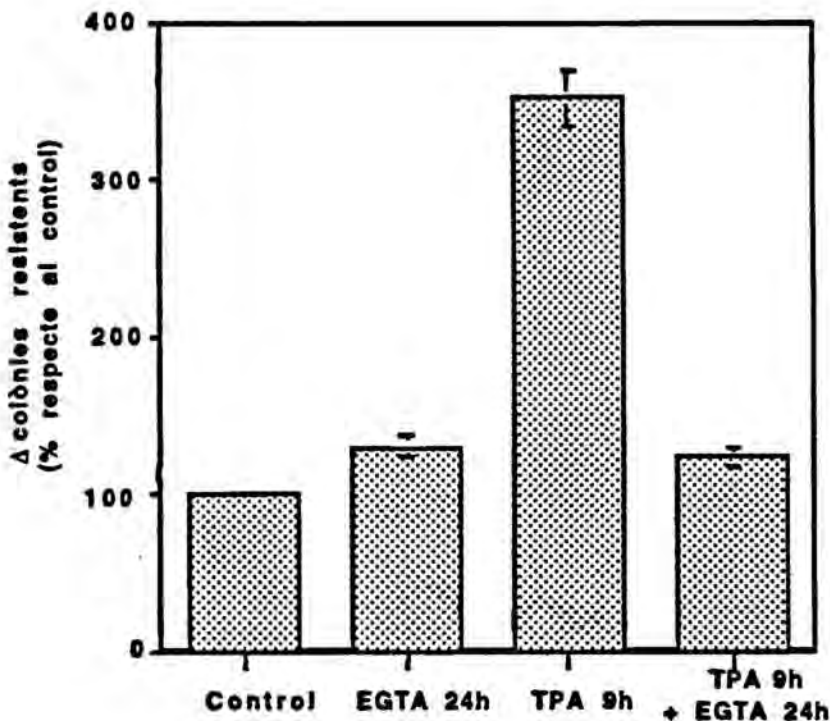
Clon	Densitat òptica (unitats arbitràries)		<i>dhfr</i> / <i>aprt</i> Quocient O.D.	número de còpies per cèl.lula diploide
	<i>dhfr</i>	<i>aprt</i>		
<u>WT(Control)</u>	100	100	1	2
<u>MTX resistant</u>				
1	124	28	4.4	8.8
2	213	49	4.3	8.6
3	205	48	4.3	8.6
4	98	24	4	8
5	148	75	2	4
6	64	41	1.5	3
7	96	47	2	4
8	118	18	6.5	13
9	73	40	1.8	3.6
10	99	23	4.3	8.6
11	106	48	2	4
12	109	8	14	28
13	115	20	6	12
14	53	48	1.2	2.4
15	92	74	1.2	2.4
16	88	20	4.4	8.8
17	198	169	1.2	2.4
18	48	3.5	13	26
19	68	40	1.7	3.4
20	52	42	1.2	2.4
21	31	21	1.4	2.8
22	43	18	3.3	6.6
23	102	110	0.9	1.8
24	27	7	3.8	7.6
25	78	57	1.3	2.6

Es van incubar cèl.lules K1 de CHO amb TPA (0.3 µg/ml) durant 9h, i 15 hores després es van sotmetre a la selecció amb MTX durant 3 setmanes.

Es van recollir colònies ben aïllades que van ésser utilitzades com a material de partida per a la determinació quantitativa per P.C.R. del nº de còpies del gen *dhfr*. Les autoradiografies es van quantificar mitjançant anàlisi densitomètrica i els resultats s'expressen en unitats arbitràries.

### 3.2.5. Efecte de l'EGTA

Donat que un gran número d'isoformes de la PKC són depenents de calci, vam assajar l'efecte de l'EGTA sobre cèl.lules incubades amb TPA a 0.3  $\mu\text{g/ml}$  durant 9 hores. L'EGTA, a una concentració de 0.5 mM, es va afegir al medi 30 minuts abans de l'incubació amb l'ester de forbol i es va mantenir per un període total de 24 hores. Aquesta concentració d'EGTA no va produir cap alteració a la viabilitat de les cèl.lules. Tanmateix, la presència del quelant específic de calci va comportar una reducció en el número de colònies resistents al MTX incrementat per efecte del TPA (Fig. 9).



**Fig. 9** Efecte de l'EGTA sobre l'increment de la resistència al MTX originat pel tractament amb TPA

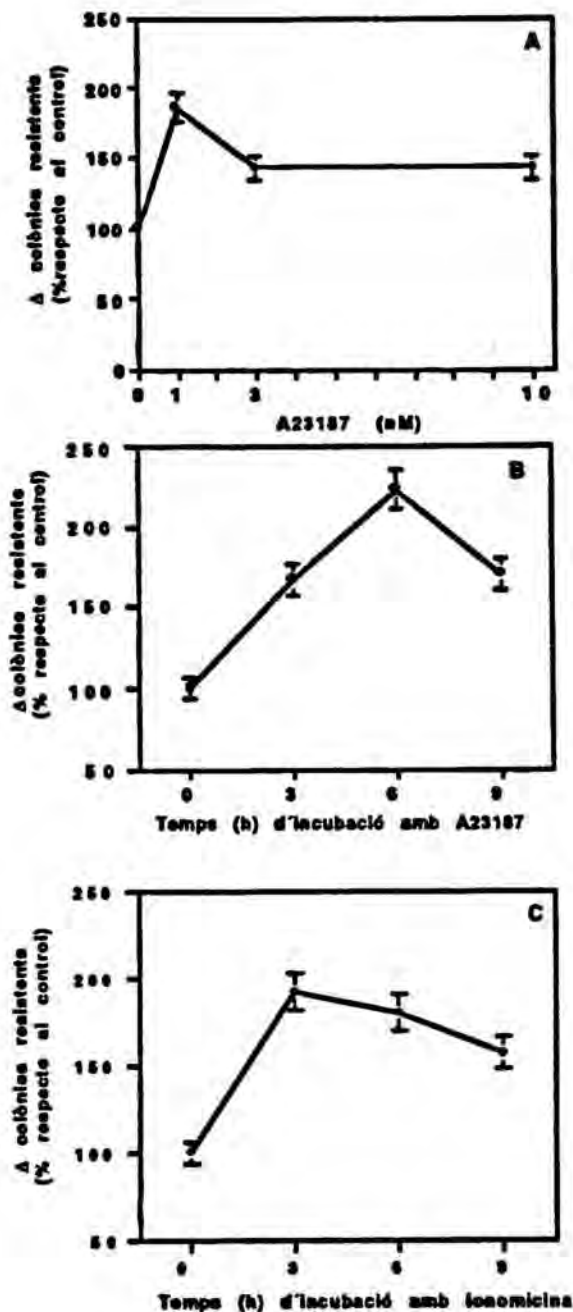
Les cèl.lules K1 es van preincubar amb EGTA a la concentració de 0.5 mM durant 30 minuts, previament a l'addició de TPA a la concentració de 0.3  $\mu\text{g/ml}$ , que es va mantenir en el medi durant 9 hores. Posteriorment es va realitzar un canvi de medi però mantenint la presència de l'EGTA durant el període d'expressió de 15 hores. Finalment, es va aplicar la selecció amb MTX a la concentració de  $3 \times 10^{-7}$  M, en medi -GHT. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

### **3.2.6. Efecte d'ionòfors de calci i de l'angiotensina II**

Posteriorment, vam assajar si agents que provoquen la mobilització del calci cel.lular podien incrementar la resistència al MTX. Com a ionòfors de calci es van utilitzar la ionomicina i l'A23187, sempre a concentracions que no afectessin a la viabilitat cel.lular.

En tots dos casos es va observar un increment en el número de colònies resistents al MTX després del tractament amb els efectors. Aquests increments van ésser dependents del temps d'incubació amb els ionòfors, i de la concentració, en el cas de l'ionòfor A23187 (Fig. 10a). Així, amb l'A23187 a 1 nM, es va assolir un màxim en el número de colònies resistents a les 6 hores d'incubació i amb la ionomicina, també a 1 nM, el màxim es va observar a les 3 hores d'incubació (Fig. 10b i 10c).

Un altre efector assajat, que actua a través d'un mecanisme dependent de calci, va ésser l'angiotensina II. Aquest pèptid a la concentració de 1  $\mu$ M va produir un increment en el número de colònies resistents al MTX dependent del temps d'incubació amb un màxim a les 9 hores (Fig. 11).



**Fig. 10 Efecte dels ònofors de calci A23187 i ionomicina en el número de colònies resistents al MTX**

**A) Dependència de la concentració de A23187**

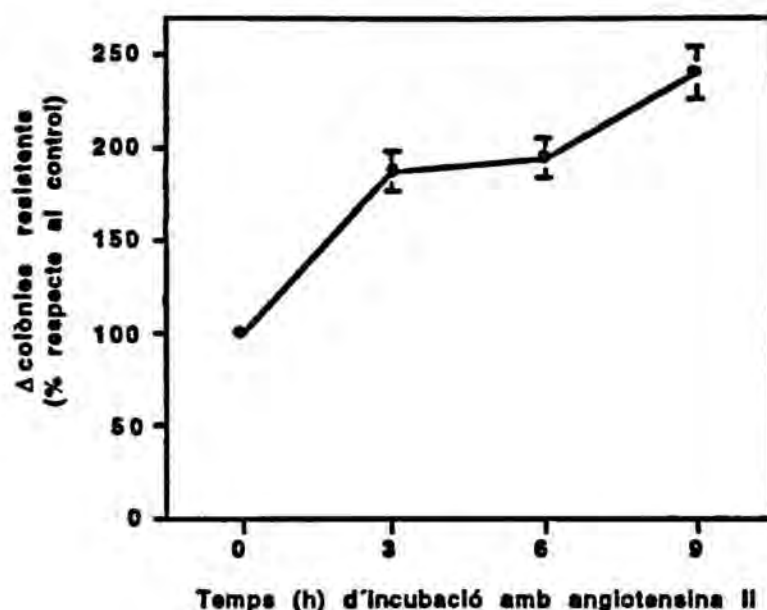
Les cèl.lules K1 es van tractar a les concentracions indicades de A23187 durant 9 hores. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

**B) Dependència del temps d'incubació amb A23187**

Les cèl.lules K1 es van tractar amb l'A23187 a la concentració de 1 nM durant els períodes de temps indicats. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

**C) Dependència del temps d'incubació amb ionomicina**

Les cèl.lules K1 es van tractar amb ionomicina a la concentració de 1 nM durant els períodes de temps indicats. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.



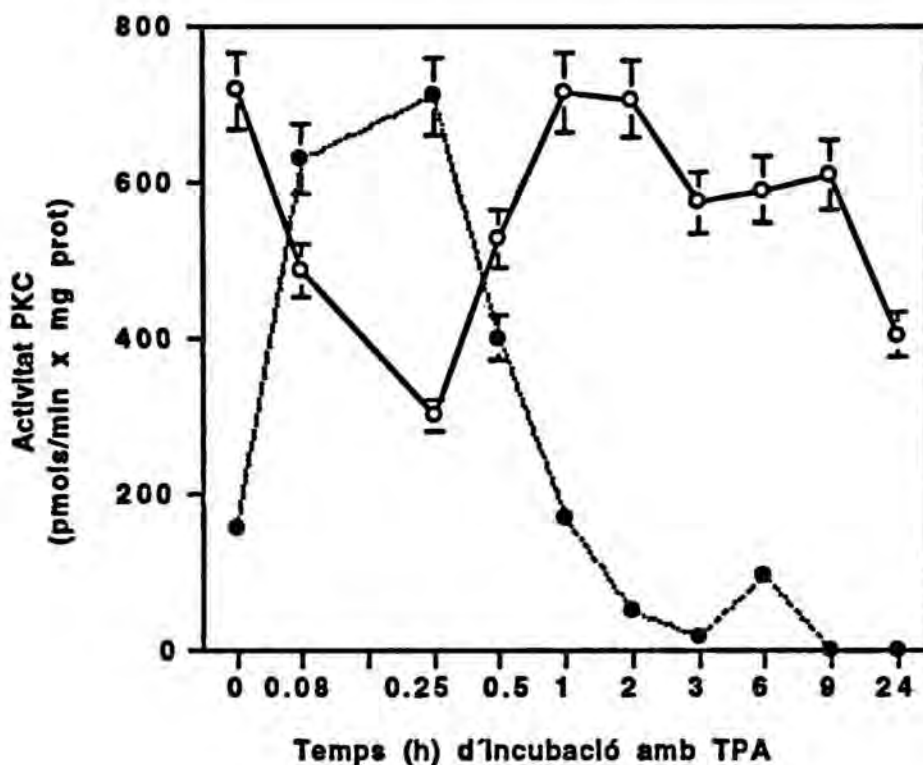
**Fig. 11** Dependència del temps d'incubació amb angiotensina II en el número de colònies resistents al MTX

Les cèl.lules K1 es van incubar amb angiotensina II a la concentració de  $1 \mu\text{M}$  durant els períodes de temps indicats. Les condicions restants són les mateixes que les descrites per la Fig. 2a.

### 3.2.7. Efecte del TPA, A23187 i angiotensina II sobre l'activitat PKC en cèl.lules CHO

Ja que existia una possible relació entre l'activació de la PKC i la generació de colònies resistents, necessitavem conèixer la dependència del temps de la translocació de la PKC per acció del TPA en cèl.lules CHO. Com no existien dades al respecte en cèl.lules CHO a la bibliografia, vam decidir estudiar l'efecte del TPA, l'ionòfor A23187 i l'angiotensina II sobre l'activitat PKC en aquestes cèl.lules.

Tal com es mostra a la Fig. 12, el TPA a  $0.3 \mu\text{g/ml}$  era capaç de translocar i activar la PKC en cèl.lules CHO a temps curts, de 5-15 minuts. A les 24 hores de tractament amb TPA, aquest ester de forbol havia deplecionat la PKC a la fracció de membranes i l'activitat detectada al citosol s'havia reduït en un 60%.

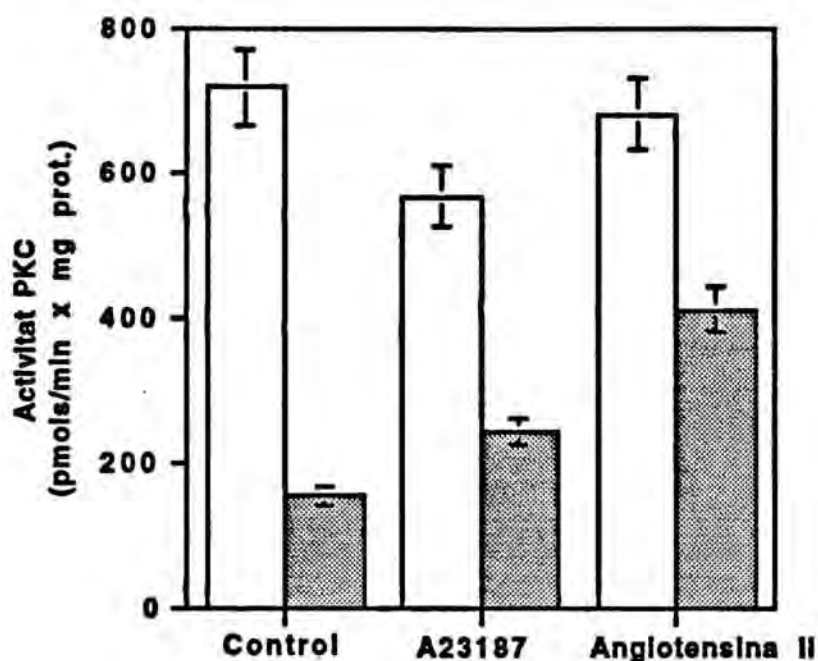


**Fig. 12** Dependència del temps d'incubació amb TPA sobre l'activitat PKC de les cèl.lules CHO

Les cèl.lules K1 es van incubar amb TPA a la concentració de  $0.3 \mu\text{g/ml}$  durant els períodes de temps indicats i posteriorment es van processar per a la determinació de l'activitat PKC, tant a la fracció citosòlica (○) com a la de les membranes (●), tal com es descriu a la secció de Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja de 4 experiments.

Posteriorment, vam determinar l'activitat PKC després del tractament de les cèl.lules CHO amb l'ionòfor A23187 a  $1 \text{ nM}$  o amb l'angiotensina a  $1 \mu\text{M}$ . Es pot observar a la Fig. 13, que aquests dos agents eren també capaços d'activar la PKC després de 15 minuts d'incubació, encara que de manera molt menys marcada que amb el TPA. L'activació provocada pels dos agents va ésser un fenomen transitori, i després de 3 hores d'incubació l'activitat tornava als seus nivells basals.

Aquests resultats recolzaven la possibilitat que l'increment en el número de colònies resistents al MTX generat pel TPA, l'ionòfor A23187 i l'angiotensina II fós degut a una activació temprana de la PKC, ja que s'inicia posteriorment a la translocació i l'activació de l'enzim.



**Fig. 13 Efecte del tractament amb A23187 i angiotensina II sobre l'activitat PKC de les cèl.lules CHO**

Es va determinar l'activitat PKC a la fracció citosòlica (barres buides) i de membranes (barres plenes) de cèl.lules CHO, després del tractament amb A23187 a la concentració de 1 nM o amb angiotensina a la concentració de 1  $\mu$ M. Els tractaments amb els efectors es van realitzar durant 15 minuts. Els resultats són la mitja de 3 experiments.

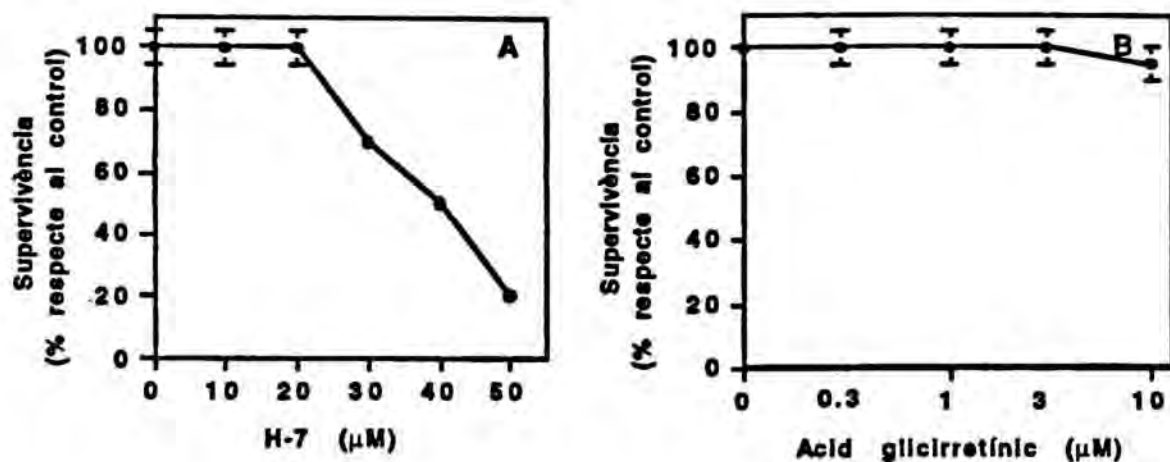
### 3.3. EFECTE D'INHIBIDORS DE LA PKC SOBRE LA RESISTENCIA AL MTX

#### 3.3.1. Estudi de la toxicitat d'inhibidors de la PKC

Per corroborar la implicació de l'activació de la PKC en la resistència al tractament amb MTX, vam realitzar una serie d'experiments amb inhibidors d'aquest enzim en combinació amb el TPA.

En primer lloc, vam determinar la concentració de cada inhibidor que permetia incubacions de 24 hores sense afectar la supervivència cel.lular. L'H-7 no afectava la viabilitat de les cèl.lules K1 fins a una concentració màxima de 20  $\mu$ M (Fig. 14a). En el cas de l'àcid glicirritènic, la concentració màxima sense efectes tòxics per a les cèl.lules va ésser de 10  $\mu$ M (Fig. 14b).





**Fig. 14 Efecte sobre la supervivència cel.lular de l' H-7 i l' àcid glicirritènic**

**A) Dependència de la concentració de H-7**

L' H-7 es va mantenir en el medi de cultiu durant 24 hores, i posteriorment, les cèl.lules es van deixar créixer en medi F12 en absència de l' inhibidor, fins a l' aparició de colònies que van ésser tenyides i comptades. Els resultats són la mitja de 2 experiments diferents.

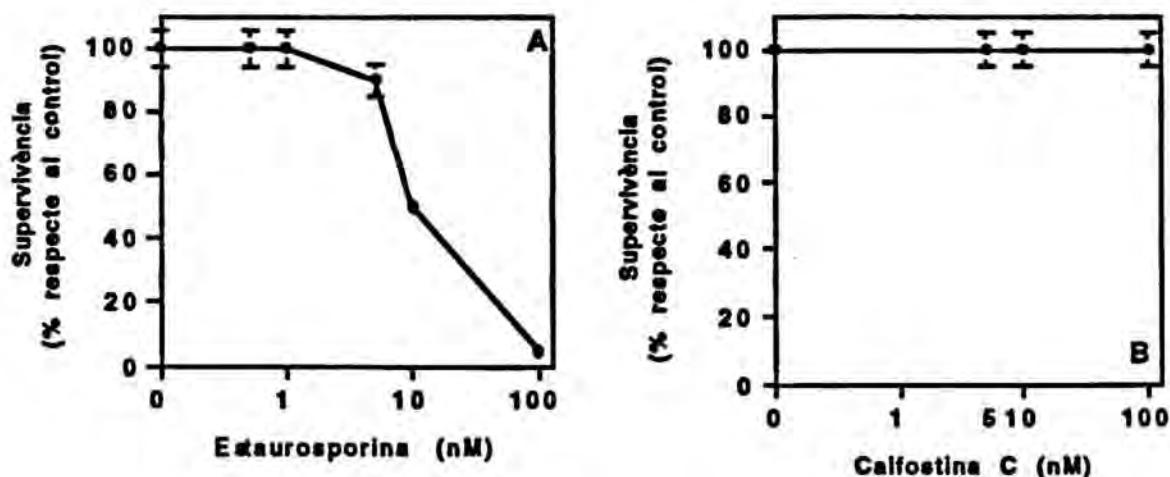
**B) Dependència de la concentració d' àcid glicirritènic**

Les condicions de l' assaig van ésser les mateixes que les descrites per la Fig. 14 a.



Per a l'estaurosporina, un inhibidor molt potent de la PKC (Tamaoki *et al.*, 1986), la utilització en incubacions cel.lulars s'havia de mantenir a una concentració màxima de 5 nM si el temps del tractament era superior a les 6 hores. Les concentracions d'estaurosporina superiors a 5 nM portaven a la mort cel.lular (Fig. 15a) per apoptosi d'acord amb les observacions de Falcieri (Falcieri *et al.*, 1993). La calfofostina C no va presentar cap efecte sobre la supervivència cel.lular fins a una concentració màxima de 1 μM (Fig. 15b).

Tots els inhibidors esmentats s'afegien 30 minuts abans del TPA (0.3 μg/ml per 9 hores) i, després de l'eliminació de l'ester de forbol, s'afegien de nou per 15 hores més per mantenir l'inhibició de la PKC. Posteriorment, s'aplicava la selecció amb MTX  $3 \times 10^{-7}$  M fins a l'aparició de colònies resistents. El medi i el MTX es canviaven cada 7 dies.



**Fig. 15** Efecte sobre la supervivència cel·lular de l'estausporina i la calyculin A

A) Dependència de la concentració d'estausporina

Les condicions de l'assaig van ésser les mateixes que les descrites per la Fig. 14 a.

B) Dependència de la concentració de calyculin A

Les condicions de l'assaig van ésser les mateixes que les descrites per la Fig. 14 a.

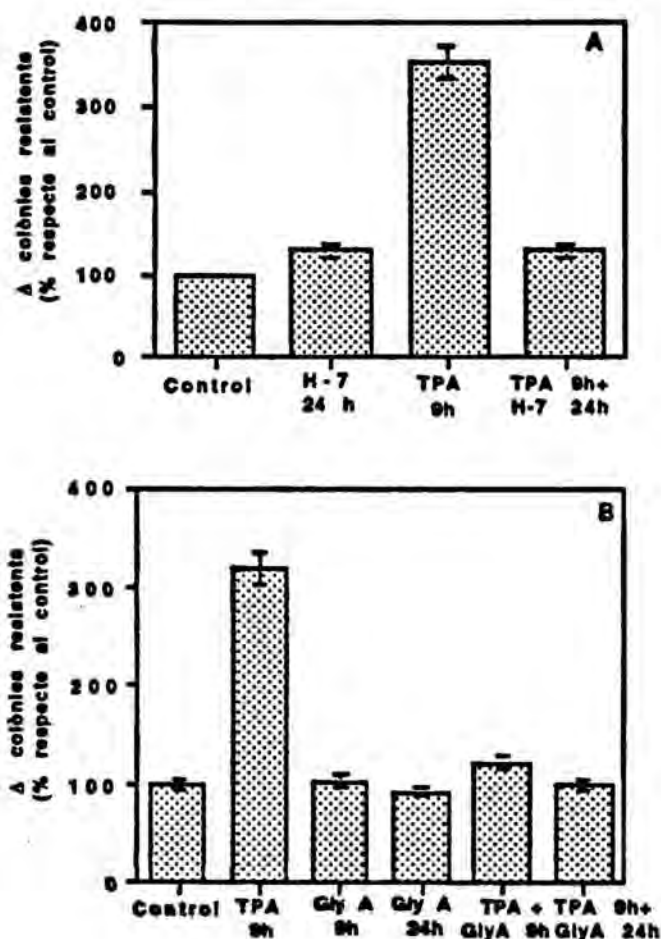
### 3.3.2. Efecte de l'H-7

El primer inhibidor assajat va ésser l'H-7 que, encara que no sigui totalment específic per a la PKC, ha estat àmpliament emprat amb aquest propòsit (Hidaka *et al.*, 1984). L'H-7 a la concentració de 20  $\mu$ M durant un període d'incubació de 24 hores no va provocar per si sol cap variació en el número de colònies resistents al MTX però, en combinació amb el TPA, va ésser capaç de disminuir significativament el número de colònies resistents al MTX generat per aquest ester de forbol (Fig. 16a).

### 3.3.3. Efecte de l'àcid glicirritènic

Posteriorment, vam assajar l'àcid glicirritènic, un producte de baixa toxicitat que es troba a la regalèssia i que actua *in vitro* com a inhibidor de la PKC purificada (O'Brian *et al.* 1990). L'àcid glicirritènic per si sol a una concentració de 10  $\mu$ M tant en incubacions de 9 hores com de 24 hores no va modificar el número de colònies resistents al MTX respecte al control. Quan s'incubaven les cèl·lules amb TPA en presència d'àcid glicirritènic, s'observava una reducció en el número de colònies resistents degudes a l'efecte del TPA sol (Fig. 16b). Aquesta

disminució ja es produïa quan l'inhibidor només estava present en el medi d'incubació durant el temps de tractament amb TPA, però era més accentuada si l'àcid glicirritènic es mantenia en el medi durant 24 hores, fins al moment de l'inici de la selecció amb MTX.



**Fig. 16** Efecte dels inhibidors de la PKC, H-7 i àcid glicirritènic sobre l'increment de la resistència generat pel tractament amb TPA

**A) Efecte de l'H-7**

Les cèl.lules K1 es van incubar amb TPA a la concentració de  $0.3 \mu\text{g/ml}$  durant 9 hores tant en absència com en presència d'H-7 a la concentració de  $20 \mu\text{M}$ . L'inhibidor es va mantenir en el medi d'incubació durant 24 hores, fins al moment de l'inici de la selecció amb MTX a la concentració de  $3 \times 10^{-7} \text{ M}$  en medi -GHT. Els resultats són la mitja de 3 experiments diferents.

**B) Efecte de l'àcid glicirritènic**

Les cèl.lules K1 es van incubar amb TPA a la concentració de  $0.3 \mu\text{g/ml}$  durant 9 hores tant en absència com en presència d'àcid glicirritènic a la concentració de  $10 \mu\text{M}$ . L'efecte de l'inhibidor es va assajar tant a 9 hores com a 24 hores. Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites per la Fig. 16 a.

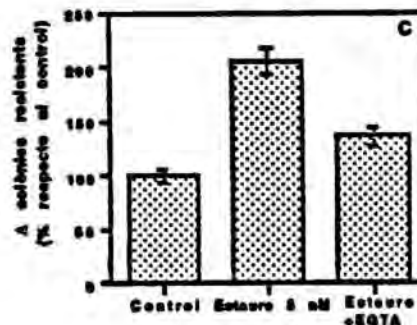
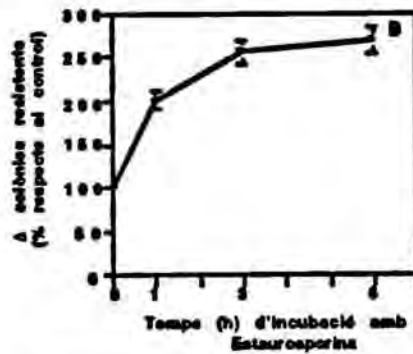
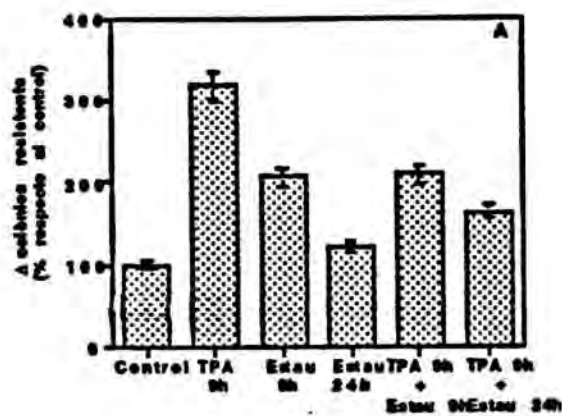
### **3.3.4. Efecte de l'estaurosporina**

L'estaurosporina, a la concentració de 5 nM, tant a 9 hores d'incubació com a 24 hores, va provocar una reducció en el número de colònies resistents generat pel TPA sòl a les cèl.lules CHO (Fig. 17a).

Malgrat que l'estaurosporina fós efectiva contrarrestant aquesta resistència al MTX, aquest inhibidor a 5-10 nM, per ell mateix, també va ésser capaç de comportar-se com un agonista incrementant el número de colònies resistents.

Vam estudiar aquest efecte amb més detall i vam determinar que era depenent de la concentració de l'inhibidor i del seu temps d'incubació (Fig. 17a i 17b). Així l'estaurosporina a la concentració de 10 nM i amb un temps d'incubació de 6 hores generava un increment en el número de colònies resistents al MTX de pràcticament 3 vegades respecte al control de cèl.lules no tractades amb aquest inhibidor.

L'efecte de l'estaurosporina en la formació de colònies resistents al MTX es podia reduir per acció de l'EGTA a 0.5 mM (Fig. 17c).



### Fig. 17 Efecte de l'estaurosporina

A) Efecte de l'estaurosporina sobre l'increment de la resistència al MTX generat pel tractament amb TPA

Les cèl·lules K1 es van incubar amb TPA a la concentració de 0.3 µg/ml durant 9 hores tant en absència com en presència d'estaurosporina a la concentració de 5 nM, durant 9 o 24 hores. Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites per la Fig. 16 a. B) Dependència del temps d'incubació amb estaurosporina sobre el número de colònies resistents al MTX

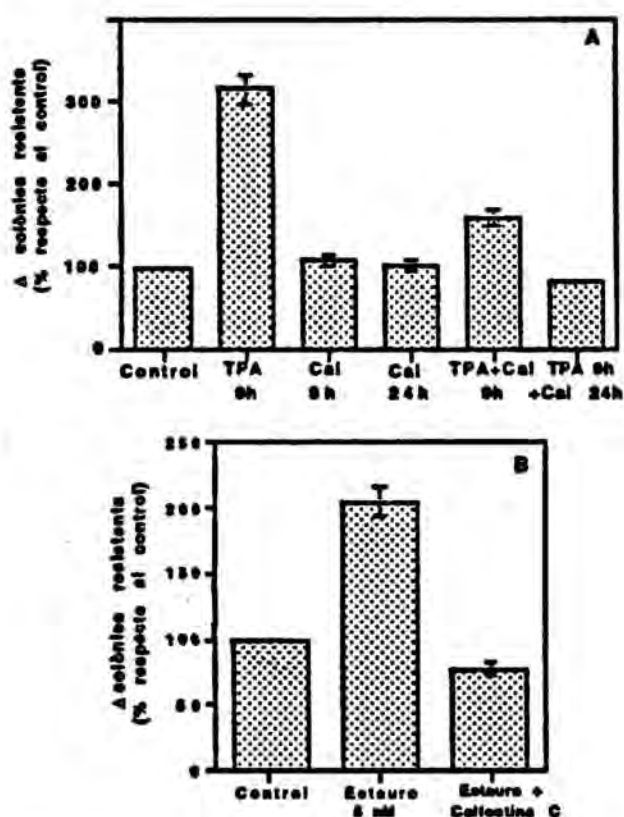
Les cèl·lules K1 es van incubar amb estaurosporina a la concentració de 10 nM durant els períodes de temps indicats. Després del temps d'expressió de 15 hores, es va procedir a la selecció amb MTX a la concentració de  $3 \times 10^{-7}$  M en medi -GHT. Els resultats són la mitja de 3 experiments diferents.

C) Efecte de l'EGTA sobre l'increment de la resistència generat per l'estaurosporina

Les cèl·lules es van preincubar amb EGTA a la concentració de 0.5 mM durant 30 minuts, previament al tractament amb estaurosporina a la concentració de 5 nM durant 9 hores. Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites a la Fig. 17 a.

### 3.3.5. Efecte de la calfofostina C

Per solventar l'efecte agonista de l'estaurosporina, vam utilitzar un altre inhibidor altament específic de la PKC, la calfofostina C (Kobayashi *et al.*, 1989). Aquest inhibidor sòl a la concentració de  $0.1 \mu\text{M}$  no va provocar cap increment en el número de colònies resistents al MTX, tant en incubacions de 9 hores com de 24 hores. La calfofostina C en combinació amb TPA va ésser l'inhibidor més efectiu ja que era capaç de reduir a nivells basals el número de colònies produït per l'incubació amb l'ester de forbol (Fig. 18a).



**Fig. 18 Efecte de la calfofostina C**

A) Efecte de la calfofostina C sobre l'increment en el número de colònies resistents generat pel tractament amb TPA

Les cèl.lules K1 es van incubar amb TPA a la concentració de  $0.3 \mu\text{g/ml}$  durant 9 hores tant en absència com en presència de calfofostina C a la concentració de  $0.1 \mu\text{M}$ , durant 9 o 24 hores. Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites a la Fig. 16 a.

B) Efecte de la calfofostina C sobre l'increment en el número de colònies resistents generat per l'estaurosporina

Les cèl.lules K1 es van preincubar amb calfofostina C a la concentració de  $0.1 \mu\text{M}$  durant 30 minuts, previament al tractament amb estaurosporina a la concentració de  $5 \text{ nM}$  durant 9 hores. La calfofostina C es va mantenir en el medi d'incubació fins a l'inici de la selecció amb MTX. Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites a la Fig. 16 a.

Tanmateix, la preincubació amb calfostina C va bloquejar completament la capacitat d'incrementar el número de colònies resistents per part de l'estaurosporina (Fig.18b).

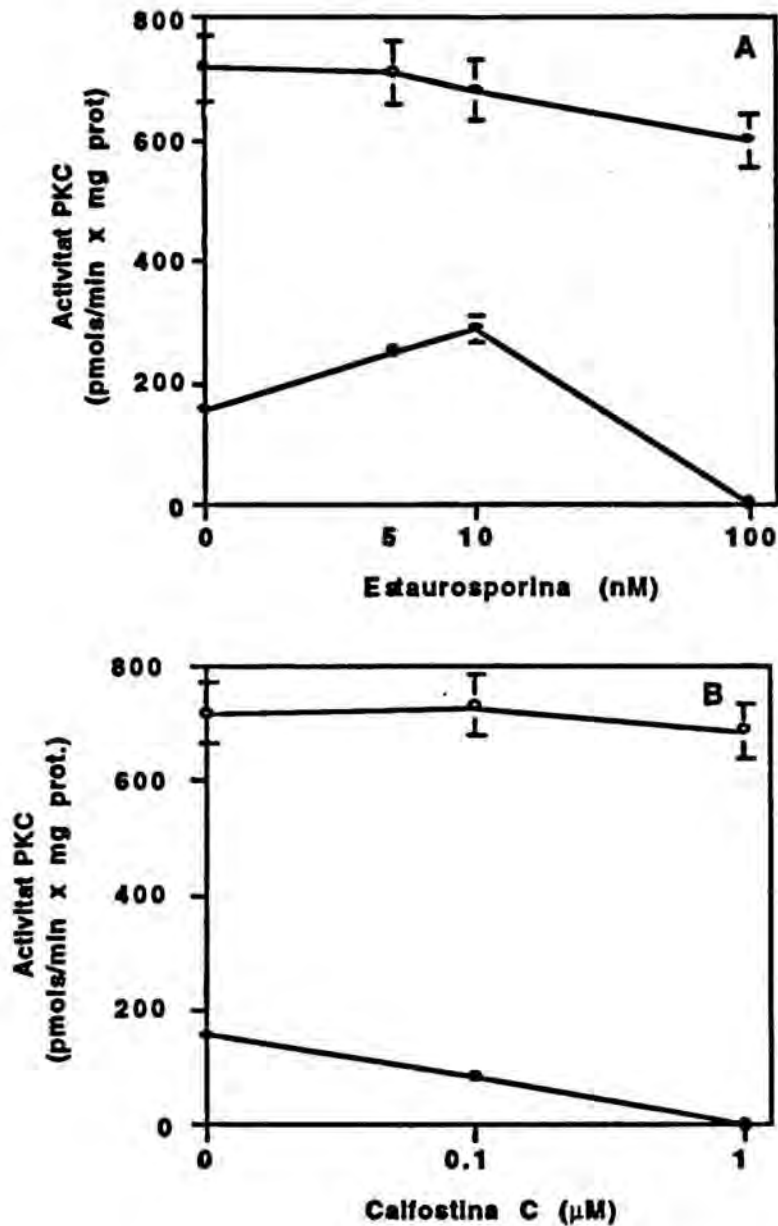
### **3.3.6. Efecte dels inhibidors de la PKC sobre la mateixa activitat en cèl.lules CHO**

#### **3.3.6.1. Efectes produïts en incubació cel.lular**

Ja que s'havia descrit la capacitat de l'estaurosporina de translocar la PKC a les membranes d'eritròcits (Wolf & Baggiolini, 1988) o d'hepatòcits (Díaz-Guerra *et al.*, 1991) vam assajar la translocació de la PKC deguda a l'estaurosporina en cèl.lules CHO.

Vam així determinar que l'estaurosporina a 5-10 nM era capaç, per ella mateixa, de translocar la PKC produint un increment de dues vegades en l'activitat unida a membranes. Tanmateix, l'activitat associada a membranes era totalment abolida quan s'incubaven les cèl.lules amb estaurosporina a 100 nM (Fig. 19a).

A diferència de l'estaurosporina, la calfostina C a concentracions de 0.1 a 1  $\mu$ M no provocava la translocació de la PKC a les membranes i era capaç d'inhibir l'activitat basal associada a la membrana a les incubacions amb les cèl.lules CHO (Fig. 19b).



**Fig.19 Efecte de l'estaurosporina i la calyculin A sobre l'activitat PKC de les cèl.lules K1 de CHO**

**A) Dependència de la concentració d'estaurosporina**

Les cèl.lules K1 es van incubar amb estaurosporina a les concentracions indicades durant 30 minuts, i posteriorment es va determinar l'activitat PKC tant a la fracció citosòlica (○) com a la de membranes (●). Els resultats són la mitja de 3 experiments diferents.

**B) Dependència de la concentració de calyculin A**

Les cèl.lules K1 es van incubar amb calyculin A a les concentracions indicades durant 30 minuts. Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites per la Fig. 19a.



### 3.3.6.2. Efecte produït en extractes cel·lulars

Posteriorment, vam determinar l'efecte dels diferents inhibidors sobre l'activitat PKC en extractes de membranes de cèl·lules CHO incubades amb TPA. A la taula II es mostra que els tres inhibidors assajats (H-7, estaurosporina i calfofostina C) inhibien l'activitat PKC translocada pel TPA, de manera depenent de la dosi.

Taula II  
Efecte *in vitro* dels inhibidors de la PKC

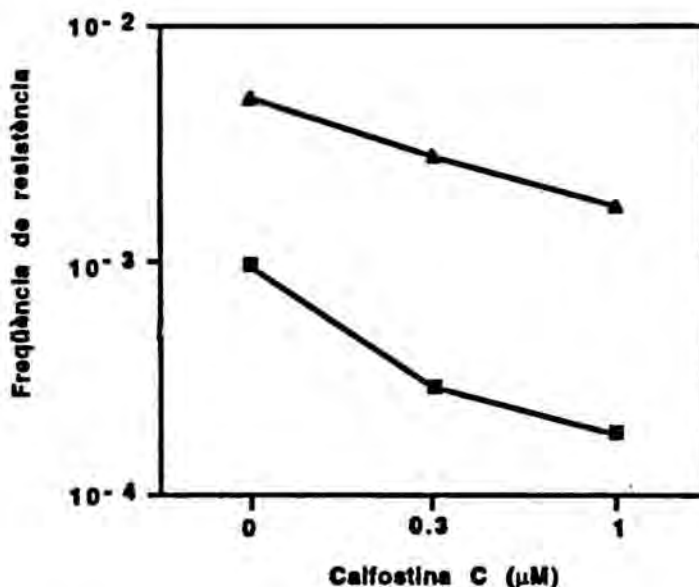
Activitat PKC a la fracció de membranes (pmols/min x mg proteïna)		
Control	156 ± 14	
TPA (0.3 µg/ml, 15 min)	711 ± 55	
		% d'inhibició de l'activitat translocada
+ Inhibidor		
H-7 20 µM	257 ± 18	81
H-7 50 µM	0	100
Estaurosporina 5 nM	595 ± 49	21
Estaurosporina 10 nM	535 ± 40	32
Estaurosporina 100 nM	0	100
Calfofostina C 0.1 µM	618 ± 43	17
Calfofostina C 0.3 µM	576 ± 45	24
Calfofostina C 1 µM	458 ± 35	45

Es van incubar cèl·lules CHO amb TPA (0.3 µg/ml) durant 15 minuts i posteriorment, es van sotmetre al fraccionament subcel·lular. L'activitat PKC es va determinar tal com es descriu a la secció de Materials i Mètodes, en l'absència o presència dels inhibidors de la PKC a les concentracions indicades. Els inhibidors es van afegir a la barreja de reacció i es van incubar amb al·lotes de membranes obtingudes de les cèl·lules tractades amb TPA. Els resultats són la mitja de 3 experiments diferents.

L'estaurosporina a 5-10 nM va ésser capaç d'inhibir parcialment (20-30%) l'activitat PKC translocada pel TPA, efecte que podria explicar la contrarrestació amb aquesta concentració d'estaurosporina sobre l'increment en el número de colònies resistents generat pel TPA. La calfostina C a 0.1-1  $\mu$ M també inhibia en una proporció del 15-20% l'activitat PKC translocada pel TPA.

### 3.3.7. Efecte de la calfostina C en condicions basals

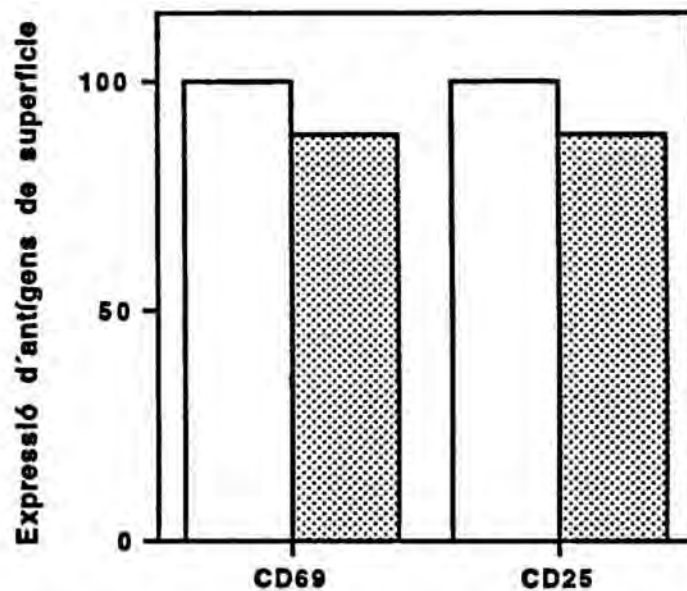
Finalment, vam explorar la capacitat potencial de la calfostina C per reduir la resistència al MTX en absència del TPA. Degut a la baixa freqüència de colònies resistents trobada a la concentració de MTX de  $3 \times 10^{-7}$  M, vam disminuir la concentració de MTX en la selecció a  $2 \times 10^{-7}$  M i  $10^{-7}$  M per sensibilitzar el mètode. En aquestes condicions, la presència de calfostina C a  $3 \times 10^{-7}$  M o  $10^{-6}$  M durant 6 dies, tractament que no afectava a la supervivència cel.lular, va comportar una reducció significativa de la resistència basal al MTX (Fig. 20).



**Fig. 20 Efecte de la calfostina C sobre la resistència basal al MTX**

Les cèl.lules K1 es van incubar a les concentracions indicades de calfostina C durant 6 dies, en presència de MTX a les concentracions de  $10^{-7}$  M (▲) i  $2 \times 10^{-7}$  M (■). La selecció amb MTX es va mantenir fins al desenvolupament de colònies visibles (3 setmanes). Els resultats són la mitja de 3 experiments diferents.

Per estudiar la possible aplicació de la calfofostina C en clínica com a coadjuvant en la teràpia amb MTX, estem realitzant experiments amb limfòcits humans per avaluar la seva resposta al tractament amb calfofostina C. Hem observat que els limfòcits humans no presenten alteracions de la seva viabilitat i funcionalitat quan es tracten amb calfofostina C a una concentració de  $10^{-7}$  M durant 24 hores (Fig. 21). L'avaluació de la viabilitat i la funcionalitat dels limfòcits control i tractats amb calfofostina C es va realitzar mitjançant la determinació de l'expressió de dos antigens de superfície, CD69 i CD25.



**Fig. 21 Expressió d'antigens de superfície en limfòcits humans**

Es van tractar limfòcits humans amb calfofostina C a la concentració de  $0.1 \mu\text{M}$  durant 24 hores i posteriorment, es va determinar l'expressió dels antigens de superfície CD69 i CD25 mitjançant citometria de fluxe, tot utilitzant anticossos monoclonals marcats amb ficoeritrina i tant en limfòcits control sense tractar amb calfofostina C (barres buides) com en els limfòcits tractats amb aquest inhibidor de la PKC (barres plenes). Els resultats són la mitja de 3 experiments diferents.

### 3.4. LIPOPEROXIDACIO

L'àcid araquidònic i alguns dels seus metabolits derivats de la via de la lipoperoxidació són capaços d'activar la PKC a diferents tipus cel.lulars (Shearman *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1991; Hii *et al.*, 1995). Vam per tant decidir assajar l'efecte d'aquests agents sobre la resistència al MTX, per determinar si el seu comportament era anàleg a l'observat amb el TPA.

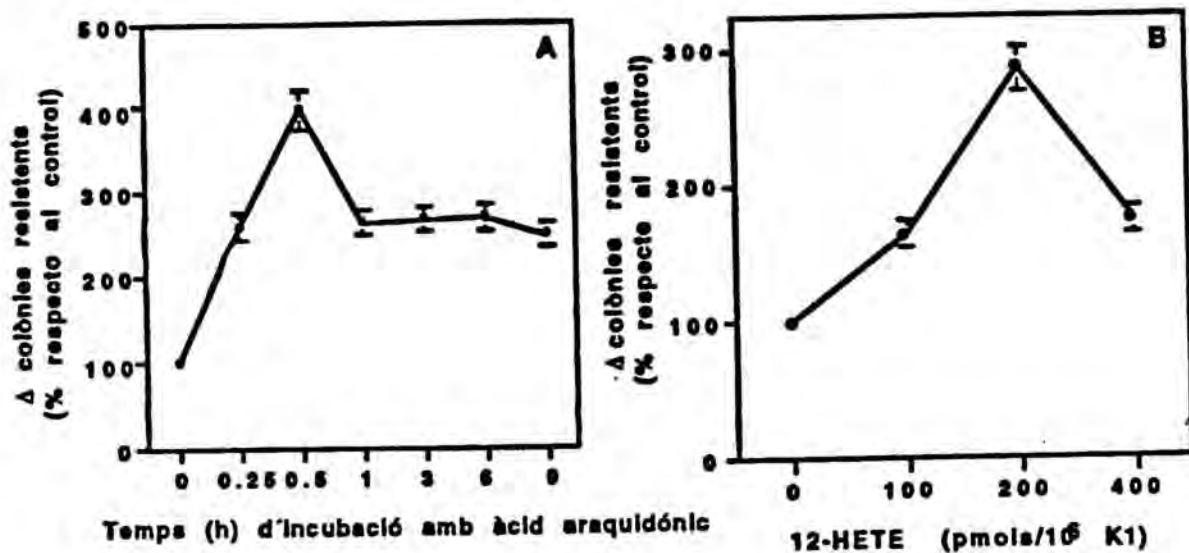
#### 3.4.1. Efecte de l'àcid araquidònic i el 12-HETE sobre la resistència al MTX

En primer lloc vam establir que la concentració màxima d'àcid araquidònic que no afectava la viabilitat cel.lular en incubacions de 24 hores era de 100  $\mu$ M. Aquesta concentració va ésser l'utilitzada posteriorment per establir si l'àcid araquidònic era capaç d'incrementar el número de colònies resistents al MTX, i si aquest efecte era depenent del temps d'incubació amb àcid araquidònic.

Com es pot observar a la Fig. 22a, l'incubació amb àcid araquidònic va comportar un increment en el número de colònies resistents al MTX fins a un màxim de 4 vegades respecte al control amb 30 minuts de tractament.

Posteriorment, vam assajar l'efecte sobre la resistència al MTX de l'àcid 12-hidroieicosatetraenoïc (12-HETE), un metabolit generat en la lipoperoxidació de l'àcid araquidònic.

El 12-HETE va provocar un increment en el número de colònies resistents al MTX, depenent de la concentració assajada, amb un màxim a 200 pmols/10<sup>6</sup> K1, a un temps d'incubació fixe de 9 hores (Fig. 22b).



**Fig. 22** Efecte de l'àcid araquidònic i el 12-HETE sobre el número de colònies resistents al MTX

**A)** Dependència del temps d'incubació amb àcid araquidònic

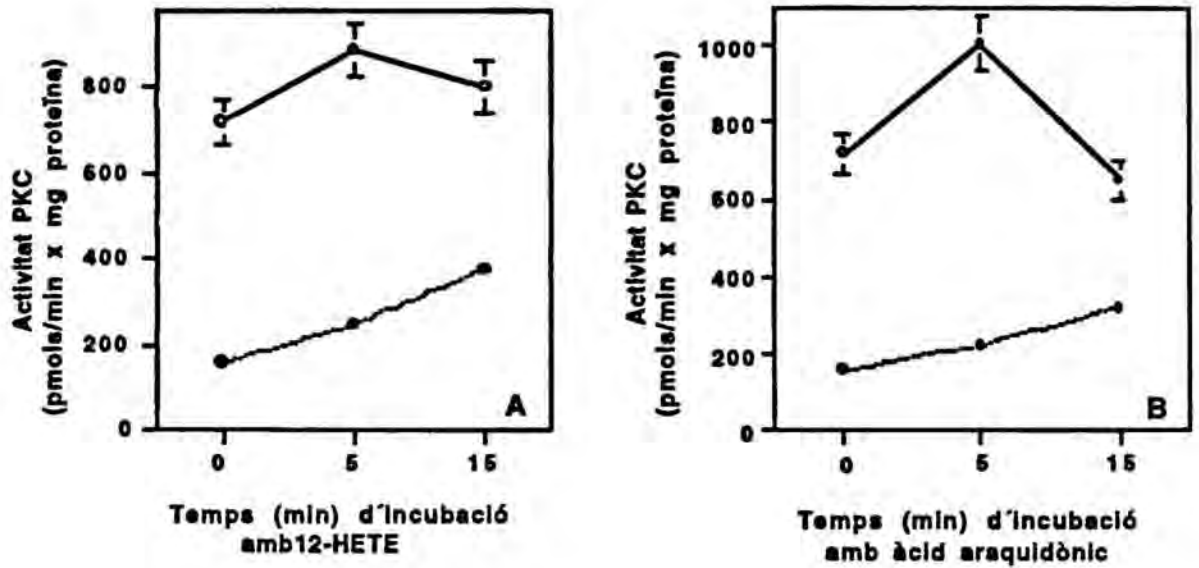
Les cèl.lules K1 es van tractar amb àcid araquidònic a la concentració de 100  $\mu$ M durant els períodes de temps indicats, i després del temps d'expressió de 15 hores, es va procedir a la selecció amb MTX a la concentració de  $3 \times 10^{-7}$  M, fins al desenvolupament de colònies resistents visibles. Els resultats són la mitja de 3 experiments diferents.

**B)** Dependència de la concentració de 12-HETE

Les cèl.lules es van incubar amb les concentracions indicades de 12-HETE durant 9 hores. Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites a la Fig. 22 a.

### 3.4.2. Efecte de l'àcid araquidònic i el 12-HETE sobre l'activitat PKC de les cèl.lules CHO

Ja que tant l'àcid araquidònic com el 12-HETE eren capaços d'incrementar el número de colònies resistents al MTX, vam procedir a determinar el seu efecte sobre l'activitat PKC de les cèl.lules K1 de CHO. Les cèl.lules es van tractar amb àcid araquidònic a la concentració de 100  $\mu$ M o amb 12-HETE a la concentració de 200 pmols/10<sup>6</sup> cèl.lules i posteriorment es van processar per a la determinació de l'activitat PKC. Tal com es mostra a la Fig. 23a i b, aquests dos efectors incrementen l'activitat de la PKC tant a la fracció de les membranes com a la del citosol, d'una manera dependent del temps d'incubació amb els efectors.



**Fig. 23** Efecte del 12-HETE i de l'àcid araquidònic sobre l'activitat PKC de les cèl.lules CHO

A) Dependència del temps d'incubació amb 12-HETE

Les cèl.lules K1 es van tractar amb 12-HETE a la concentració de 200 pmols/ $10^6$  cèl.lules durant els períodes de temps indicats, i posteriorment es va procedir a la determinació de l'activitat PKC, tant a la fracció citosòlica (○) com a la de membranes (●). Els resultats són la mitja de 2 experiments.

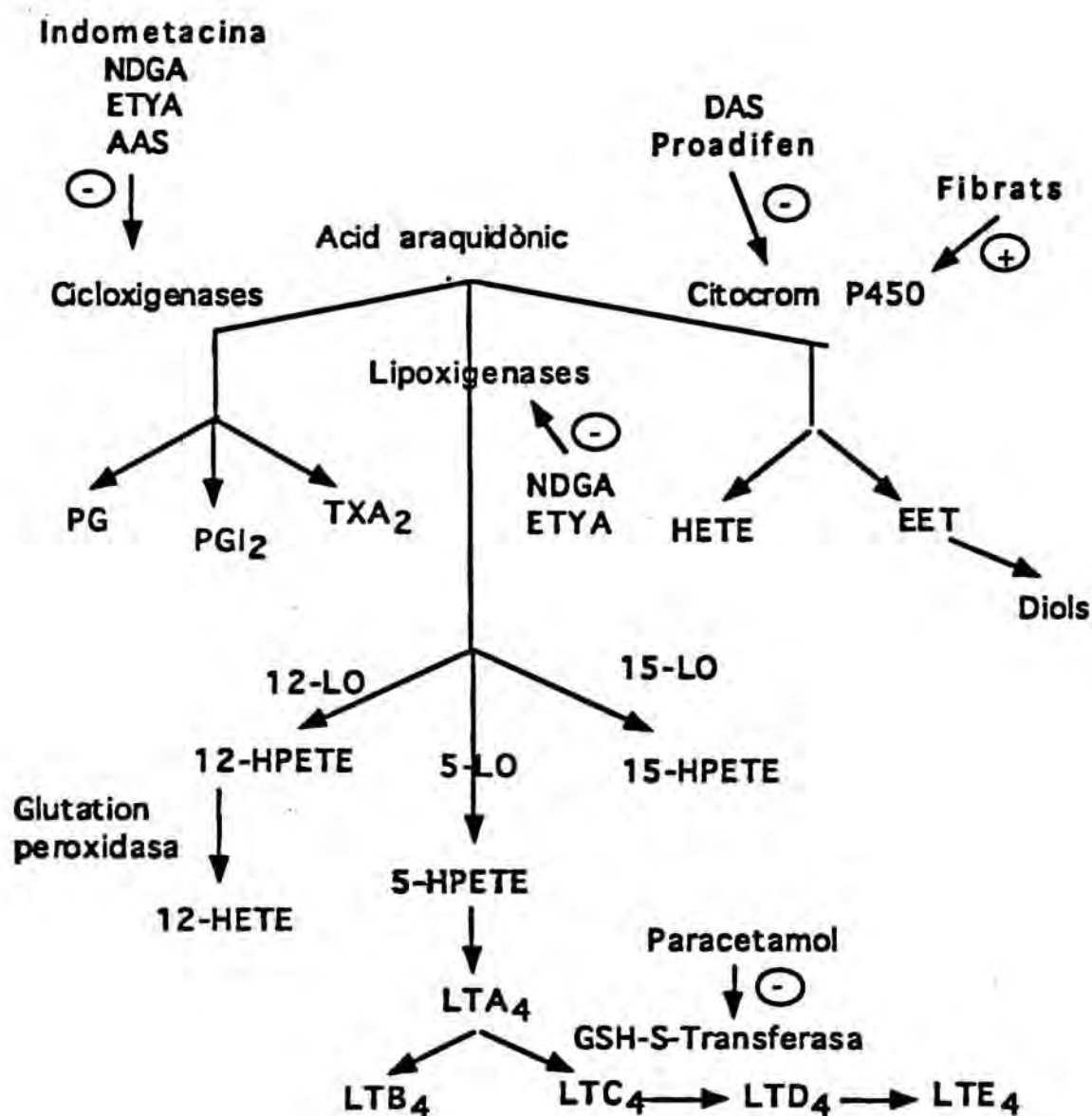
B) Dependència del temps d'incubació amb àcid araquidònic

Les cèl.lules K1 es van tractar amb àcid araquidònic a la concentració de 100  $\mu$ M durant els períodes de temps indicats. Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites a la Fig. 23 a.

### 3.4.3. Efecte d'inhibidors de la lipoperoxidació sobre l'increment de la resistència al MTX generat per l'àcid araquidònic

Donat que l'àcid araquidònic i el 12-HETE són capaços d'incrementar el número de colònies resistents al MTX i d'activar la PKC, l'inhibició de la lipoperoxidació comportaria l'inhibició indirecta de la PKC ja que no es sintetitzarien alguns dels seus activadors endògens, i podria reduir el número de colònies resistents generat pel tractament amb àcid araquidònic.

Amb aquestes premises, vam procedir a incubar les cèl.lules K1 amb diferents inhibidors de la lipoperoxidació. Els inhibidors assajats van ésser el sulfòxid de dial.lil (DAS), el proadifen, i el paracetamol (Esquema 3).



ESQUEMA 3. METABOLISME DE L'ÀCID ARAQUIDONIC

El DAS és un derivat natural de l'all que té la capacitat d'inhibir la carcinogenèsi induïda per diferents carcinògens químics, possiblement per inhibició competitiva i inactivació del citocrom P450-IIEl (Brady et al., 1988).

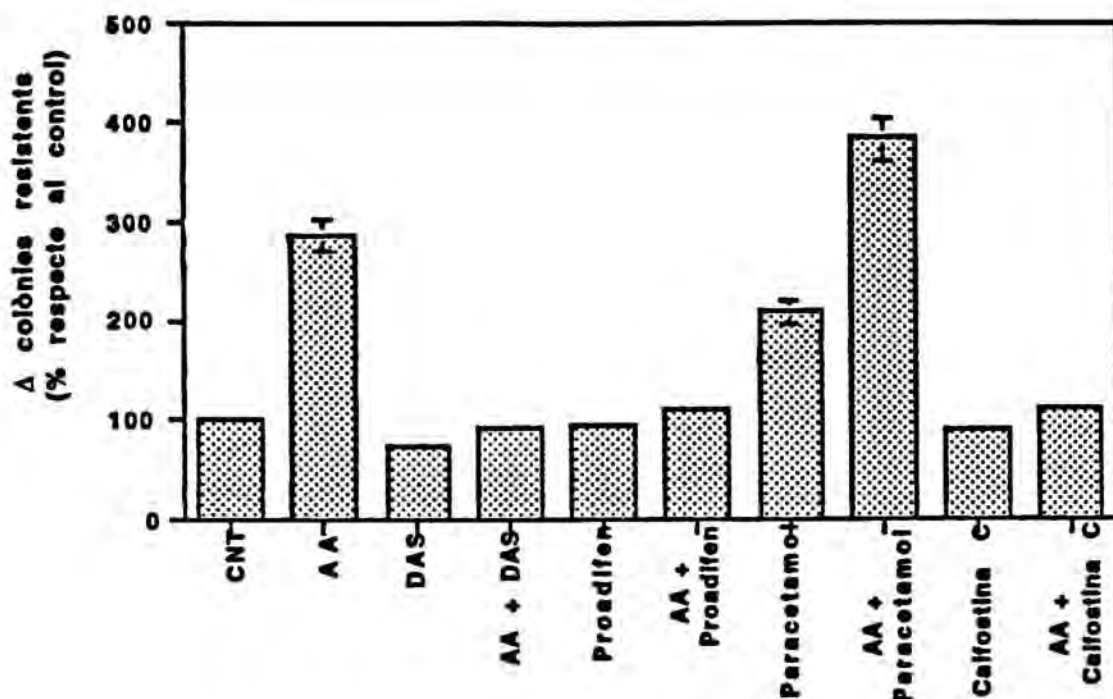
El proadifen també actua per inhibició del citocrom P450, i el paracetamol, a dosis elevades, inhibeix l'activitat glutathion-S-transferasa. Tots aquests inhibidors es van utilitzar a concentracions que no afectaven la viabilitat cel.lular en incubacions de 24 hores.

Vam observar que l'inhibició de l'activitat del citocrom P450, tant per acció del DAS a la concentració de 50  $\mu\text{M}$  com del proadifen a la concentració de 10  $\mu\text{M}$ , permetia contrarrestar l'increment en el número de colònies generat per l'àcid araquidònic (Fig. 24).

En la mateixa direcció, la calfostina C a la concentració de 0.1  $\mu\text{M}$  també va resultar molt efectiva en la contrarrestació de l'efecte de l'àcid araquidònic.

El paracetamol és capaç d'inhibir l'activitat glutathion-S-transferasa, un enzim intimament realcionat amb els processos de detoxificació de molts agents carcinògens (Chasseaud, 1979; Sparnins et al., 1982). Hem observat que el tractament de les cèl.lules K1 amb paracetamol a la concentració de 1 mM, provoca un increment considerable en el número de colònies resistents al MTX, i en combinació amb l'àcid araquidònic es produeix un efecte additiu dels dos agents sobre la resistència al MTX (Fig. 24).





**Fig. 24 Efecte d'inhibidors del metabolisme de l'àcid araquidònic sobre l'increment de la resistència al MTX generat per aquest efector**

Les cèl.lules K1 es van preincubar amb DAS a la concentració de  $50 \mu\text{M}$ , amb proadifen a la concentració de  $10 \mu\text{M}$ , amb calfoestina C a la concentració de  $0.1 \mu\text{M}$  o amb paracetamol a la concentració de  $1 \text{mM}$  durant 30 minuts, previament al tractament amb àcid araquidònic a la concentració de  $100 \mu\text{M}$  durant 30 minuts. Els diferents inhibidors es van mantenir en el medi d'incubació durant el temps d'expressió, fins a l'inici de la selecció amb MTX a la concentració de  $3 \times 10^{-7} \text{M}$ . La selecció es va realitzar durant 3 setmanes fins a l'obtenció de colònies resistents visibles, que es van tenyir i comptar. Els resultats són la mitja de 3 experiments.

## ESTUDI DE LA REGULACIO DEL PROMOTOR DEL GEN *dhfr* EN LA PROLIFERACIO CEL.LULAR

### 3.5. ESTRUCTURA DEL PROMOTOR MINIM DEL GEN *dhfr* I DELS MUTANTS DERIVATS

El gen *dihidrofolat reductasa* (*dhfr*) pertany a la categoria dels gens constitutius i s'expressa a totes les cèl.lules. Encara que la seva expressió sigui molt ample, aquest gen es troba sotmés a un gran control, a nivell transcripcional i post-transcripcional, amb dependència del cicle cel.lular.

El gen *dhfr* de hamster utilitza múltiples llocs d'inici de la transcripció, i entre ells, els dos predominants són l'inici menor de la transcripció localitzat a -107 bp respecte a l'inici de la traducció i l'inici major a -63 bp.

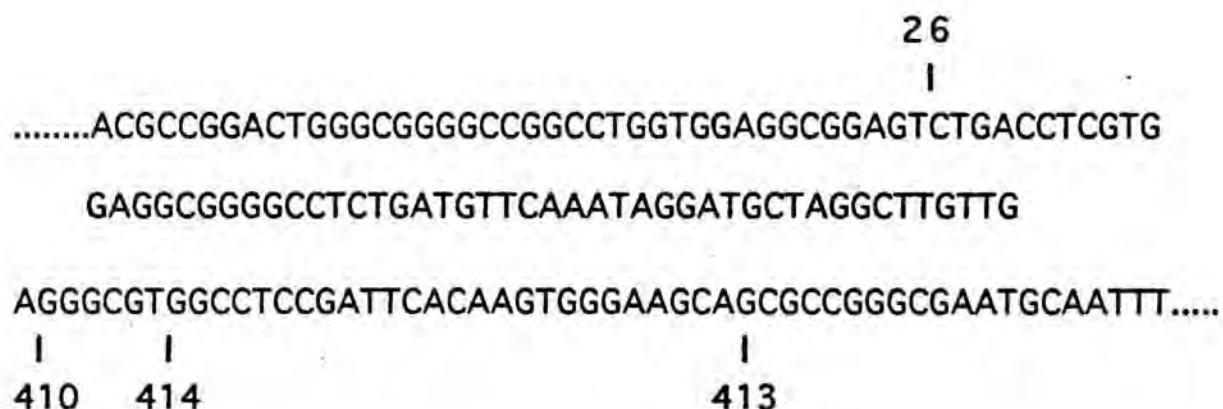
El promotor del gen *dhfr* no conté la caixa TATA, necessària per a un inici normal de la transcripció a molts gens d'eucariotes (Dyran, 1986). Tanmateix, aquest promotor conté varies caixes que es troben suposadament implicades en el control de l'inici de la transcripció en eucariotes: 3 caixes GC distals riques en C, 4 caixes GC proximals riques en G i 2 caixes CAA. La presència d'aquestes seqüències al promotor del gen *dhfr* fan d'aquest gen un possible candidat per a la regulació a través del factor de transcripció Sp1, que s'uneix a les caixes GGGCGG (Dyran et Tjian, 1985).

Els fragments del promotor del gen *dhfr* utilitzats al llarg d'aquest treball deriven del minigen, pDCH1P, que conté 900 bp del promotor, els 6 exons, el primer intró i el senyal de poliadenilació amb un tamany total aproximat de 2 kb. A partir d'aquest minigen es van obtenir mutants per delecció de la regió promotora tot utilitzant la exonucleasa BAL31.

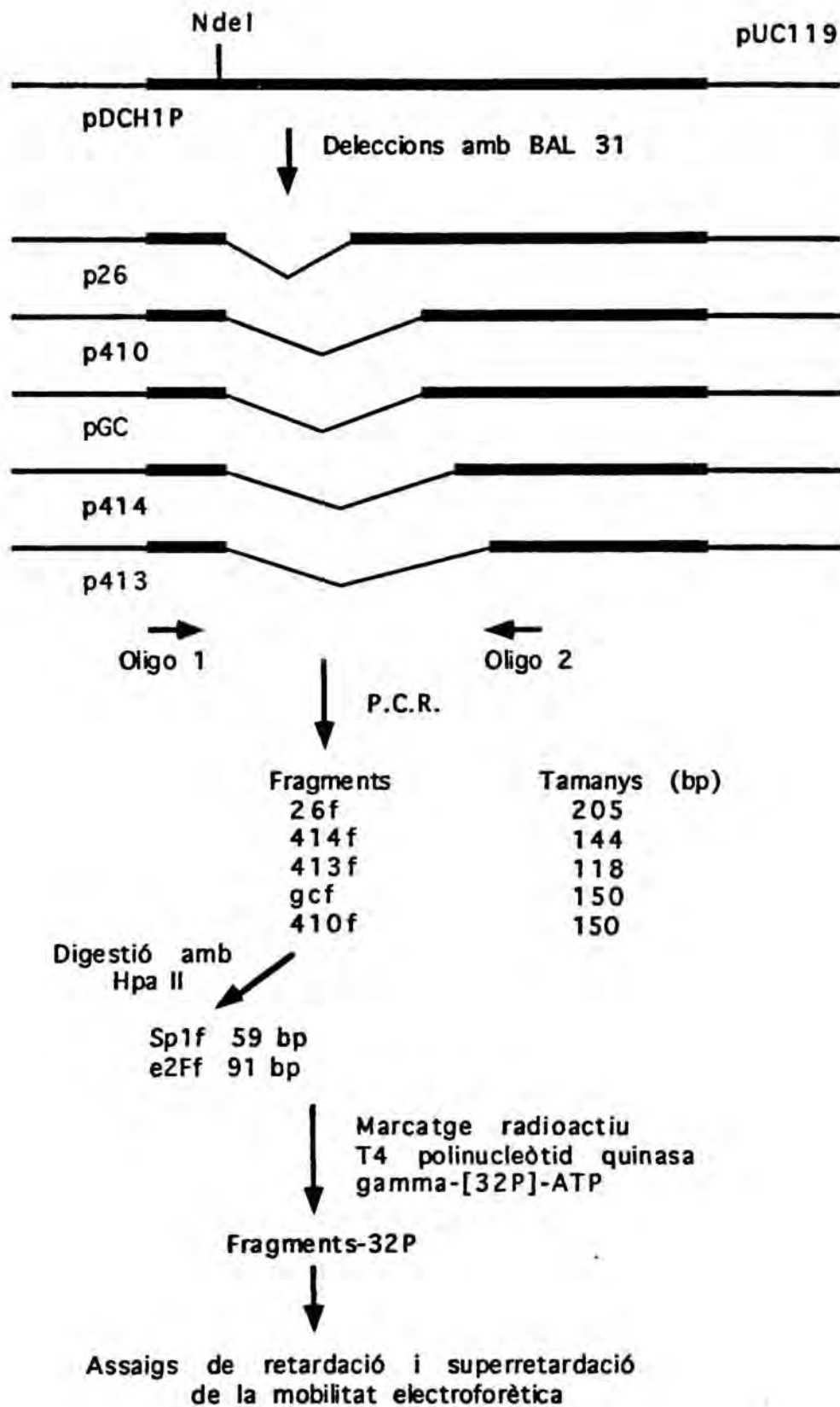
Així, el mutant p26 conté la regió 5' a partir de -166 respecte a l'inici de la traducció, el mutant p410 des de -111, el mutant p414 des de -105 i el mutant p413 des de -79 (Ciudad *et al.*, 1988). Els mutants p414 i p413 es caracteritzen per l'absència de la caixa GC proximal d'unió del factor Sp1, el mutant p410 conté només una caixa GC i el mutant p26 dues.

A partir d'aquesta serie de mutants es van obtenir els fragments que serien utilitzats com a sondes mitjançant reaccions de P.C.R.

A l'esquema 4 es mostra l'origen de les diferents sondes emprades en els assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica, així com la part de la seqüència que diferencia als mutants p26, p410, p414 i p413 entre ells.



ESQUEMA 4A. DELECCIONS EN EL PROMOTOR DEL GEN *dhfr*.



ESQUEMA 4B. OBTENCIO DE LES SONDAS

## 3.6. ASSAIGS DE RETARDACIO DE LA MOBILITAT ELECTROFORETICA

### 3.6.1. Assaigs amb el fragment 410f

El promotor mínim del gen *dhfr* o 410f correspon a un fragment de 150 bp que conté les seqüències de reconeixement per als factors de transcripció Sp1 i E2F (Ciudad *et al.*, 1992). Aquest fragment marcat radioactivament va ésser utilitzat com a sonda en els assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb extractes nuclears de cèl.lules K1 en fase de creixement exponencial. La interacció de les proteïnes nuclears amb la sonda 410f va originar tres bandes retardades com es pot observar a la Fig. 25a.

Per identificar el factor responsable d'aquestes interaccions, vam procedir a realitzar el mateix assaig de retardació, però aquesta vegada amb la sonda *gcf*, que difereix del fragment 410f en una mutació puntual (G-C) a la cinquena posició de l'hexanucleòtid GGGCGG, centre d'unió del factor Sp1. Amb la sonda *gcf* no es va observar cap banda retardada per interacció amb l'extracte nuclear provinent de cèl.lules K1 en creixement exponencial (Fig. 25b).

Posteriorment, es va realitzar un assaig de competició amb la sonda 410f i el mateix fragment 410f no marcat en quantitats creixents. Es van afegir a la barreja de reacció quantitats de fragment 410f equivalents a 50 i 100 vegades la quantitat de sonda 410f radioactiva present a la reacció. L'addició de 50 o 100 vegades el fragment 410f va comportar una reducció de l'ordre del 75% i 95%, respectivament, en la retardació originada amb la sonda 410f (Fig. 25c).

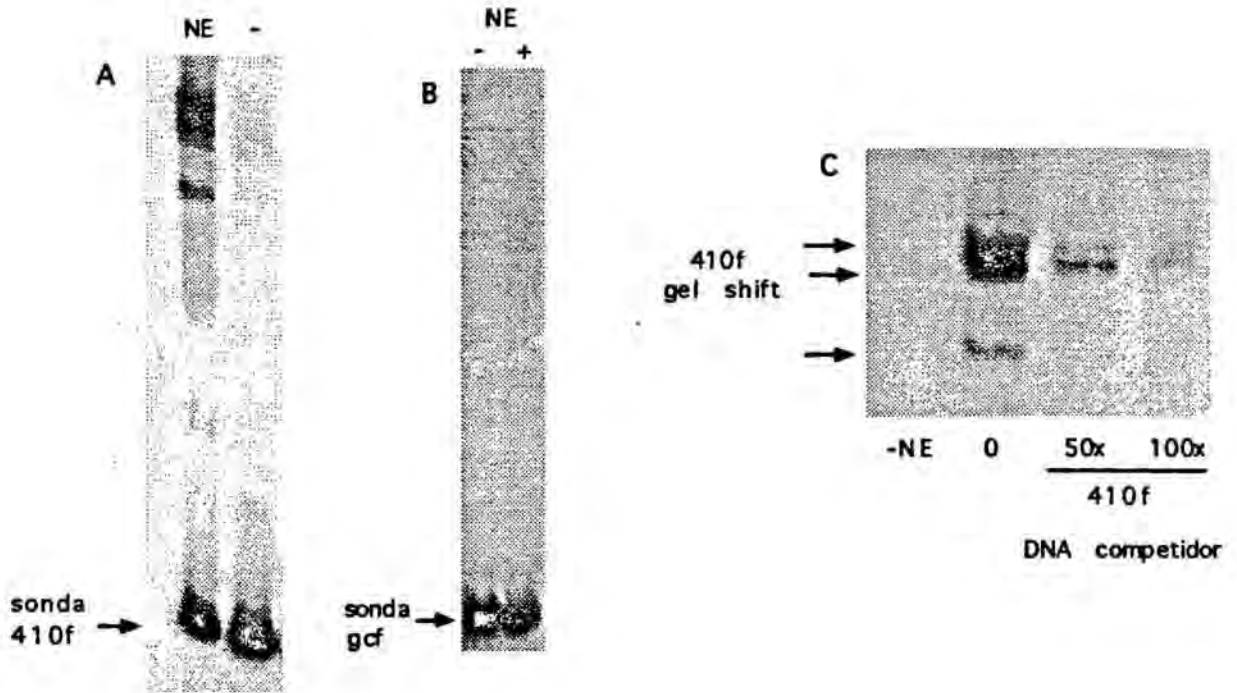


Fig. 25 Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb les sondes 410f i gcf

A) Assaig de retardació de la mobilitat electroforètica amb la sonda 410f

La sonda 410f (20.000 cpm/reacció) es va barrejar sense o amb 2  $\mu$ g d'extracte nuclear obtingut de cèl.lules K1 de CHO en creixement exponencial, en presència de 2  $\mu$ g de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic.

B) Assaig amb la sonda gcf

La sonda gcf (20.000 cpm/reacció), que presenta una mutació puntual a la caixa GC d'unió per al factor de transcripció Sp1, es va incubar en absència o en presència de 2  $\mu$ g d'extracte nuclear obtingut de cèl.lules K1 de CHO en creixement exponencial, tot utilitzant 2  $\mu$ g de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic.

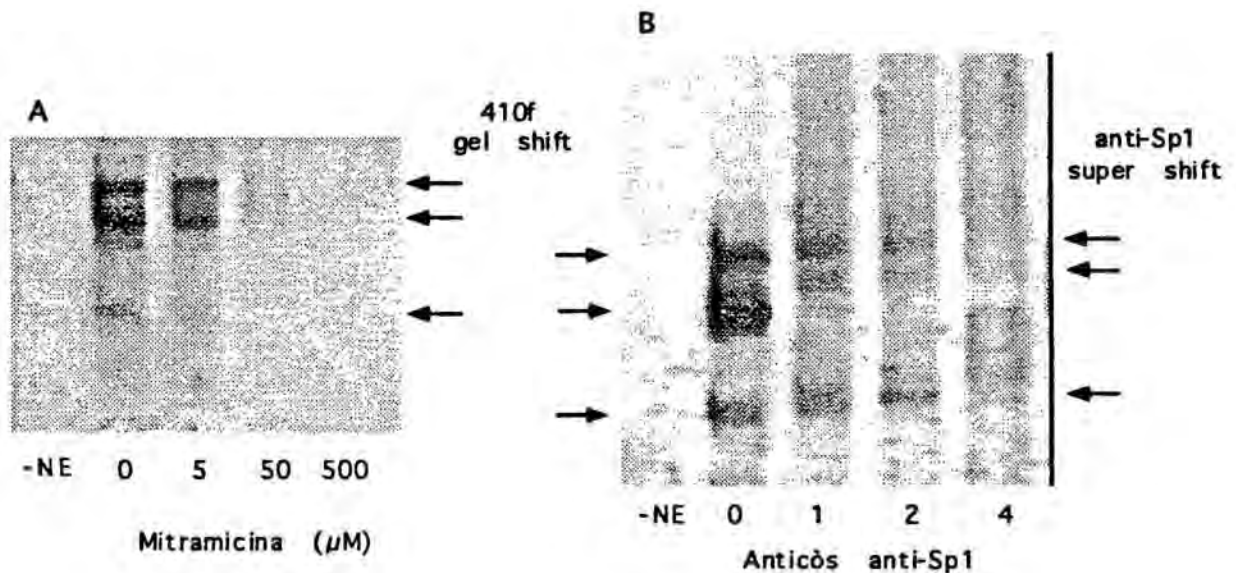
C) Competicions de la sonda 410f amb el fragment 410f sense marcar

Es van afegir les quantitats indicades de fragment 410f sense marcar a la barreja de reacció en presència de 2  $\mu$ g d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial, 15 minuts abans de l'addició de la sonda radioactiva. Cada reacció es va realitzar en presència de 2  $\mu$ g de poli(dI-dC). Les bandes retardades originades per l'interacció de la sonda amb l'extracte nuclear es senyalen amb fletxes a la figura.

Altres assaigs per establir l'identitat del factor que s'unia a la sonda 410f van consistir en la realització de l'assaig de retardació amb aquesta sonda en presència de mitramicina, una droga que s'uneix al DNA a nivell de les seqüències GC (Snyder *et al.*, 1991), que són precisament les que constitueixen la seqüència de reconeixement per al factor Sp1. En presència de mitramicina a concentracions creixents des de 5  $\mu$ M fins a 500  $\mu$ M, es va produir una reducció en la unió de proteïnes

nuclears a la sonda 410f, depenent de la concentració de mitramicina emprada (Fig.26a).

Finalment, es va procedir a un assaig de superretardació de la mobilitat electroforètica utilitzant l'antisèrum contra la proteïna Sp1, 2892-E. La presència de quantitats creixents de l'anticòs contra Sp1 a la barreja de reacció va provocar una superretardació de les tres bandes que s'originaven per interacció de la sonda 410f amb l'extracte nuclear (Fig.26b) i posteriorment la desaparició de les bandes retardades.



**Fig. 26 Caracterització del factor de transcripció que s'uneix a la sonda 410f**  
**A) Assaig amb la sonda 410f en presència de concentracions creixents de mitramicina**  
 La sonda 410f es va incubar amb les concentracions indicades de mitramicina durant 15 minuts, previament a la reacció amb 2 μg d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial i tot utilitzant 2 μg de poli(di-dC) com a DNA inespecífic.  
**B) Superretardació de la sonda 410f en presència d'un anticòs específic contra Sp1**  
 Es van afegir les quantitats indicades de l'anticòs 2892-E a la barreja de reacció en presència de la sonda marcada i l'extracte nuclear. La barreja es va incubar durant 15 minuts a 4 °C abans de procedir a l'electroforèsi en un gel al 4% de poliacrilamida i al 5% de glicerol.

Tots aquests resultats indicaven que el principal factor de transcripció que interaccionava amb la sonda 410f era el factor Sp1.

### 3.6.2. Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb els fragments 26f, 414f, i 413f

Posteriorment, es va realitzar l'assaig de retardació de la mobilitat electroforètica amb la sonda 26f de 205 bp, que conté dues caixes d'unió per al factor Sp1. L'interacció d'aquesta sonda amb les proteïnes nuclears provinents de cèl.lules K1 en fase de creixement exponencial va originar un patró de bandes retardades equivalent a l'obtingut amb la sonda 410f (Fig. 27a).

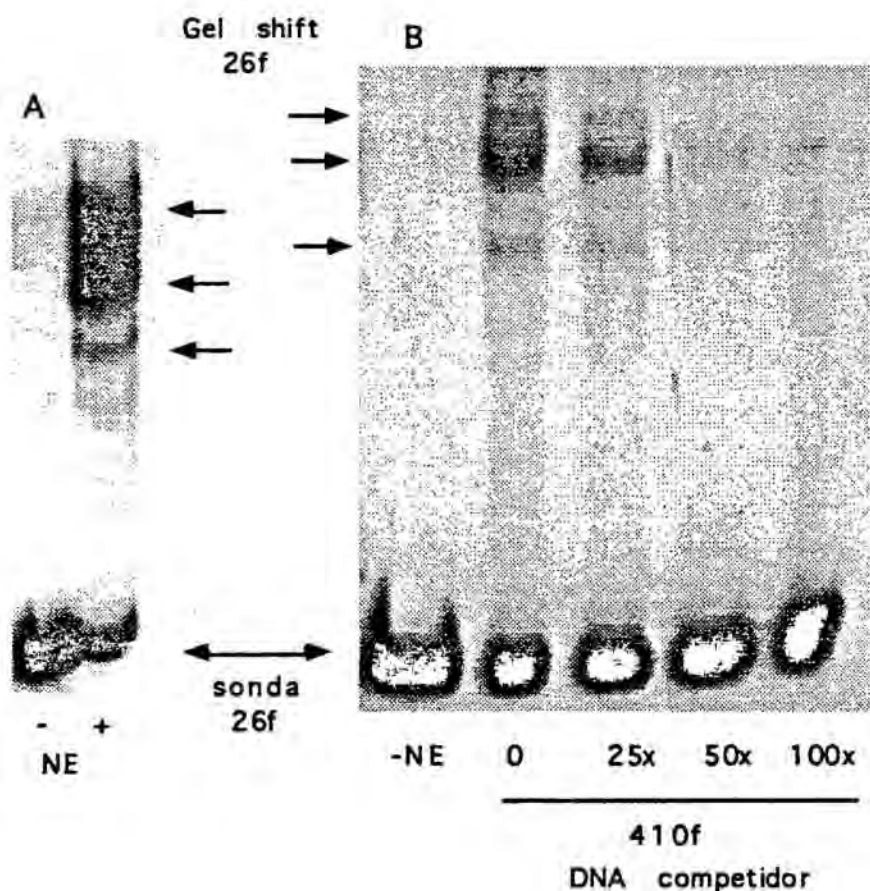


Fig. 27 Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb la sonda 26f  
A) Assaig amb la sonda 26f

La sonda 26f (20.000 cpm/reacció) es va incubar en absència o en presència de 2  $\mu$ g d'extracte nuclear obtingut de cèl.lules K1 de CHO en creixement exponencial, tot utilitzant 2  $\mu$ g de poli(dl-dC) com a DNA inespecífic. Les bandes retardades així originades s'indiquen amb fletxes a la figura.

B) Competició de la sonda 26f amb quantitats creixents del fragment 410f sense marcar  
Els extractes nuclears es van incubar amb les quantitats indicades de fragment 410f sense marcar durant 15 minuts, previament a l'addició de la sonda 26f, en presència de 2  $\mu$ g de poli(dl-dC) com a DNA inespecífic.



Tanmateix, la unió de proteïnes nuclears a la sonda 26f va ésser competida de manera molt efectiva amb l'addició de quantitats creixents del fragment 410f no marcat, el que sugereix que cap factor de transcripció addicional s'uneix a la seqüència suplementària del promotor que forma part de la sonda 26f, i que no es troba present a la sonda 410f. A la Fig. 27b, es mostra el resultat de l'experiment de competició utilitzant quantitats de fragment 410f equivalents a 25, 50 i 100 vegades la quantitat de sonda 26f, respectivament.

També es van utilitzar les sondes 414f, de 144 bp i 413f, de 118 bp, que tenen deleccionada la caixa GC proximal, en assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb extractes nuclears de cèl.lules K1 en creixement exponencial. En els dos casos, no es va observar cap banda retardada per l'interacció entre la sonda i l'extracte nuclear (Fig.28a).

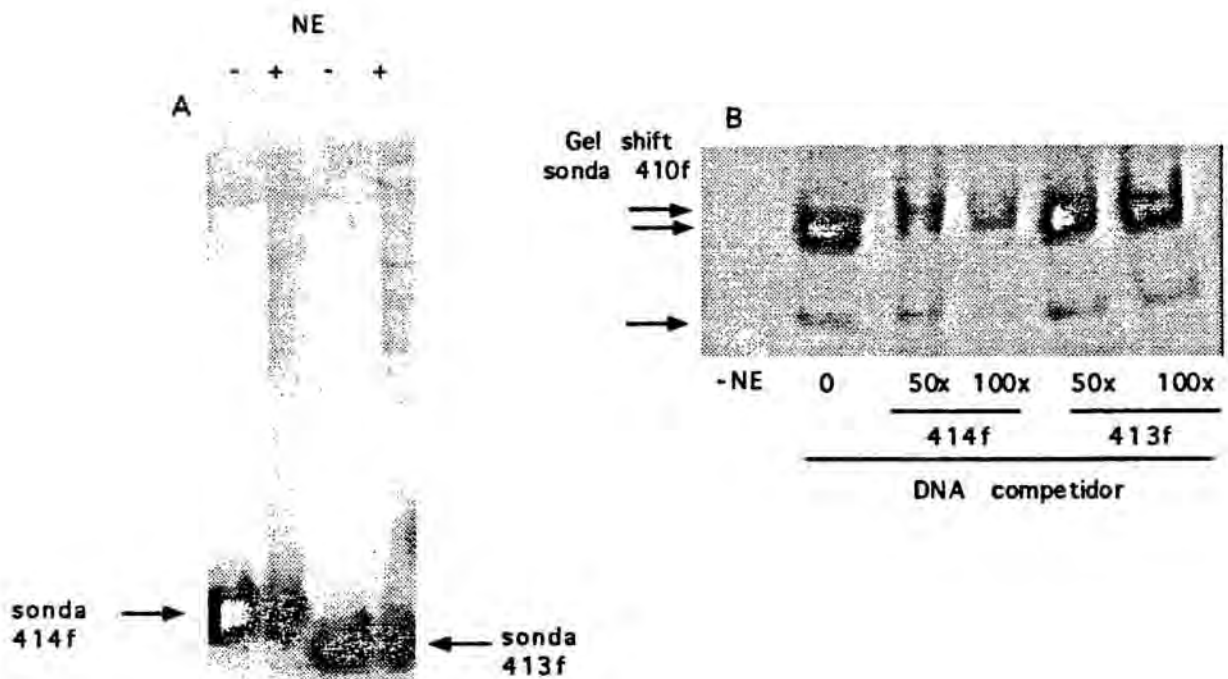


Fig. 28 Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb les sondes 414f i 413f

A) Assaigs amb les sondes 414f i 413f

Les sondes 414f o 413f (20.000 cpm/reacció) es van incubar en absència o en presència de 2  $\mu$ g d'extracte nuclear obtingut de cèl.lules K1 de CHO en creixement exponencial, tot utilitzant 2  $\mu$ g de poli(dl-dC) com a DNA inespecífic.

B) Competicions de la sonda 410f amb els fragments 414f i 413f sense marcar

Els extractes nuclears es van incubar amb les quantitats indicades dels fragments 414f o 413f sense marcar durant 15 minuts, previament a l'addició de la sonda 410f, en presència de 2  $\mu$ g de poli(dl-dC) com a DNA inespecífic.

En els experiments de competició, però, el fragment 414f no marcat va ésser capaç de competir la unió generada amb la sonda 410f radioactiva, tant quan s'afegia en una quantitat equivalent a 50 com a 100 vegades la quantitat de sonda 410f utilitzada en l'assaig (Fig.28b). Aquest resultat podria explicar-se pel fet que la regió extesa consensus de reconeixement de Sp1 inclou, a més de l'hexanucleòtid GGGCGG, una seqüència adjacent GGC (Kadonaga *et al.*, 1986), que sí es troba present al fragment 414f. Per tant, un excés de 414f podria interferir amb una unió eficient de Sp1. A diferència del fragment 414f, el fragment 413f, corresponent a un mutant més deleccionat en la direcció 3', no va competir la unió resultant amb la sonda 410f. Aquests resultats corroboren els obtinguts en l'apartat anterior sobre la capacitat de Sp1 per unir-se al promotor del gen *dhfr*.

### 3.6.3. Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb els fragments Sp1f i e2Ff

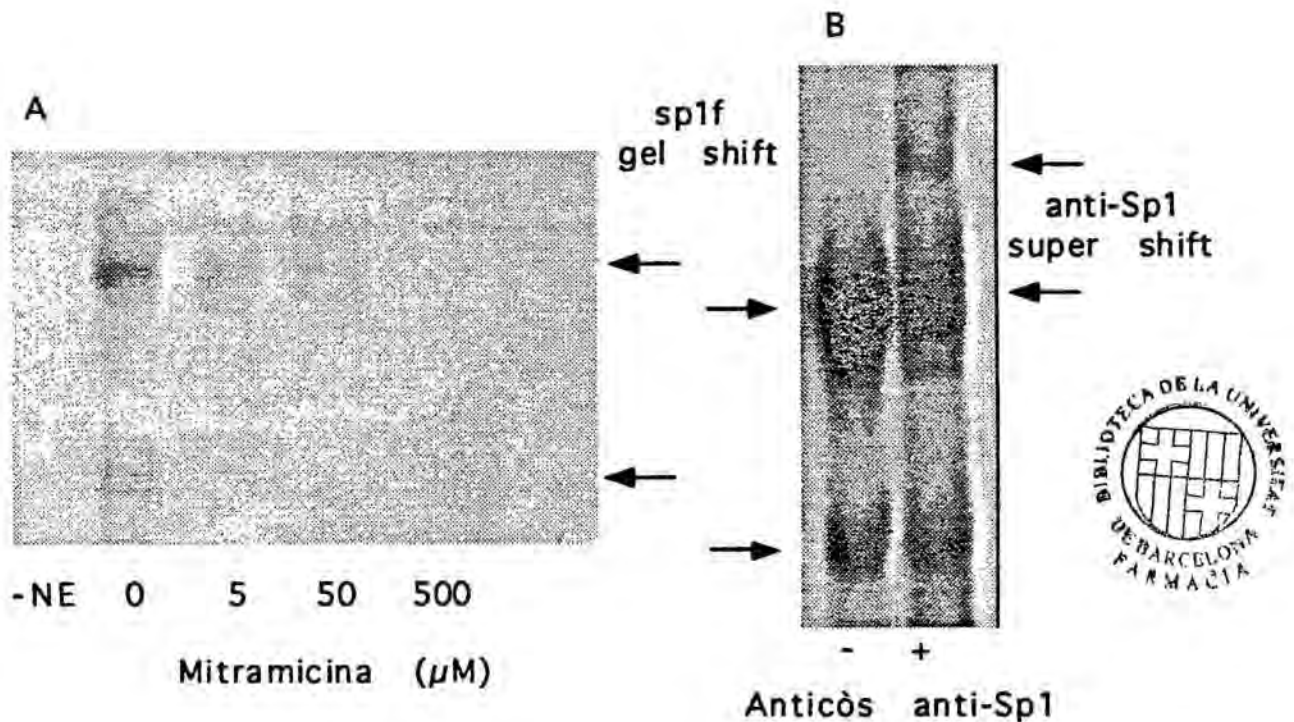
Per tal de dissecionar més específicament la unió de proteïnes nuclears al promotor mínim del gen *dhfr*, i tot considerant que s'havia descrit un paper regulador per part del factor E2F en el cicle cel.lular, vam procedir a estudiar la unió de proteïnes d'extractes nuclears a dos fragments originats a partir de 410f, que inclouen, separatament, seqüències consensus d'unió per a Sp1 i E2F.

Amb aquesta finalitat, vam digerir el fragment 410f amb l'enzim de restricció Hpa II i vam obtenir els fragments Sp1f i e2Ff, que contenen les seqüències de reconeixement per als factors Sp1 i E2F, respectivament. Aquests dos fragments marcats radioactivament van ésser utilitzats com a sondes en assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica.

Amb la sonda Sp1f de 59 bp, l'interacció amb un extracte nuclear de cèl.lules K1 en fase de creixement exponencial va originar dues bandes retardades (Fig. 29a). En aquest sentit, s'ha de remarcar la diferència amb la sonda 410f, que origina tres bandes retardades. A més la intensitat d'unió amb la sonda 410f és de l'ordre de 4 vegades l'obtinguda amb la sonda Sp1f. La unió observada amb la sonda Sp1f, a l'igual que amb la sonda 410f, es va reduir en presència de mitramicina

a concentracions creixents des de 5  $\mu\text{M}$  fins a 500  $\mu\text{M}$ , i de manera dependent de la dosi de droga emprada (Fig. 29a).

Per corroborar que el factor de transcripció Sp1 estava unit a la sonda Sp1f, es va afegir l'anticòs anti Sp1 2892-E a la barreja de reacció, el que va provocar una banda superretardada i la disminució del patró de bandes obtingudes amb la sonda Sp1f (Fig. 29b).



**Fig. 29** Caracterització de la retardació originada per la sonda Sp1f

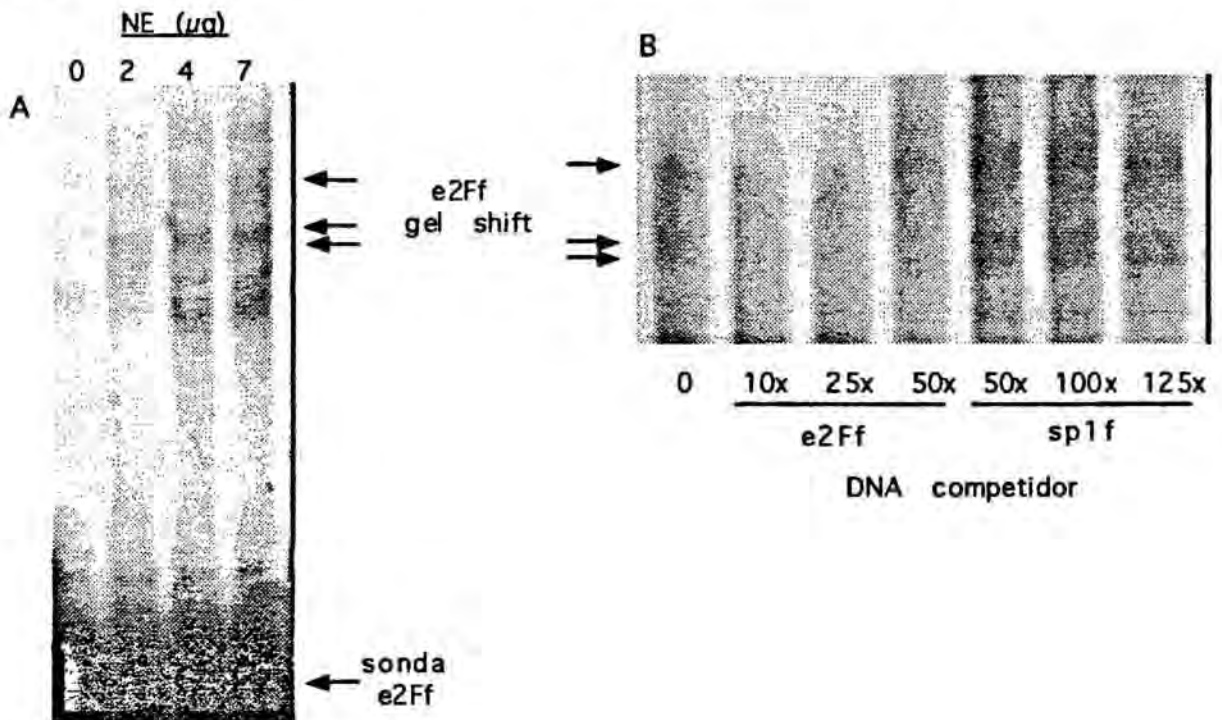
A) Assaig de retardació de la mobilitat electroforètica amb la sonda Sp1f en presència de concentracions creixents de mitramicina

La sonda Sp1f (20.000 cpm/reacció) es va incubar amb les concentracions indicades de mitramicina durant 15 minuts, previament a l'addició de 2  $\mu\text{g}$  d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial i tot utilitzant 2  $\mu\text{g}$  de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic.

B) Superretardació de la sonda Sp1f en presència d'un anticòs específic contra Sp1  
Es va afegir 1  $\mu\text{l}$  de l'anticòs 2892-E a la barreja de reacció que contenia 2  $\mu\text{g}$  d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial, 2  $\mu\text{g}$  de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic i la sonda Sp1f (20.000 cpm/reacció). Aquesta barreja es va incubar durant 15 minuts abans de procedir a l'electroforèsi.

Posteriorment, vam assajar la sonda e2Ff de 91 bp amb extractes nuclears de cèl.lules K1. En aquest cas, va ésser necessari incrementar la quantitat de proteïna nuclear fins a 4  $\mu\text{g}$  per reacció i utilitzar DNA

de timus de vedella com a DNA inespecífic per poder visualitzar les bandes retardades (Fig. 30a). Aquest resultat està d'acord amb els descrits per Dou *et al.* (1994), segons els quals per poder visualitzar apropiadament la unió d'E2F s'ha d'utilitzar un DNA inespecífic diferent del poli-dIdC. Per a la sonda e2Ff, l'interacció amb l'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial va originar un doblet d'intensitat molt inferior a les bandes observades en el cas de les sondes 410f i Sp1f. La especificitat de la unió d'E2F es va corroborar amb experiments de competició de la sonda e2Ff amb quantitats creixents del fragment e2Ff no marcat (Fig. 30b). Quan es va utilitzar la sonda gcf en presència de 4  $\mu$ g d'extracte nuclear i de 4  $\mu$ g de DNA de timus de vedella, també es va detectar la banda retardada corresponent a la unió d'E2F.



**Fig. 30** Caracterització de la retardació originada per la sonda e2Ff

A) Assaig de retardació de la mobilitat electroforètica amb la sonda e2Ff

Es va incubar la sonda e2Ff (20.000 cpm/reacció) amb quantitats creixents d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial, tal com s'indica a la figura, en presència de DNA de timus de vedella com a DNA específic, en quantitats equivalents a les emprades d'extracte nuclear a cada reacció.

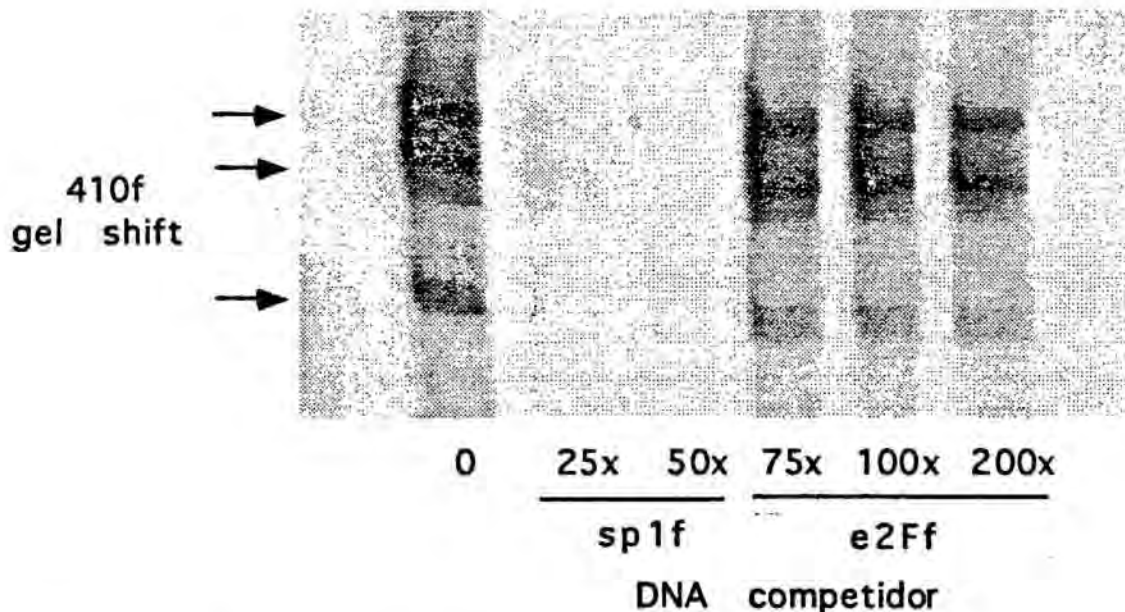
B) Competicions de la sonda e2Ff amb els fragments e2Ff i Sp1f sense marcar.

Es van afegir les quantitats indicades dels fragments e2Ff o Sp1f sense marcar, 15 minuts abans de l'addició de la sonda e2Ff radioactiva a la barreja de reacció, que contenia 4  $\mu$ g d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial i 4  $\mu$ g de DNA de timus de vedella com a DNA inespecífic.

Les bandes retardades s'indiquen amb fletxes a les figures.

En el cas de la sonda e2Ff, els experiments de retardació de la mobilitat electroforètica en presència tant d'un anticòs policlonal com de dos anticòssos monoclonals, KH20 i KH95, dirigits contra el factor E2F no va donar lloc a cap superretardació. Aquests anticòssos anti-E2F, en assaigs amb la sonda 410f tampoc van originar cap superretardació de la mobilitat electroforètica. Els resultats obtinguts podrien ésser deguts a l'inabilitat dels anticòssos emprats per reconèixer al factor de transcripció E2F en aquest tipus d'assaig.

També es van realitzar experiments de competició amb la sonda 410f en presència tant del fragment Sp1f com del fragment e2Ff no marcats. L'assaig de competició amb la sonda 410f i quantitats creixents del fragment Sp1f, de 25 i 50 vegades en relació amb la quantitat de sonda va comportar una total competició del patró de la retardació generat per la sonda 410f. A diferència del fragment Sp1f, la inclusió del fragment e2Ff sense marcar en un excés de 200 vegades respecte a la sonda en l'assaig de competició va produir només una lleugera disminució de la unió observada amb la sonda 410f sola (Fig.31).

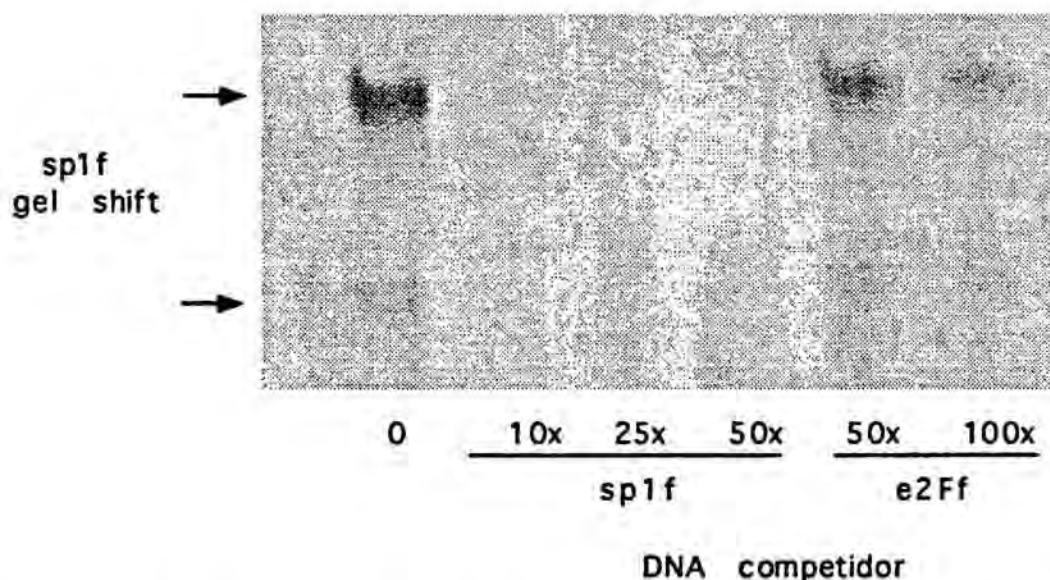


**Fig. 31 Assaigs de competició amb la sonda 410f**

Els assaigs de competició de la sonda 410f es van realitzar amb quantitats creixents dels fragments Sp1f o e2Ff sense marcar, tal com s'indica a la figura, que es van incubar amb 2  $\mu$ g d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial, en presència de 2  $\mu$ g de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic. Aquesta barreja es va incubar durant 15 minuts, previament a l'addició de la sonda radioactiva 410f (20.000 cpm/reacció).

Les bandes retardades s'indiquen amb fletxes a la figura.

Una altre serie d'experiments de competició van ésser realitzats amb la sonda Sp1f i els fragments Sp1f i e2Ff no marcats. La competició de la sonda Sp1f amb quantitats creixents del fragment Sp1f corresponents a 10, 25 i 50 vegades la del DNA marcat, va comportar una total competició de la unió generada per la sonda Sp1f. En canvi, la quantitat de fragment e2Ff necessària per generar una competició de l'ordre del 80% en les mateixes condicions era de 100 vegades en relació amb la sonda (Fig.32).



**Fig. 32 Assaigs de competició amb la sonda Sp1f**

Els assaigs de competició de la sonda Sp1f es van realitzar amb quantitats creixents dels fragments Sp1f o e2Ff sense marcar, tal com s'indica a la figura, que es van incubar amb 2  $\mu$ g d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial, en presència de 2  $\mu$ g de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic. La barreja es va incubar durant 15 minuts, previament a l'addició de la sonda radioactiva Sp1f (20.000 cpm/reacció).

Les bandes retardades originades per interacció de l'extracte nuclear amb la sonda radioactiva Sp1f s'indiquen amb fletxes a la figura.

### 3.7. SINCRONITZACIO DE LES CEL·LULES K1

El gen *dhfr* pertany a la categoria dels gens constitutius, necessaris per al manteniment dels processos cel·lulars a tots els tipus de cèl·lules. Encara que ja s'havia descrit la regulació de la síntesi de la proteïna DHFR a nivell del cycle cel·lular, les dades existents a la bibliografia referents a la regulació a nivell transcripcional són contradictòries. Alguns autors consideren que la expressió del gen *dhfr* al llarg del cycle cel·lular és independent del grau de transcripció (Leys and Kellems, 1981; Leys et al., 1984) però també s'ha descrit que la expressió del gen s'incrementa en resposta a la transició de la fase estacionària Go cap a l'estat de creixement (Wu and Johnson, 1982; Santiago et al., 1984) i que es produeix un increment en el grau de transcripció del gen a la interfase G1/S del cycle (Farnham & Schimke, 1985).

Un dels mètodes més àmpliament utilitzats per obtenir cultius cel·lulars en fase de creixement estacionària o fase Go és el manteniment de les cèl·lules en medi de cultiu amb un contingut de sèrum fetal del 0.5% per un període de temps determinat. En aquestes condicions, les cèl·lules no disposen dels factors de creixement necessaris per dividir-se però la seva viabilitat no es veu alterada. L'addició de medi fresc amb un contingut normal de sèrum fetal (7-10%) permet que les cèl·lules en fase Go tornin a entrar en el cycle cel·lular. Segons la bibliografia, el període de temps habitual durant el qual les cèl·lules es troben deprivades de sèrum és d'unes 60 hores però per a les cèl·lules K1 aquestes condicions de temps no permetien la obtenció d'una població majoritaria en fase Go. Vam per tant procedir a determinar el temps d'incubació en medi al 0.5% de sèrum per obtenir una població de cèl·lules K1 altament sincronitzada en Go. Les poblacions resultants es van analitzar per citometria de flux, que permet relacionar el contingut de DNA cel·lular amb les diferents fases del cycle i conèixer així la distribució de cèl·lules a cada fase. Com hom pot observar a la Fig. 33a, van ésser necessaris 7 dies de manteniment en medi al 0.5% de sèrum per assolir un percentatge de cèl·lules en fase Go del 80%.

Després dels 7 dies en medi al 0.5% de sèrum, l'addició de medi fresc suplementat amb el 7% de sèrum permetia que les cèl·lules en Go iniciessin la seva progressió en el cycle de manera sincronitzada. Vam

determinar el número de hores posteriors a l'addició de medi al 7% de sèrum per obtenir poblacions aïllades a cada fase del cicle cel.lular. També mitjançant citometria de flux, vam establir que a les 9 hores d'addició de medi al 7% de sèrum, les cèl.lules K1 es trobaven a la fase G1, a les 11 hores a la interfase G1/S, a les 15 hores a la fase S i a les 19 hores a la fase G2/M (Fig.33b i 33c).

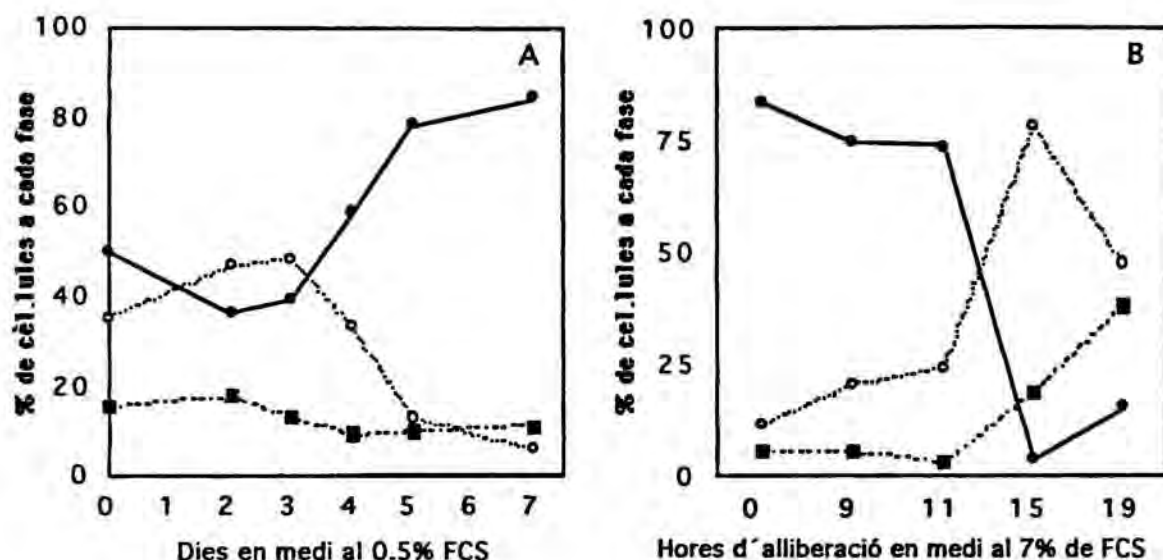


Fig. 33 Sincronització de les cèl.lules K1 de CHO

A) Distribució de les cèl.lules K1 a les diferents fases del cicle cel.lular al llarg del temps de sincronització

Les cèl.lules K1 es van mantenir en medi al 0.5% de sèrum fetal durant els períodes de temps indicats, i posteriorment es van obtenir els nuclis corresponents a cada punt. Els nuclis es van analitzar per citometria de flux per establir la seva distribució a les diferents fases del cicle cel.lular.

B) Progressió de les cèl.lules K1 sincronitzades en Go després de l'estimulació per addició de sèrum fetal

Les cèl.lules K1, sincronitzades per manteniment en medi al 0.5% de sèrum fetal durant 7 dies, van ésser estimulades a proliferar per addició de medi amb un 7% de sèrum. Als temps indicats, es van recollir les cèl.lules i es va procedir a l'obtenció dels nuclis corresponents, que es van analitzar per citometria de flux.

Els resultats de la citometria s'expressen en percentatges corresponents al número de cèl.lules a cada fase del cicle cel.lular, G1 (●), S (○) i G2/M (■).

C) Diagrames obtinguts per citometria de flux i que corresponen a la distribució dels nuclis a les diferents fases del cicle cel.lular. Les mostres assajades provenen de cèl.lules en creixement exponencial (Exp), sincronitzades a la fase Go (0h), i després de 9 hores (9h), 11 hores (11h), 15 hores (15h) i 19 hores (19h) d'estimulació per addició de sèrum.



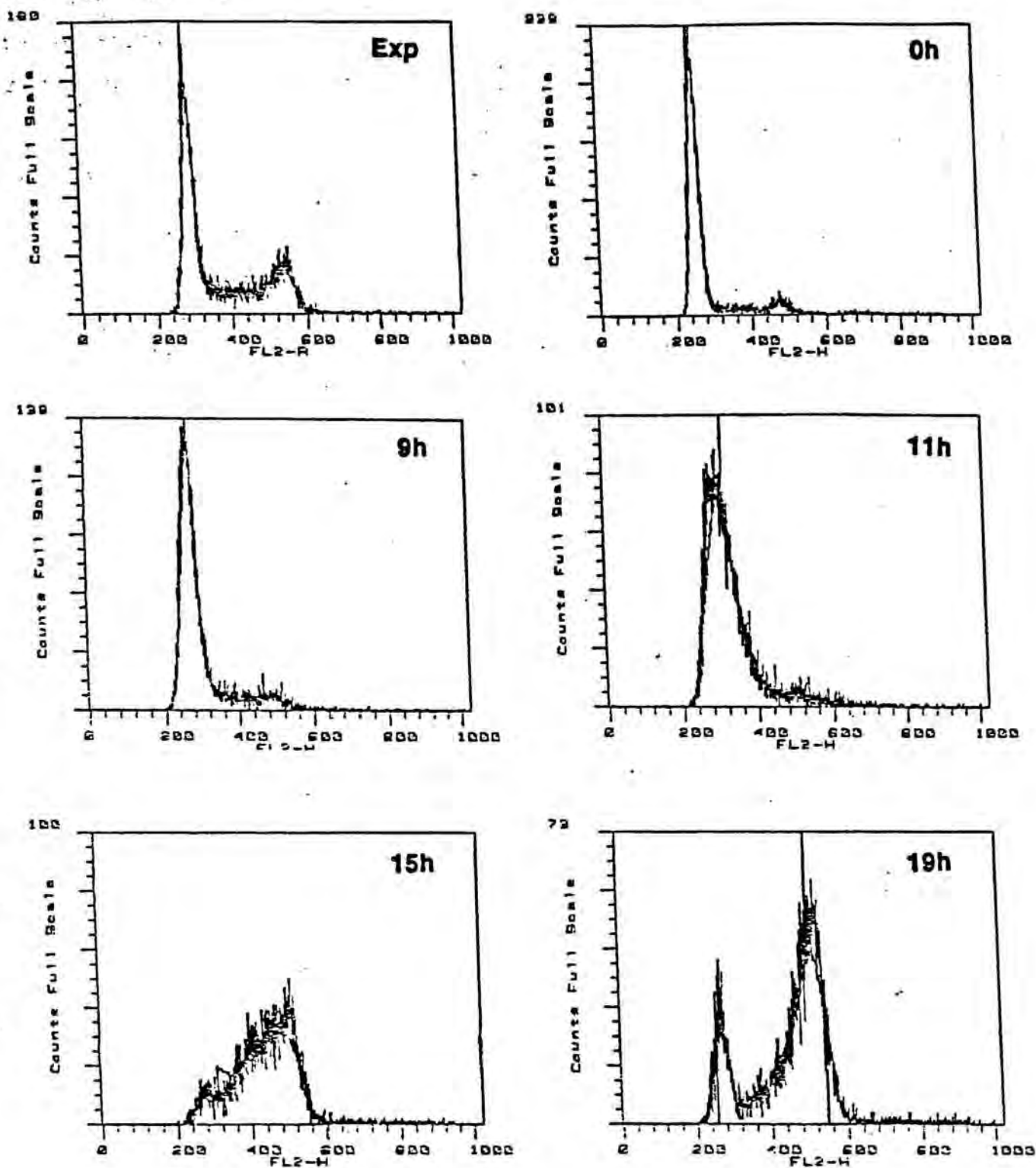


Fig. 33c. CITOMETRIA DE FLUX AL LLARG DEL CICLE CEL·LULAR

Un cop establertes les condicions de sincronització per a les cèl·lules K1, es va procedir a l'obtenció d'extractes nuclears corresponents a cada fase del cicle per a la realització d'assajos de retardació de la movilitat electroforètica.

### 3.8. ASSAIG DE RETARDACIO DE LA MOBILITAT ELECTROFORETICA AMB EXTRACTES NUCLEARS OBTINGUTS AL LLARG DE LA PROLIFERACIO CEL.LULAR

#### 3.8.1. Assaigs amb el fragment 410f

Com havíem observat la gran capacitat d'unió del factor de transcripció Sp1 al promotor mínim del gen *dhfr*, volíem determinar si aquesta unió seguia un patró dependent de la proliferació cel.lular. Amb aquest objectiu, vam decidir estudiar la regulació de la transcripció del gen *dhfr* al llarg de la proliferació cel.lular mitjançant l'anàlisi de retardació de la mobilitat electroforètica amb el promotor mínim del gen *dhfr* i extractes nuclears de cèl.lules sincronitzades en G<sub>0</sub> i posteriorment alliberades a diferents temps. Tal com es mostra a la Fig. 34a, l'assaig de retardació de la mobilitat electroforètica amb la sonda 410f i extractes nuclears provinents de les diferents fases de la proliferació va donar lloc a les tres bandes retardades, ja observades amb els extractes de cèl.lules en creixement exponencial, l'intensitat de les quals s'incrementava paral·lelament a la progressió de la proliferació cel.lular, essent mínima per a la fase G<sub>0</sub> i arribant a un màxim a nivell de la fase G<sub>2</sub>/M.

#### 3.8.2. Assaigs amb els fragments Sp1f i e2Ff

A l'igual que havíem procedit amb extractes nuclears de cèl.lules en creixement exponencial, vam estudiar la unió a les sondes Sp1f i e2Ff de les proteïnes d'extractes nuclears obtinguts a partir de poblacions en cadascuna de les fases de la proliferació cel.lular.

Amb la sonda Sp1f, també es va observar un increment a nivell de la unió de Sp1 a mesura que s'avançava en la proliferació (Fig. 34b). En el cas de la sonda e2Ff, no s'observava cap banda retardada quan les cèl.lules es trobaven en G<sub>0</sub> i posteriorment, la unió de les proteïnes nuclears augmentava progressivament amb la proliferació (Fig. 34c).

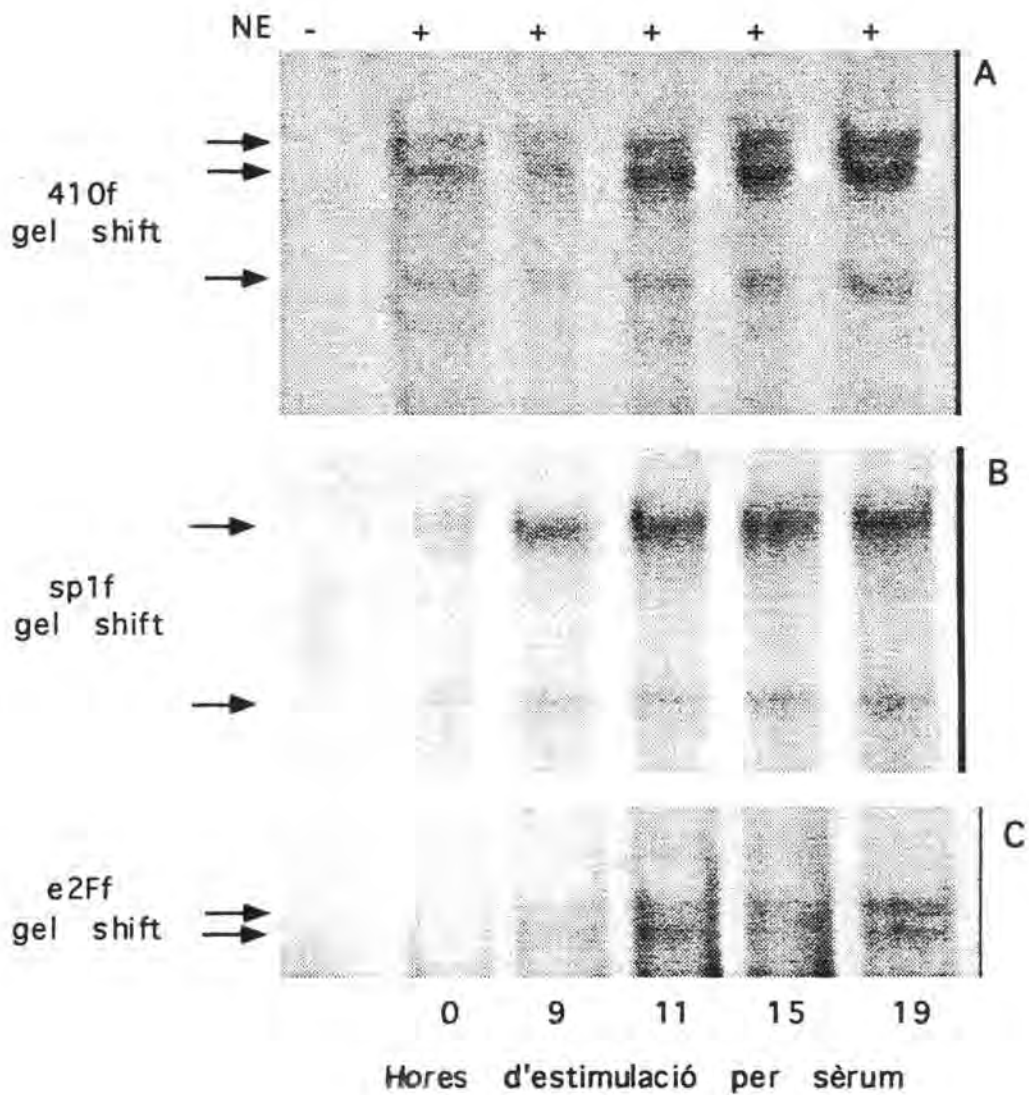


Fig. 34 Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica al llarg del procés de proliferació

A) Assaig de retardació amb la sonda 410f

B) Assaig de retardació amb la sonda Sp1f

C) Assaig de retardació amb la sonda e2Ff

En A) i B) les sondes 410f o Sp1f (20.000 cpm/reacció) es van incubar amb 2  $\mu$ g d'extractes nuclears corresponents a les diferents fases de la proliferació, en presència de 2  $\mu$ g de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic.

En C) es van emprar 4  $\mu$ g dels diferents extractes nuclears i 4  $\mu$ g de DNA de timus de vedella com a DNA inespecífic en la reacció amb la sonda e2Ff (20.000 cpm/reacció).

Les bandes retardades originades per interacció de les sondes amb els extractes nuclears s'indiquen amb fletxes a les figures.

### 3.9. ESTUDI DE LA TRANSCRIPCIÓ DEL GEN *dhfr* AL LLARG DE LA PROLIFERACIÓ MITJANÇANT LA TÉCNICA DE RT-PCR

L'increment en la unió del factor de transcripció Sp1 al promotor del gen *dhfr* al llarg de la proliferació cel·lular es podria traduir en un increment de l'activitat transcripcional del gen.

A partir d'una variant de la tècnica de RT-PCR (transcriptasa inversa-P.C.R.) quantitativa és possible analitzar l'activitat transcripcional d'un gen determinat. La utilització d'oligonucleòtids que hibriden a seqüències no exòniques permet una estimació de la transcripció que hagi tingut lloc ja que les zones intròniques dels transcrits inicials (hnRNA) són molt ràpidament degradades al nucli immediatament després del procés d'empalmament del RNA. Aquest procés és de l'ordre de 5-10 minuts i posteriorment aquestes estructures no es troben ja presents, i per tant no és possible detectar-les amb oligonucleòtids que hibridin a aquest nivell.

Per a la realització d'aquesta variant de la tècnica de RT-PCR quantitativa, es va partir d'una mostra del RNA total de cèl·lules corresponent a cada fase de la proliferació cel·lular que es van tractar amb DNAsa per eliminar les restes d'aquest substrat, i es va procedir a la reacció de la transcriptasa inversa i a continuació a la de P.C.R. amb els oligonucleòtids específics per a diferents introns. Vam utilitzar una parella d'oligonucleòtids que hibridaven a seqüències no exòniques flanquejants a un mateix exó, concretament a l'exó 1 del gen *dhfr*. Aquesta combinació va generar un fragment que revelava la presència de transcrits originals, sintetitzats de manera diferencial al llarg del cicle cel·lular.

A la Fig. 35 es pot observar el resultat obtingut amb la combinació d'oligonucleòtids escollits a nivell de l'exó 1. La intensitat del fragment radioactiu amplificat que corresponia al tamany esperat de 205 bp, s'incrementava a mesura que progressa la proliferació cel·lular, comportament que es podia relacionar amb un increment de la transcripció al llarg d'aquest procés.

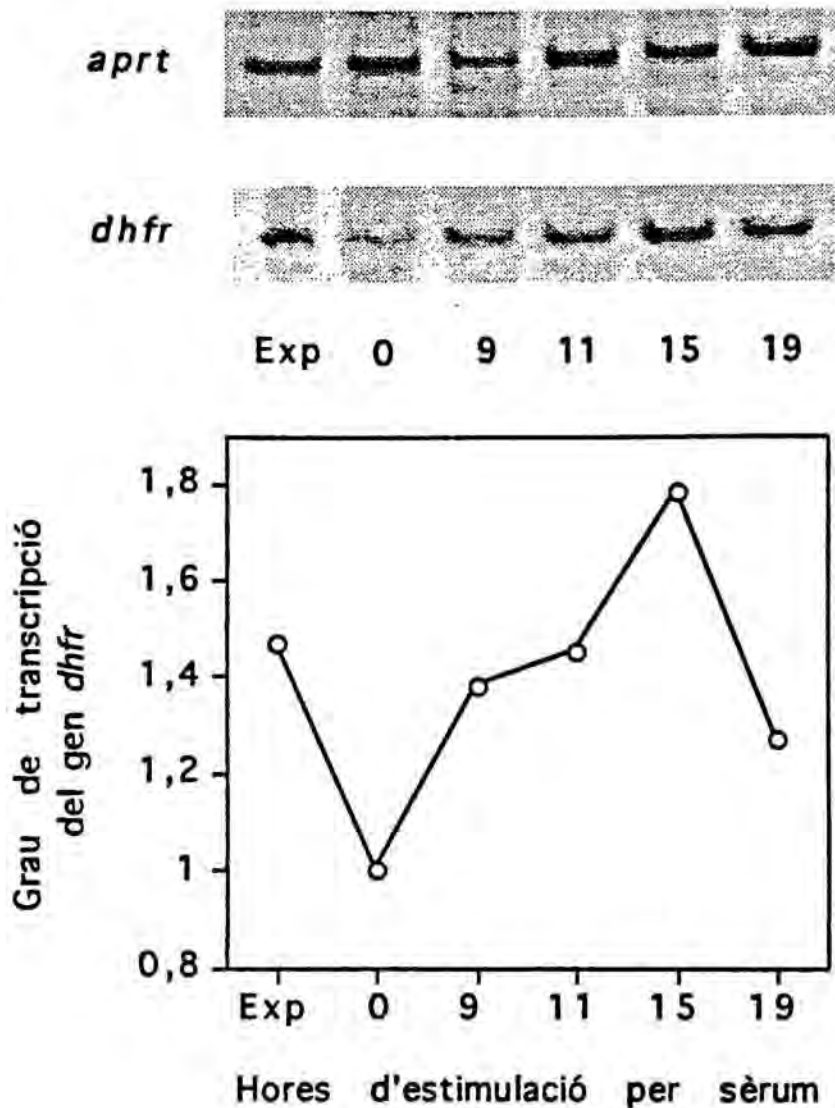


Fig. 35 Activitat transcripcional del gen *dhfr* en el procés de proliferació. L'activitat transcripcional del gen *dhfr* es va determinar mitjançant la tècnica de RT-PCR quantitativa, després del tractament del RNA total corresponent a les diferents fases de la proliferació amb DNAsa, tot utilitzant oligonucleòtids que hibriden a seqüències no exòniques. El senyal obtingut amb el gen *aprt* en les mateixes condicions es va utilitzar per normalitzar els resultats. El grau de transcripció del gen *dhfr* s'expressa en unitats arbitràries i correspon al quocient d'intensitats entre els senyals del gen *dhfr* i *aprt*, respectivament.

### 3.10. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE mRNA CORRESPONENT AL GEN *dhfr* AL LLARG DE LA PROLIFERACIÓ PER RT-PCR

Posteriorment als assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica *dhfr* al llarg de la proliferació cel·lular, vam estudiar si l'increment observat en la unió dels factors de transcripció al promotor i en la transcripció del gen *dhfr* en aquestes condicions s'acompanyava d'un

increment en l'expressió i per tant en un augment en els nivells del mRNA corresponents al gen. Per a la determinació dels nivells de mRNA, vam utilitzar la tècnica de RT-PCR en condicions quantitatives. Vam escollir una parella de oligonucleòtids que hibridaven a nivell de l'exó 1 en direcció 3' i a nivell de l'exó 6 en direcció 5', respectivament, i que permetien l'amplificació del missatger corresponent al gen *dhfr* amb un tamany de 661 bp.

Com a control de la tècnica es van utilitzar els nivells de missatger del gen *aprt*. En aquest cas, els oligonucleòtids escollits hibridaven a nivell de l'exó 1 en direcció 3' i a nivell de l'exó 5 en direcció 5' i donaven lloc a un fragment amplificat de 427 bp, que corresponia al missatger del gen *aprt*.

El resultat de la reacció de RT-PCR a partir dels RNAs totals corresponents a les diferents fases del cicle cel·lular es mostra a la Fig. 36.

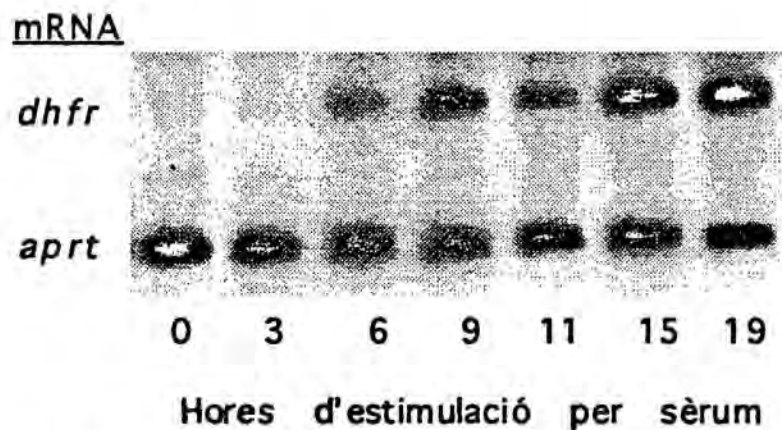


Fig. 36 Nivells de mRNA corresponents a la DHFR al llarg de la proliferació. Es van obtenir mostres de RNA total a diferents temps d'estimulació per sèrum després de la sincronització, que van ésser utilitzats com a material de partida per determinar els nivells de mRNA mitjançant la tècnica de RT-PCR quantitativa amb oligonucleòtids que hibridaven als exons 1 i 6 del gen *dhfr*. La reacció de PCR es va realitzar a 25 cicles. Els productes amplificats es van visualitzar per autoradiografia després de l'electroforesi en un gel al 5% de poliacrilamida. El senyal obtingut en la mateixa reacció pel gen *aprt* es va fer servir per normalitzar els resultats.

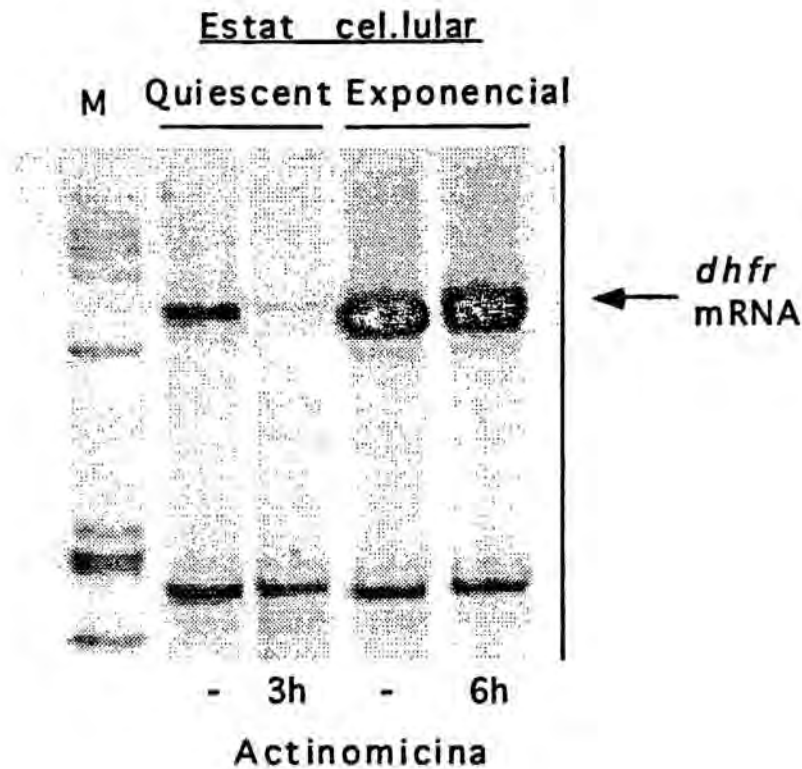
S'obtenia un nivell mínim de mRNA corresponent al gen *dhfr* a les cèl·lules sincronitzades en G<sub>0</sub> que augmentava dramàticament durant la fase G<sub>1</sub>. Tanmateix, els nivells de missatger corresponents al gen *aprt* en les mateixes condicions eren pràcticament constants al llarg de la proliferació.

### 3.11. ESTUDI DE L'ESTABILITAT DEL mRNA CORRESPONENT AL GEN *dhfr*

L'increment en la transcripció del gen *dhfr* en la proliferació cel.lular augmenta els nivells de missatger corresponents. Tanmateix, l'increment en els nivells de missatger també podria ésser degut a un increment de la seva estabilitat.

Per estudiar l'estabilitat del mRNA, es va realitzar en primer lloc un tractament de les cèl.lules K1 amb una concentració d'actinomicina D de 5 µg/ml a diferents intervals de temps. L'actinomicina D és un inhibidor de la transcripció *de novo* i permet estudiar el procés de degradació del RNA en funció del temps. D'aquesta manera es va procedir a la determinació de la vida mitja del mRNA corresponent al gen *dhfr* en cèl.lules sincronitzades i en fase de creixement exponencial, a partir del RNA total obtingut de les poblacions tractades, i posteriors reaccions de RT i P.C.R. amb els oligonucleòtids corresponents al missatge madur.

Vam determinar que la vida mitja del mRNA corresponent al gen *dhfr* en cèl.lules sincronitzades en G<sub>0</sub> és molt curta, de l'ordre de 45 minuts, a conseqüència de la seva ràpida degradació. A les cèl.lules en fase de creixement exponencial, però, l'estabilitat del missatger és molt superior, amb una vida mitja aproximada de 8 hores (Fig. 37). Per tant, l'increment observat en els nivells de mRNA al llarg de la proliferació pot ésser degut a la col.laboració de dos processos: l'increment de l'estabilitat del missatger en cèl.lules en creixement exponencial en relació amb cèl.lules en estat quiescent, i la major activitat transcripcional observada, a conseqüència de la major unió del factor de transcripció Sp1 al promotor del gen *dhfr*.



**Fig. 37 Estabilitat del mRNA de la DHFR**

Es van tractar cèl.lules en estat quiescent o en creixement exponencial amb l'inhibidor de la transcripció actinomicina D a la concentració de 5 µg/ml pels temps indicats a la figura. Posteriorment, es va procedir a l'obtenció del RNA total, que va servir com a producte de partida per la reacció de RT-PCR quantitativa, que es va realitzar a 25 cicles. Els productes amplificats es van visualitzar per autoradiografia després de l'electroforèsi en un gel de poliacrilamida al 5%.

### 3.12. ASSAIGS DE SUPERRETARDACIO AMB LES SONDES 410f i Sp1f

Està molt ben establerta la regulació del factor de transcripció E2F per part del producte de l'antioncogen Retinoblastoma (RB) al llarg del cicle cel.lular. En aquest sentit, s'ha proposat un model per a aquesta regulació segons el qual, la proteïna RB en el seu estat hipofosforilat, corresponent a les fases G<sub>0</sub> i G<sub>1</sub>, és capaç de segrestar el factor de transcripció E2F i bloquejar la seva activitat. Quan es produeix la hiperfosforilació de RB a nivell de la interfase G<sub>1</sub>/S, E2F queda lliure i pot unir-se als promotors que contenen la seva seqüència de reconeixement (Chellapan *et al.*, 1991).



També s'ha descrit la capacitat de RB per regular positivament l'activitat transcripcional del factor Sp1 (Kim *et al.*, 1992; Udvadia *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994).

Amb aquests precedents, vam decidir estudiar si existia alguna interacció entre Sp1 i RB en el cas del promotor del gen *dhfr*. Vam procedir a la realització d'assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb extractes nuclears de cèl.lules K1 en fase de creixement exponencial i la sonda 410f, en absència i en presència de l'anticòs N9 contra la proteïna RB. En presència de l'anticòs, es va produir una superretardació de totes les bandes originades per l'interacció de les proteïnes nuclears amb la sonda 410f marcada radioactivament (Fig.38a).

Aquesta superretardació era deguda específicament a l'anticòs anti-RB ja que el mateix assaig amb un sèrum preimmunitzat no modificava la retardació de la mobilitat de la sonda 410f (fig.38a).

Una altra prova suplementària de la especificitat de la superretardació observada es va obtenir amb la utilització d'un anticòs monoclonal contra RB, l'anticòs XZ77, que reconeixia específicament la proteïna p110 corresponent a RB i no s'unia a p107, una altra proteïna relacionada amb RB (HU *et al.*, 1991). Amb aquest anticòs també es va observar superretardació de la mobilitat electroforètica de la sonda 410f quan interaccionava amb l'extracte nuclear obtingut de cèl.lules K1 (Fig.38b).

L'anticòs policlonal N9 també va provocar superretardació de la mobilitat electroforètica en el cas de la sonda Sp1f (Fig.38c) i de manera específica, donat que el mateix assaig en presència d'un sèrum preimmunitzat no originava cap superretardació. Aquest resultat corroboraria que la interacció entre la proteïna RB i el factor de transcripció Sp1 és independent de la presència del factor E2F i de la seva seqüència de reconeixement.

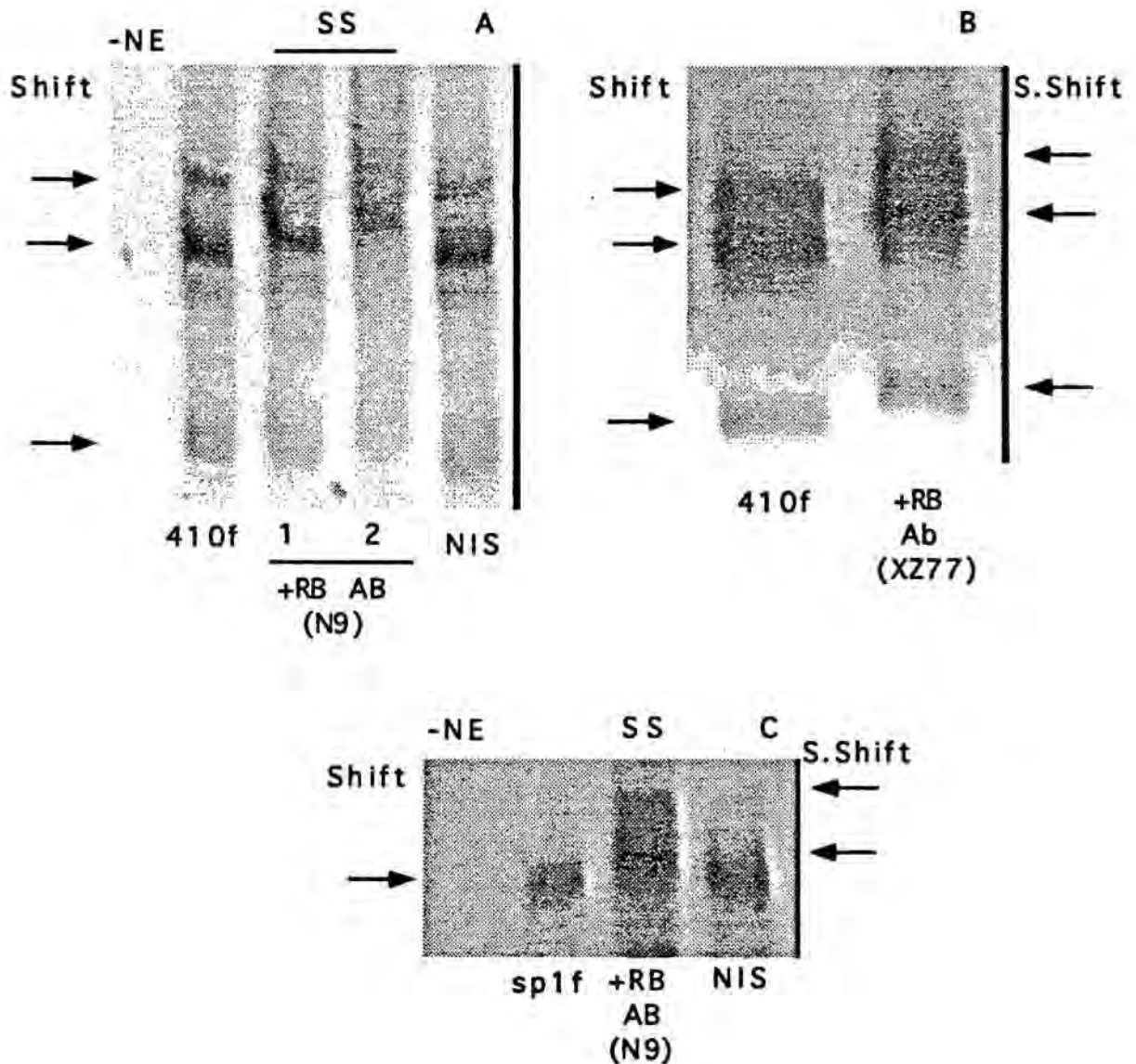


Fig. 38 Assaigs de superretardació de la mobilitat electroforètica de les sondes 410f i Sp1f amb anticossos específics contra la proteïna RB. La presència de RB en el complex transcripcional amb Sp1 quan aquest s'uneix al promotor del gen *dhfr* es va detectar mitjançant la tècnica de supershift amb anticossos específics contra RB.

En A) es va utilitzar l'anticòs policlonal N9 (4  $\mu$ l), i la sonda 410f marcada radioactivament, en presència de 2  $\mu$ g d'extracte nuclear de cèl·lules K1 en creixement exponencial i 2  $\mu$ g de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic. També es va realitzar un control amb un sèrum preimmunitzat.

En B) es va emprar l'anticòs monoclonal XZ77 (10  $\mu$ l) en la reacció de superretardació.

En C) l'assaig de superretardació es va realitzar amb la sonda Sp1f (20.000 cpm/reacció) i l'anticòs anti-RB N9. També es va realitzar un control amb un sèrum preimmunitzat.

En tots els casos la barreja de reacció amb l'anticòs es va incubar durant 15 minuts, i posteriorment, el producte de la reacció d'unió es va resoldre en gel de poliacrilamida al 4% no denaturant, a 4 °C i 20 mA.

Posteriorment, vam assajar l'efecte de l'anticòs N9 sobre els extractes nuclears de cèl.lules a cadascuna de les fases de la proliferació cel.lular.

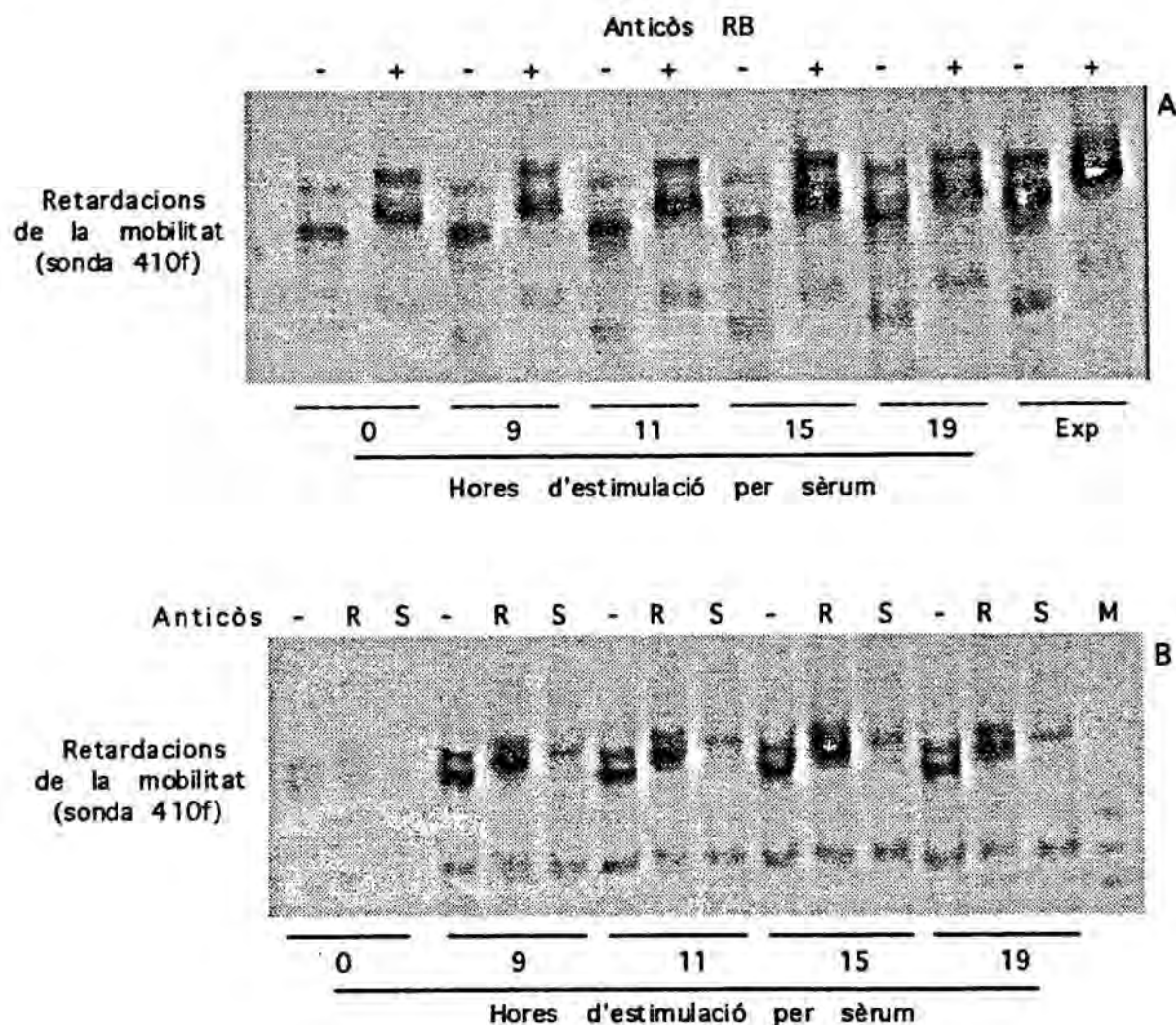


Fig. 39 Assaigs de superretardació de la mobilitat electroforètica de la sonda 410f amb anticossos específics contra RB i Sp1 al llarg de la proliferació

A) Superretardació amb l'anticòs N9 contra RB.

B) Superretardació amb els anticossos N9 i 2892-E contra Sp1.

En A) cada reacció es va realitzar amb 2  $\mu$ g d'extracte nuclear corresponent a cada fase de la proliferació, 2  $\mu$ g de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic, la sonda 410f (20.000 cpm/reacció) i 4  $\mu$ l de l'anticòs anti-RB N9. La barreja es va incubar durant 15 minuts en absència de la sonda, 15 minuts més amb la sonda radioactiva i finalment durant 15 minuts addicionals després d'afegir l'anticòs. Tot seguit es procedia a l'electroforèsi.

En B) es va afegir per cada condició una reacció addicional amb 1  $\mu$ l de l'anticòs anti-Sp1 2892-E.

Com es pot observar a la Fig. 39a, la presència de l'anticòs va provocar la superretardació a totes les fases de la proliferació. La proteïna RB es trobava per tant unida a Sp1 al llarg de tot el procés de proliferació.

Posteriorment, es va assajar l'efecte de l'anticòs 2892-E contra Sp1 al llarg de la proliferació cel·lular. La presència de l'anticòs va originar la superretardació de les bandes resultants de l'interacció de les proteïnes nuclears amb la sonda 410f a totes les fases del procés de proliferació (Fig.39b).

### 3.13. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE Sp1 I RETINOBLASTOMA AL LLARG DE LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR PER WESTERN BLOT

Per determinar si l'increment observat en la unió de les proteïnes nuclears, i concretament del factor de transcripció Sp1, al promotor mínim del gen *dhfr* estava relacionat amb un increment en el nivell de proteïna Sp1, vam procedir a la determinació dels nivells de proteïna Sp1 mitjançant assaig de Western blot.

En la realització d'aquest assaig, es van utilitzar 20 µg de cada extracte nuclear, obtinguts a partir de cèl·lules K1 mantingudes en medi al 0.5% de sèrum fetal durant un número variable de dies fins arribar a una setmana i a partir de cèl·lules K1 sincronitzades en G<sub>0</sub> i posteriorment alliberades a diferents temps corresponents a les diferents fases de la proliferació cel·lular.

En la detecció, es va utilitzar l'anticòs policlonal contra Sp1, 2892-E, a la dilució 1:1500, i l'anticòs secundari lligat a peroxidasa a la dilució 1:12.000. Aquest assaig va revelar que el nivell de proteïna Sp1 disminuïa gradualment a mesura que progressava el temps de manteniment de les cèl·lules en medi al 0.5% de sèrum fetal, i era molt baix als 7 dies d'incubació en aquest medi. Posteriorment, per addició de medi fresc amb un 7% de sèrum fetal, s'observava l'increment progressiu del nivell de proteïna Sp1 a mesura que les cèl·lules avançaven en el procés de proliferació, i s'arribava a un nivell màxim a les 19 hores d'alliberació de la sincronització (Fig. 40).

Aquests resultats en el nivell de proteïna Sp1 al llarg de la proliferació cel.lular concordaven amb el comportament observat en la unió del factor Sp1 al promotor mínim del gen *dhfr* a través d'aquest procés cel.lular.

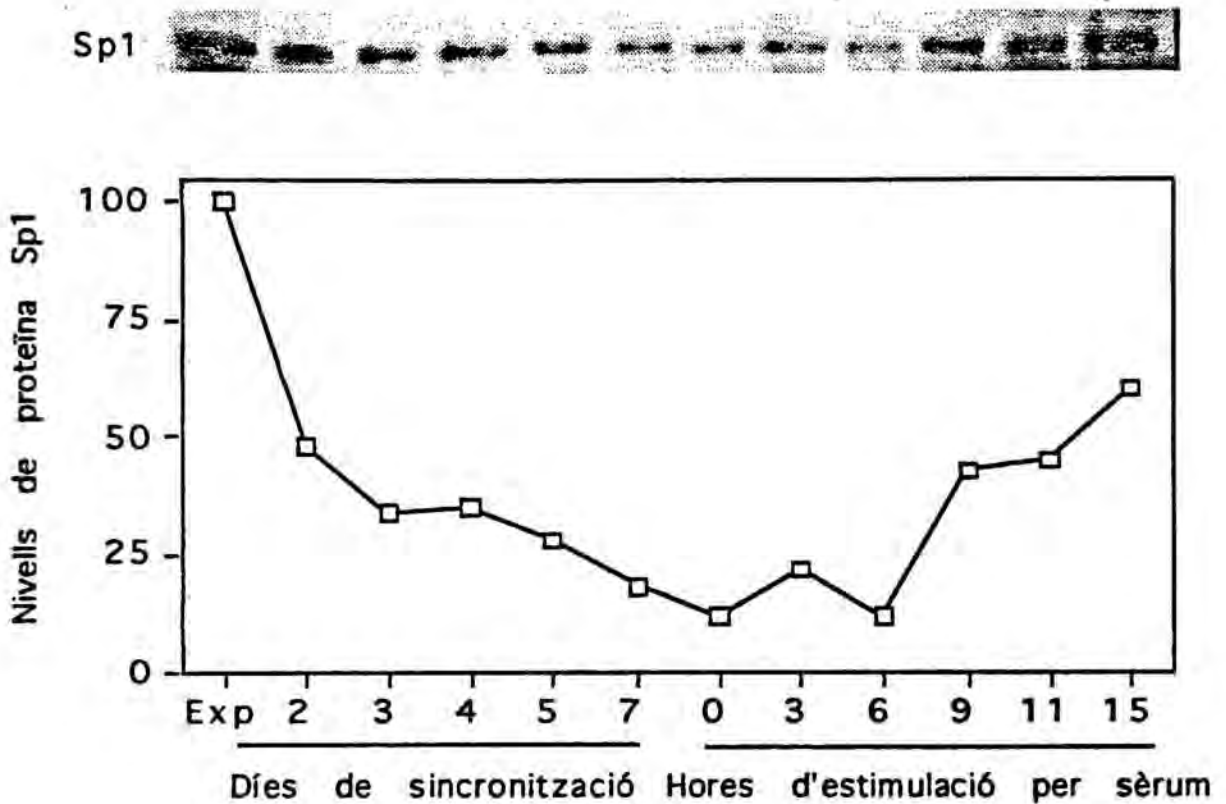
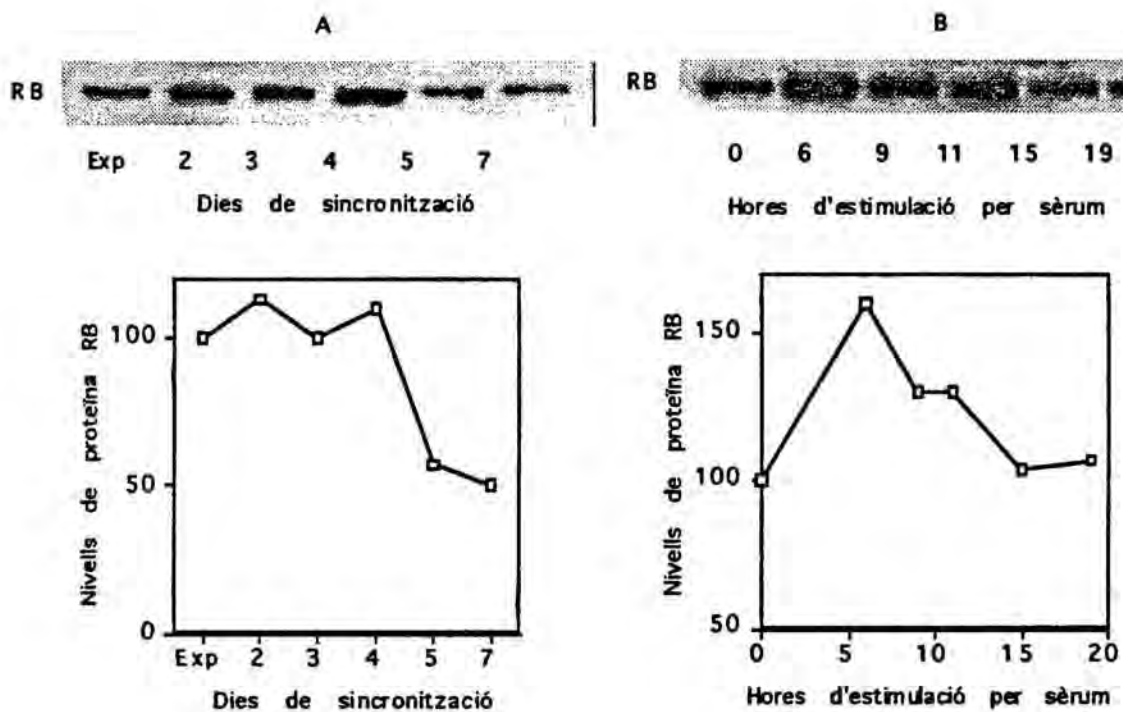


Fig. 40 Nivells de proteïna Sp1

La determinació dels nivells de proteïna Sp1 es va realitzar a partir de 20  $\mu$ g d'extractes nuclears corresponents als diferents dies de sincronització i a les diferents fases del procés de proliferació. Les proteïnes es van separar en un gel al 7% de poliacrilamida, i posteriorment es van transferir a un filtre de PVDF (Immobilon) sobre el qual es va realitzar la detecció immunològica, amb l'anticòs anti-Sp1,2892-E, a la dilució 1:1.500, i un anticòs secundari lligat a peroxidasa a la dilució 1:12.000.

En els assaigs de superretardació amb l'anticòs N9 contra la proteïna RB, havíem observat que aquesta proteïna es trobava complexada amb Sp1 al llarg de tot el procés de proliferació. Era per tant d'interès la determinació dels nivells de proteïna RB, tant en cèl.lules sincronitzades com en les diferents fases de la proliferació cel.lular, per veure si aquests nivells seguien o no el mateix comportament que els corresponents a Sp1. En el cas de la proteïna RB, es va observar una

disminució important en el nivell de proteïna a partir del cinquè dia en medi al 0.5% de sèrum fetal en relació al nivell inicial de proteïna RB existent a les cèl.lules K1 en fase de creixement exponencial, i s'arribava a valors de proteïna molt baixos als 7 dies de manteniment de les cèl.lules en medi al 0.5% de serum fetal. L'addició de medi fresc al 7% de sèrum fetal comportava una ràpida recuperació dels nivells de proteïna RB, amb un pic màxim a les 6 hores d'alliberació de la sincronització (Fig. 41).



**Fig. 41 Nivells de proteïna RB**

La determinació dels nivells de proteïna RB es va realitzar a partir de 20 µg d'extractes nuclears. La metodologia que es va fer servir és la mateixa descrita a la Fig.40, tot utilitzant l'anticòs anti-RB, N9, a la dilució 1:1.500 per a la detecció immunològica.

En A) els extractes nuclears corresponen als diferents dies de sincronització en medi al 0.5% de sèrum.

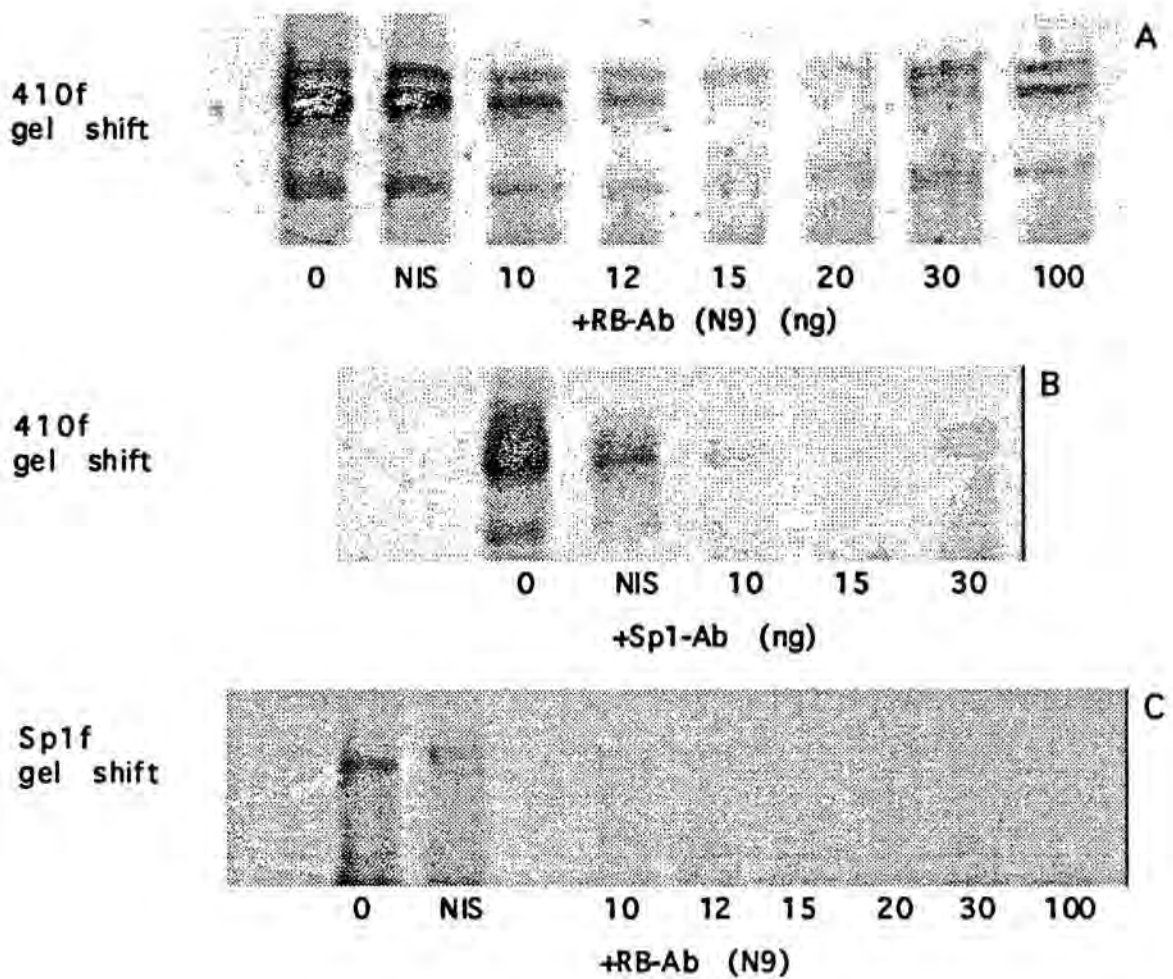
En B) els extractes nuclears corresponen als diferents temps d'estimulació per sèrum després de la sincronització en Go durant 7 dies.

Les condicions restants de l'assaig són les mateixes que les descrites per la Fig.40.

### 3.14. EFECTES DE LA IMMUNOPRECIPITACIÓ DE RB I Sp1 SOBRE LA UNIO DE Sp1 AL PROMOTOR MINIM DEL GEN *dhfr*

Per explorar el paper que exercia la proteïna RB en complexar-se amb el factor de transcripció Sp1 quan aquest interaccionava amb el promotor mínim del gen *dhfr*, vam procedir a la realització d'assaigs d'immunoprecipitació amb l'anticòs N9 contra la proteïna RB en extractes nuclears de cèl.lules K1. En primer lloc, vam establir la concentració idònea d'anticòs necessària per immunoprecipitar la proteïna RB existent en l'extracte nuclear. Tot treballant amb 30 µg d'extracte nuclear provinent de cèl.lules K1 en fase de creixement exponencial, vam determinar que la concentració més adient de N9 era de 10-20 ng. La comprovació d'aquestes condicions per a la immunoprecipitació es va realitzar mitjançant assaigs de retardació amb la sonda 410f. Com es pot observar a la Fig. 42a, la immunoprecipitació amb concentracions gradualment creixents de l'anticòs N9 provocava una reducció progressiva de la unió a la sonda fins arribar a la seva pràctica desaparició a la concentració de 20 ng, però a concentracions superiors d'anticòs es produïa una recuperació de la unió al promotor, probablement per una falta d'equivalència entre les concentracions de RB i el seu anticòs. La disminució de la intensitat de les bandes retardades amb la sonda 410f a conseqüència de la immunoprecipitació era un efecte específic de l'anticòs N9 ja que la mateixa reacció amb un sèrum preimmunitzat no comportava modificacions en el patró de bandes retardades obtingut amb la sonda 410f.

Aquest assaig també es va realitzar amb la sonda Sp1f marcada i l'anticòs N9 i, en aquest cas, la desaparició de les bandes retardades s'observava amb la concentració més baixa d'anticòs, corresponent a 10 ng (Fig.42c).



**Fig. 42 Assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb extractes nuclears immunoprecipitats amb anticossos específics contra RB i Sp1**  
 A) Retardació de la sonda 410f amb extractes nuclears immunoprecipitats amb quantitats creixents de l'anticòs N9  
 B) Retardació de la sonda 410f amb extractes nuclears immunoprecipitats amb quantitats creixents de l'anticòs 2892-E  
 C) Retardació de la sonda Sp1f amb extractes nuclears immunoprecipitats amb quantitats creixents de l'anticòs N9  
 En tots els casos la immunoprecipatació es va realitzar a partir de 30  $\mu$ g d'extracte nuclear de cèl.lules K1 en creixement exponencial, i les quantitats indicades de cada anticòs. Posteriorment, es van afegir 3  $\mu$ l de Proteïna A al 10%, i després de centrifugació, els sobrenadants obtinguts es van emprar en l'assaig de retardació de la mobilitat electroforètica. Cada reacció va tenir lloc amb 2  $\mu$ g de l'extracte nuclear immunoprecipitat, 2  $\mu$ g de poli(dI-dC) com a DNA inespecífic i 20.000 cpm de les sondes 410f o Sp1f.

Aquests resultats corroboren que la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr* s'efectua en forma de complex conjuntament amb el producte de l'antioncogen RB, i abonaria la hipòtesi que RB estimula l'activitat transcripcional exercida per part de Sp1.



Posteriorment, es va realitzar la immunoprecipitació amb l'anticòs 2892-E en extractes de cèl.lules K1 en fase de creixement exponencial. Es van assajar concentracions creixents de l'anticòs des de 10 ng fins a 30 ng i en tots els casos es va produir una total desaparició de les bandes retardades obtingudes en presència de la sonda 410f (Fig.42b). Aquesta desaparició era també un efecte específic de la immunoprecipitació amb l'anticòs 2892-E, el mateix assaig amb un serum preimmunitzat no produïa cap modificació del patró de bandes retardades generat per la interacció de la sonda 410f o Sp1f amb l'extracte nuclear.

### 3.15. ASSAIGS D'IMMUNOFLUORESCENCIA

La baixa activitat d'unió del factor de transcripció Sp1 observada als extractes nuclears corresponents a cèl.lules quiescents podria ésser deguda a la inhibició o inactivació de Sp1, a una localització majoritàriament citoplasmàtica en lloc de nuclear, o a l'absència de proteïna Sp1.

Per assajar aquestes darreres dues idees vam procedir a analitzar la localització citològica de Sp1 mitjançant la tècnica de immunofluorescència *in situ*. Aquesta tècnica es basa en el reconeixement de la proteïna objecte de l'assaig amb un anticòs específic, que posteriorment és reconegut per un segon anticòs lligat a fluoresceïna. D'aquesta manera l'emissió de fluorescència permet la localització cel.lular de la proteïna considerada.

Encara que s'observa un nivell baix de tinció inespecífica de les cèl.lules al llarg d'aquest assaig (Fig.43), és evident una intensa tinció nuclear específica a moltes cèl.lules d'una població en creixement exponencial (Fig.43). Tanmateix, també s'observa una població amb una tinció heterogènea a les cèl.lules en creixement exponencial, el que sugereix que els nivells de proteïna Sp1 poden dependre del cicle cel.lular. A les cèl.lules quiescents la presència de Sp1 al nucli és pràcticament indetectable (Fig.43  $t=0$ ), i donat que no s'observa un increment paral·lel en la fluorescència al citoplasma, és possible que aquestes cèl.lules no continguin proteïna Sp1. Després de l'addició de sèrum, la proteïna Sp1 reapareix ràpidament al nucli, i s'assoleix un pic

dels seus nivells nuclears aproximadament a les 9 hores d'estimulació per sèrum (Fig.43).

La població sincronitzada es tenyeix de manera més homogènea per Sp1 que les cèl.lules en creixement exponencial, el que corrobora la idea que Sp1 es troba regulat tant en funció de les fases del cicle com del creixement.

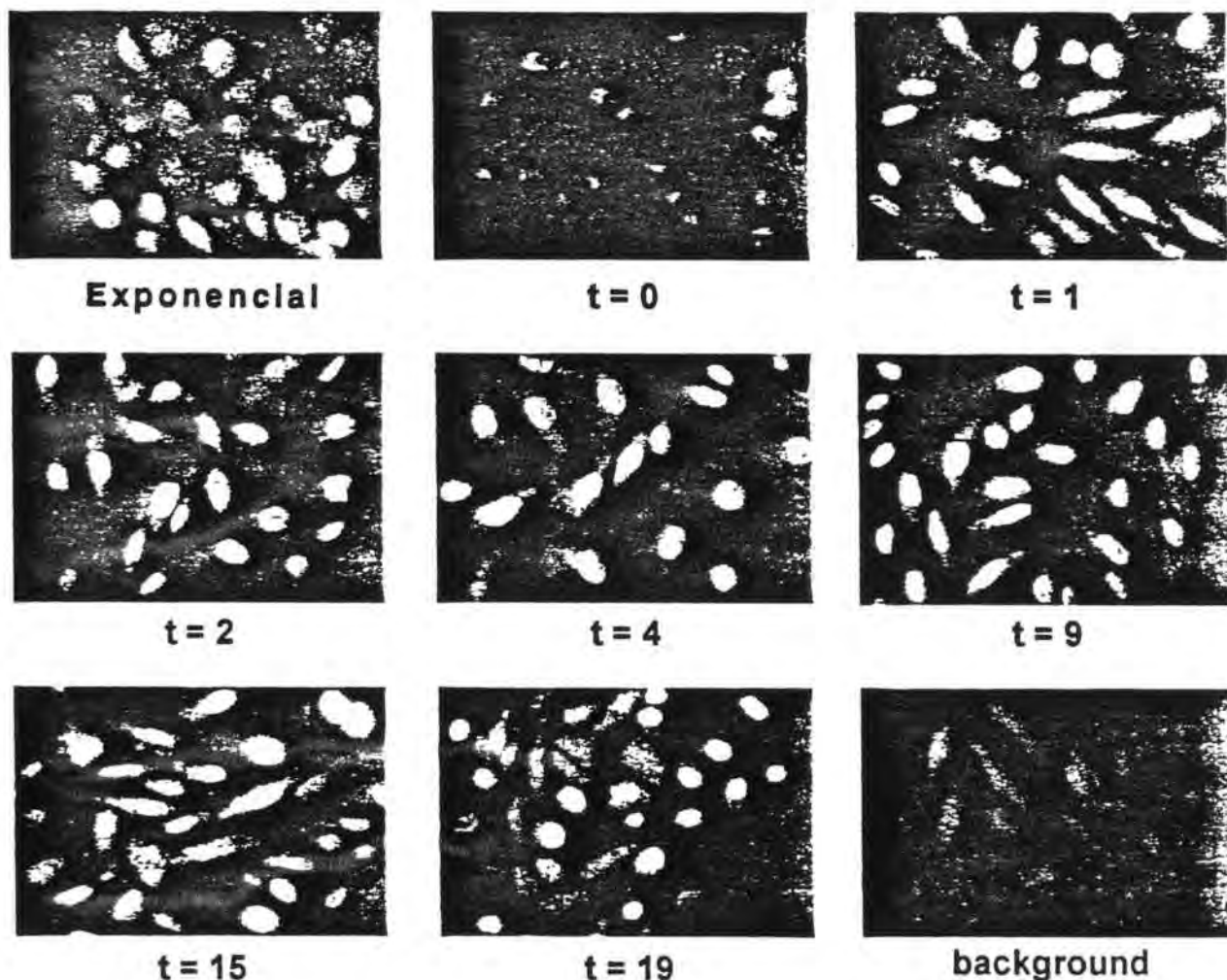


Fig. 43 Assaig d'immunofluorescència *in situ*

La determinació de la localització intracel.lular de Sp1 es va realitzar mitjançant la tècnica de FISH segons es descriu a Materials i Mètodes, en cèl.lules en creixement exponencial i sincronitzades en G<sub>0</sub> i posteriorment estimulades a proliferar per addició de sèrum.

### 3.16. RELACIO ENTRE TRANSCRIPCIO I AMPLIFICACIO

Una de les teories que existeixen per explicar el mecanisme de l'amplificació gènica es basa en un increment de la transcripció de determinats gens que, posteriorment, a través de processos de recombinació i reparació, originen finalment estructures amplificades.

Havíem observat que el tractament amb TPA comportava un increment en el número de colònies resistents al MTX, i que el 70% d'aquestes colònies contenien còpies amplificades del gen *dhfr*. També havíem relacionat l'increment de la transcripció del gen *dhfr* al llarg de la proliferació cel.lular amb l'augment en la unió del factor de transcripció Sp1 al promotor d'aquest gen, i amb aquestes premises, vam decidir explorar l'efecte que podria tenir el tractament amb TPA sobre la unió de Sp1.

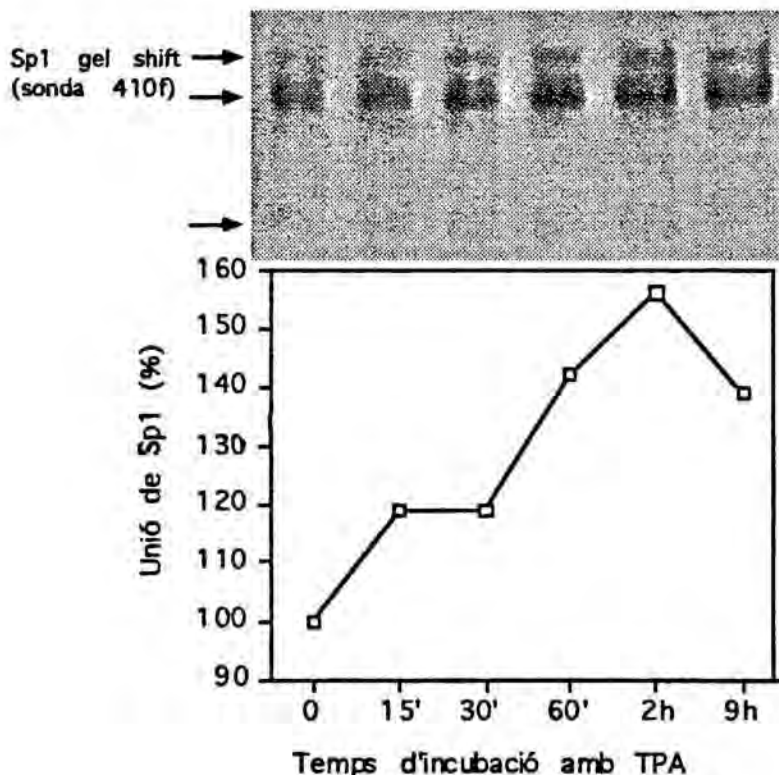


Fig. 44 Efecte del TPA sobre la unió de Sp1 a la sonda 410f

Es van fer reaccionar 2  $\mu\text{g}$  d'extracte nuclear de cèl.lules K1 tractades amb TPA (0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a diferents temps, tal com s'indica a la figura, en presència de 2  $\mu\text{g}$  de poli(di-dC) com a DNA inespecífic, amb la sonda 410f (20.000 cpm/reacció). Les bandes retardades així originades s'indiquen amb fletxes a la figura, que també mostra el resultat obtingut en la densitometria. L'increment en la unió de Sp1 s'expressa en percentatges, i el valor del 100% correspon a l'unió observada en absència de tractament amb TPA.

Tal com es pot observar a la Fig. 44, el TPA, a la concentració de 0.3  $\mu\text{g/ml}$ , va provocar un increment en la unió del factor de transcripció Sp1 al promotor mínim del gen *dhfr*, amb dependència del temps del tractament.

Per tal de sensibilitzar l'assaig de detecció de l'increment de Sp1 a conseqüència del tractament amb TPA, vam procedir a realitzar l'assaig de retardació de la mobilitat electroforètica en presència de mitramicina, a una concentració de 50  $\mu\text{M}$ . Els resultats es mostren a la Fig.45.

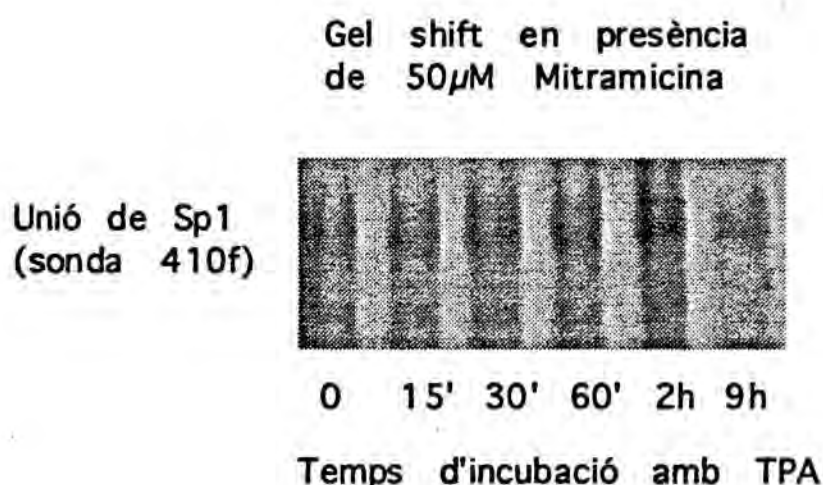
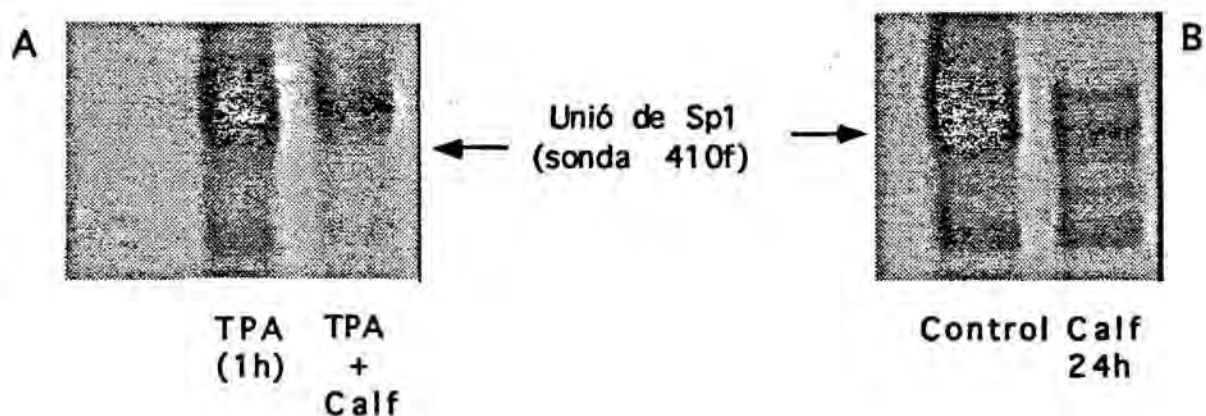


Fig. 45 Efecte del TPA sobre la unió de Sp1 en presència de mitramicina  
Assaig de retardació de la mobilitat electroforètica de la sonda 410f amb extractes nuclears de cèl.lules K1 tractades amb TPA, en presència de mitramicina 50  $\mu\text{M}$ .  
La sonda 410f (20.000 cpm/reacció) es va incubar amb mitramicina a la concentració de 50  $\mu\text{M}$  durant 15 minuts, previament a la reacció amb 2  $\mu\text{g}$  d'extracte nuclear de cèl.lules K1 tractades amb TPA a diferents temps, tot utilitzant 2  $\mu\text{g}$  de poli(dl-dC) com a DNA inespecífic.

Haviem determinat previament que el tractament amb l'inhibidor de la PKC, calfofostina C, era capaç de contrarrestar l'increment en el número de colònies resistents al MTX generat pel TPA. En aquesta mateixa direcció, vam observar que l'increment en la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr* a conseqüència del tractament amb TPA es podia contrarrestar en presència de calfofostina C, a la concentració de  $10^{-7}$  M durant 24 hores (Fig. 46a)

La calfostina C en aquestes mateixes condicions de concentració i temps també va reduir la unió de Sp1 al promotor mínim del gen *dhfr* en condicions basals (Fig. 46b).



**Fig. 46 Efecte de la calfostina C sobre la unió de Sp1 a la sonda 410f**

A) Les cèl.lules K1 es van tractar amb TPA ( $0.3 \mu\text{g/ml}$ ) durant 1 hora, en absència o en presència de calfostina C. El tractament amb calfostina es va realitzar durant 24 hores i a la concentració de  $10^{-7}$  M. Els extractes nuclears resultants es van emprar per assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb la sonda 410f (20.000 cpm/reacció), en presència de poli(dl-dC) com a DNA inespecífic.

B) Es van obtenir extractes nuclears de cèl.lules K1 control i tractades amb calfostina C durant 24 hores a la concentració de  $10^{-7}$  M, que es van utilitzar en assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica amb la sonda 410f (20.000 cpm/reacció), en presència de poli(dl-dC) com a DNA inespecífic.

Per tant, existeix un lligam entre les condicions que poden afavorir i reduir la resistència per ampliació al MTX, i la unió del factor de transcripció Sp1 al promotor del gen *dhfr*. Aquests resultats estarien d'acord amb el mecanisme que proposa un increment de la transcripció per explicar la resistència per ampliació gènica.

## **4. DISCUSSIO**

Un dels greus problemes que presenta la quimioteràpia anticancerosa és l'aparició de resistència al tractament. Aquesta resistència pot ésser deguda a mutacions o amplificació gènica del *locus* que codifica per a l'enzim diana d'atac de la droga quimioteràpica, a una reducció del transport intracel·lular de la droga o a través del desenvolupament del fenotipus MDR, que comporta la reducció de l'acumulació intracel·lular de la droga.

La reducció de la resistència al tractament quimioteràpic té per tant una importància vital en l'èxit d'aquest, i podria constituir per ella mateixa un tipus de quimioteràpia, basada en l'administració conjunta del fàrmac anticancerós i d'un modulador de la resistència.

Gran part del nostre treball experimental té com a objectiu l'estudi de les vies bioquímiques que condueixen al desenvolupament de la resistència a les drogues quimioteràpiques, com una primera etapa del procés per trobar compostos capaços de reduir-la.

#### **4.1. ESTUDI DE LES VIES BIOQUÍMIQUES INVOLUCRADES EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA RESISTENCIA**

Una via per obtenir colònies resistents al MTX consisteix en incubar les cèl·lules amb concentracions gradualment creixents de la droga. Aquest procés presenta però l'inconvenient que es desenvolupa molt lentament i per aquesta raó vam recórrer a la utilització d'efectors que poden incrementar la resistència de forma ràpida i facilitar així l'estudi d'aquest procés.

S'ha descrit la capacitat que tenen certs efectors per incrementar la resistència al MTX, com poden ésser els inhibidors de la síntesi de DNA com l'HU i l'APH (Brown *et al.*, 1983; Sherwood *et al.*, 1988), les radiacions U.V. (Tlsty *et al.*, 1984; Kleinberger *et al.*, 1986), alfa (Lücke-Huhle & Herrlich, 1987) i gamma (Scharma & Schimke, 1989), els agents mutàgens com l'EMS (Kleinberger *et al.*, 1986), l'estat d'hipoxia (Rice *et al.*, 1986), hormones mitogèniques (Barsoum & Varshavsky,

1983) i els promotors tumorals com la mezereina (Barsoum & Varshavsky, 1983) i els esters de forbol (Varshavsky, 1981).

En una primera aproximació, hem reproduït l'efecte observat de l'HU i de l'APH sobre el número de colònies resistents al MTX en les cèl.lules CHO. En els dos casos, la inhibició de la síntesi del DNA a través d'aquests efectors provoca un gran increment en el número de colònies resistents al MTX, resultat que estaria d'acord amb un dels mecanismes establerts per explicar la resistència per amplificació que es basa en una sobrerreplicació de gens a conseqüència de l'inhibició transitòria de la síntesi de DNA, que posteriorment originaria estructures amplificades (Mariani & Schimke, 1984).

Posteriorment, a partir dels resultats descrits per Varshavsky (1981) en relació amb l'increment de la resistència al MTX mitjançant el tractament de les cèl.lules amb TPA, i donat que el TPA és un activador de la PKC, vam explorar la possible participació d'aquest enzim en la via bioquímica que porta a la producció de colònies resistents al MTX.

També s'havia descrit la capacitat del TPA per generar resistència al tractament amb MTX en cèl.lules CHO (Bojan *et al.*, 1983). Aquests autors van observar que el TPA, en cèl.lules de hamster, només incrementava 3 vegades la resistència al MTX, al N-(fosfonacetil)-L-aspartat i al cadmi. Vam confirmar l'efecte del TPA en la línia cel.lular K1 de CHO. L'efecte produït a les cèl.lules 3T6 és molt superior a l'obtingut en cèl.lules CHO i aquest diferent comportament podria ésser inherent al tipus cel.lular. Les cèl.lules K1 serien per tant menys susceptibles que les cèl.lules 3T6 a la manifestació de la resistència. La raó per la nostra utilització de cèl.lules CHO és la disponibilitat de nombrosos mutants del *locus dhfr* en aquest tipus cel.lular que s'han utilitzat al llarg del nostre treball.

Un cop reproduït l'efecte del TPA sobre el número de colònies resistents al MTX, vam assajar la dependència del temps d'aquest efecte. Donat que en els experiments de Varshavsky, es mantenia l'ester de forbol en el medi de cultiu durant tot el període de selecció amb MTX, no era possible discernir si l'efecte d'increment del número de colònies resistents al MTX era degut a una activació inicial de la PKC o a la seva posterior degradació per proteòlisi, a conseqüència del tractament perllongat amb el TPA.



D'aquesta manera, hem observat que la resistència a la droga es pot assolir sense necessitat de mantenir l'èster de forbol en el medi d'incubació durant tot el procés de selecció amb MTX. De fet, mostrem que l'aparició de colònies resistents ja es produeix quan les cèl.lules s'incuben amb TPA durant només 15 minuts. D'acord amb els nostres resultats sobre l'activitat PKC en cèl.lules CHO, aquest enzim assoleix la seva translocació i activació màximes després de 15 minuts d'incubació amb l'èster de forbol. Per tant, segons les dades dels experiments de generació de colònies resistents i d'activació de la PKC amb el tractament amb TPA en dependència del temps, és probable que el desenvolupament de colònies resistents s'iniciï per la translocació i activació de la PKC. L'aparició de colònies resistents per acció del TPA no està relacionada amb la proteòlisi de l'enzim, ja que l'inhibidor calfofostina C no evita la translocació de la PKC deguda al TPA, però és molt efectiu a l'hora de reduir de la freqüència de la resistència incrementada per l'èster de forbol fins a nivells basals.

La PKC és un enzim que depèn per la seva activació de la presència de calci i fosfolípids. En aquest sentit, també documentem que agents que provoquen la mobilització del calci intracel.lular, com els ionòfors de calci A23187 i ionomicina i l'angiotensina II, són capaços d'incrementar la freqüència d'aparició de colònies resistents al MTX. En el cas de l'ionòfor A23187 i l'angiotensina II, hem observat l'activació de la PKC amb el tractament amb aquests dos efectors, encara que l'efecte obtingut és molt inferior a l'activació de la PKC generada amb el tractament amb TPA.

Les cèl.lules CHO expressen varies isoformes de la PKC, principalment les isoformes  $\alpha$  i  $\delta$  (Watanabe *et al.*, 1992). Els nostres resultats amb els ionòfors A23187 i ionomicina, l'angiotensina II i el TPA conjuntament amb l'EGTA sugereixen que la resistència al MTX és portada a terme, al menys en part, pels isoenzims de la PKC dependents de calci.

Un cop establerta l'implicació de la PKC en el procés de formació de colònies resistents en resposta al tractament amb TPA i a agents que mobilitzen el calci cel.lular, vam explorar l'efecte de diferents inhibidors de la PKC sobre la resistència al MTX incrementada per acció del TPA. El fet que els 4 inhibidors de la PKC assajats (H-7, àcid glicirritènic, estaurosporina i calfofostina C), sempre a concentracions



que no afecten la viabilitat cel.lular, són capaços de contrarrestar la resistència al MTX incrementada pel TPA, és una prova addicional de la possible implicació de la PKC en la via que porta a la formació de colònies resistents al MTX.

A aquest nivell, és interessant considerar l'efecte dual que exerceix l'estaurosporina, tal com s'ha descrit a la secció de Resultats. Aquest comportament dual es pot explicar pel fet que l'estaurosporina és capaç de translocar la PKC a les membranes, tal com s'ha descrit en vesicles de membranes d'eritròcits (Wolf & Baggiolini, 1988) i en hepatòcits (Díaz-Guerra *et al.*, 1991), i tal com hem pogut observar en cèl.lules CHO. L'activitat PKC a la membrana que resulta de l'incubació amb estaurosporina depèn de la concentració emprada d'aquest inhibidor. A concentracions baixes, de l'ordre de 5-10 nM, l'enzim translocat mostra una activitat superior a la del control, i quan s'utilitzen concentracions més elevades d'estaurosporina, la PKC translocada a la membrana està totalment inhibida. Aquests resultats estan d'acord amb els descrits per Wolf i Baggiolini (1988), que van observar la translocació de la PKC per acció de l'estaurosporina i la inhibició de l'activitat d'aquest enzim associada a la membrana a partir de concentracions d'estaurosporina de 20 nM, tant en absència com en presència d'esters de forbol. L'inconvenient que presenta l'utilització de l'estaurosporina en incubacions cel.lulars a concentracions superiors a 10 nM és la mort cel.lular per apoptosi (Falcieri *et al.*, 1993). Per tant, l'estaurosporina a la concentració de 5 nM utilitzada per raons de viabilitat cel.lular, podria actuar com un agonista en absència de TPA, però ésser capaç de contrarrestar l'acció de l'ester de forbol en incubacions conjuntes. De fet, l'estaurosporina *in vitro* és capaç d'inhibir, de manera dependent de la concentració, l'activitat PKC translocada a la fracció de les membranes per acció del TPA. L'efecte dual que manifesta l'estaurosporina es pot interpretar com una indicació addicional de l'implicació de la PKC en el desenvolupament de la resistència al MTX. En aquesta direcció, també hem observat que la calfostina C és capaç d'abolir l'efecte sobre la resistència generat per l'estaurosporina sola.

## **4.2. DETERMINACIÓ DEL GRAU D'AMPLIFICACIÓ GÈNICA ASSOLIT AMB EL TRACTAMENT AMB DIFERENTS EFECTORS**

També hem determinat que el principal mecanisme responsable de la resistència al MTX en cèl·lules CHO és l'amplificació gènica. El tractament amb efectors que afavoreixen l'aparició de colònies resistents com l'HU, l'APH i el TPA provoquen un increment en el número de còpies del gen *dhfr* a les cèl·lules resistents.

La determinació del grau d'amplificació gènica implica normalment créixer els clons resistents inicials fins a l'obtenció d'un número suficient de cèl·lules per a la preparació de DNA genòmic. L'expansió dels clons inicials s'ha de realitzar sota condicions selectives, ja que l'absència de la droga pot provocar la pèrdua de les còpies amplificades del gen considerat. Tanmateix, el creixement de les cèl·lules en condicions selectives és molt lent i degut a la presència de la droga, el procés d'amplificació pot progressar i donar lloc finalment a una línia cel·lular amb un número de còpies amplificades superior a la dels clons resistents inicials. Per aquestes raons, és important tenir la capacitat de determinar el número de còpies d'un gen a partir de colònies aïllades com a material de partida.

Per a la determinació del número de còpies del gen *dhfr* en colònies resistents al MTX després del tractament amb els efectors esmentats, presentem un mètode basat en la reacció de P.C.R. en condicions quantitatives, i que permet treballar amb colònies resistents aïllades com a material de partida. La possibilitat d'analitzar cèl·lules resistents que resulten de la primera selecció amb MTX, sense necessitat d'una expansió d'aquestes cèl·lules, és el principal avantatge d'aquest mètode.

El mètode de P.C.R. que hem endegat es basa en l'amplificació d'un fragment del gen *dhfr* que inclou una part de la seqüència dels introns 1 i 2 del gen i l'exó 2 sencer, per obtenir un senyal específic del contingut de DNA genòmic. La reacció es realitza en un número de cicles que assegura la quantitat de la determinació, sense arribar a la saturació. La sensibilitat d'aquest mètode permet diferenciar el senyal entre una i dues còpies del gen, i també és possible detectar la presència de còpies amplificades de manera quantitativa, tal com hem

pogut establir en línies cel.lulars amb número conegut de còpies del gen *dhfr*.

Un altre avantatge d'aquest mètode és la seva rapidesa, ja que tot el procés de determinació des de la lisi de la colònia fins al resultat final de l'electroforèsi es pot realitzar en un sol dia. Aquesta característica contrasta amb el temps i l'esforç necessaris en la realització de la tècnica de Southern blot per determinar la presència de còpies amplificades d'un gen, que requereix l'expansió dels clons inicials, l'obtenció de DNA genòmic, la digestió del DNA amb enzims de restricció, l'electroforèsi, la transferència, el marcatge de la sonda, l'hibridació i el procés de rentat dels filtres.

### **4.3. PAPER DE LA PKC EN ELS DIFERENTS MECANISMES DE RESISTÈNCIA A LES DROGUES**

La PKC es troba clarament involucrada en la resposta cel.lular que porta a la resistència a les drogues quimioteràpiques a través de diferents mecanismes. S'ha descrit que l'expressió del fenotipus MDR, responsable de la resistència a productes citotòxics d'origen natural com les antraciclins, les epipodofilotoxines, alguns antibiòtics i els alcaloides de la *Vinca*, s'acompanya de canvis en l'activitat de la PKC (Fine *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1992). L'activació de la PKC *in vivo* comporta la fosforilació de la P-glicoproteïna característica del fenotipus MDR i la reducció en l'acumulació intracel.lular de la droga (Hamada *et al.*, 1987), mentre que l'inhibició de la PKC pot revertir parcialment aquest fenotipus (Ma *et al.*, 1991). Nosaltres descrivim que la presència d'inhibidors de la PKC contrarresta l'efecte del TPA, que incrementa el número de colònies que sobreviuen a l'exposició al MTX, principalment a través del mecanisme d'amplificació gènica.

Els resultats obtinguts en relació amb l'efecte del TPA sobre l'increment de la resistència al MTX, principalment per amplificació del gen *dhfr*, estan en concordància amb el comportament observat a les cèl.lules TNR9, una línia cel.lular derivada de 3T3, que no desenvolupa processos de resistència a través de mecanismes d'amplificació gènica amb el tractament amb TPA (Herschmann, 1985). L'anàlisi de les característiques d'aquestes cèl.lules va revelar que només mostraven

un 10-15% del contingut normal fosforilat del substrat de 80 kDa de la PKC (Biemann & Erikson, 1990).

D'acord amb els resultats presentats, podem concloure que el procés de formació de colònies resistents al MTX pot tenir lloc a través d'un mecanisme que involucra la PKC. Per avaluar la possibilitat d'utilitzar inhibidors de la PKC en clínica, conjuntament amb el tractament quimioteràpic amb MTX, hem estudiat l'acció de la calfostina C sobre la resistència basal al MTX. Hem observat que aquest inhibidor de la PKC és efectiu en la reducció de la resistència basal, el que obra una porta a la seva possible administració com a modulador de la resistència a la teràpia amb MTX. En aquesta direcció i de resultats preliminars obtinguts amb limfòcits humans, sabem que el tractament amb calfostina C durant 24 hores, no afecta pràcticament a la viabilitat ni a la capacitat de resposta d'aquestes cèl.lules.

#### **4.4. EFECTE DE LA LIPOPEROXIDACIO SOBRE LA RESISTENCIA AL MTX**

El TPA mimetitza l'activació del diacil glicerol sobre la PKC, però a nivell endògen les cèl.lules sintetitzen tota una sèrie de metabòlits que també tenen la capacitat d'activar aquest enzim. Aquest és el cas de l'àcid araquidònic i els seus metabòlits originats per acció de les lipoxigenases (Shearman *et la.*, 1989; Liu *et al.*, 1991). Amb aquestes premisses, vam assajar l'efecte d'aquests compostos sobre la formació de colònies resistents al MTX. Vam així observar que l'àcid araquidònic i que el 12-HETE, un dels seus metabòlits lipoxigenats, eren capaços d'incrementar de forma notable el número de colònies resistents al MTX.

Posteriorment, vam estudiar l'efecte de diferents inhibidors sobre l'increment en el número de colònies resistents al MTX que genera l'àcid araquidònic.

Hem determinat que tant el DAS com el proadifen, que inhibeixen l'activitat del citocrom P450, així com la calfostina C, que inhibeix la PKC, són capaços de contrarrestar l'augment en el número de colònies resistents originat amb el tractament amb àcid araquidònic. Aquests resultats sugereixen que l'àcid araquidònic origina per acció del

citocrom P450 un metabòlit capaç d'activar la PKC i que podria formar part de la via de desenvolupament de la resistència al MTX.

Hem demostrat que el tractament amb paracetamol, que inhibeix l'enzim glutation-S-transferasa afavoreix la formació de colònies resistents al MTX, tant en absència com en presència d'àcid araquidònic. Segons aquests resultats, una inhibició de l'activitat glutation-S-transferasa afavoriria el procés de resistència al MTX, ja que no es degradaria el metabòlit activador d'aquest procés originat a conseqüència del metabolisme de l'àcid araquidònic. En aquesta direcció s'ha descrit que el tractament amb DAS provoca l'inducció de l'activitat glutation-S-transferasa, i aquest efecte està relacionat amb les propietats antitumorals del DAS (Sparmins *et al.*, 1988). El DAS seria per tant un altre possible candidat per actuar com a modulador de la resistència, conjuntament amb la teràpia amb MTX.

#### **4.5. ESTUDI DEL PROMOTOR MINIM DEL GEN *dhfr* EN CONDICIONS BASALS**

Paral·lelament a l'estudi de les vies bioquímiques que podrien trobar-se involucrades en el desenvolupament de la resistència al MTX, vam voler aprofundir en el coneixement del promotor del gen *dhfr* i dels factors que regulen la seva transcripció, tant a nivell basal com al llarg del creixement cel·lular. L'estudi dels factors que control·len l'increment de l'activitat DHFR en el procés de la proliferació podria ajudar en el desenvolupament de noves estratègies per evitar la resistència al MTX, deguda principalment a l'amplificació del gen *dhfr*, donat que un dels mecanismes proposats per aquest tipus de resistència per amplificació es basa en un increment de la transcripció de gens específics, que posteriorment, mitjançant processos de recombinació genètica i de reparació, originarien estructures amplificades (Mellon *et al.*, 1987; Stewart & Roeder, 1989; Eastman *et al.*, 1991).

En primer lloc, vam procedir a la caracterització dels elements que regulen la transcripció del gen *dhfr* de hamster, tot treballant amb el promotor mínim d'aquest gen que conté dos elements reguladors per a la unió dels factors de transcripció Sp1 i E2F. S'havia demostrat previament que existia una estreta correlació entre l'activitat

transcripcional del promotor del gen *dhfr* i la unió del factor Sp1, en una anàlisi per mutacions puntuals del promotor mínim del gen, que conté únicament la caixa GC més proximal a l'inici major de la transcripció (Ciudad *et al.*, 1992). Altres autors també han mostrat aquesta correlació entre la unió de Sp1 i un increment de la transcripció del gen *dhfr* (Swick *et al.*, 1989; Blake *et al.*, 1990).

Hem analitzat la unió del factor de transcripció Sp1 al promotor mínim del gen *dhfr*, amb la utilització de la sonda 410f, que conté les seqüències d'unió per Sp1 i E2F, i extractes nuclears de cèl.lules K1 de CHO en fase de creixement exponencial, en assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica. La identitat d'aquesta unió es va confirmar mitjançant la mutació puntual de la caixa GC, que correspon a la seqüència de reconeixement del factor Sp1, per inhibició de la unió de Sp1 amb la droga mitramicina i amb l'utilització d'un anticòs específic contra Sp1.

La sonda 26f, que conté dues caixes d'unió a Sp1, origina un patró de bandes retardades equivalent a l'obtingut amb 410f. Aquestes bandes poden ésser competides amb 410f sense marcar, el que demostra que la unió és deguda al factor de transcripció Sp1. D'altra banda, 414f o 413f no donen cap retardació per ells mateixos, però en assaigs de competició amb la sonda 410f, 414f és capaç de competir mentre que 413f no ho fa. La capacitat de 414f de competir pot explicar-se pel fet que encara que no contingui l'hexanucleòtid GGGCGG, nucli central del consensus d'unió per Sp1, manté part de la seqüència d'unió per a aquest factor.

Amb les sondes Sp1f i e2Ff, que contenen les seqüències de reconeixement per Sp1 i E2F, respectivament, hem pogut establir la capacitat d'unió relativa d'aquests dos factors de transcripció al promotor del gen *dhfr*. La capacitat d'unió del factor Sp1 a nivell de la seva seqüència de reconeixement i per tant d'activació transcripcional, és molt superior a la del factor E2F, tot i que la presència de la seqüència consensus d'unió per E2F permet arribar a la màxima unió de Sp1. Així mateix es pot observar com la presència de la seqüència de reconeixement d'E2F a la sonda 410f origina una tercera banda extra, en comparació amb les dues obtingudes amb Sp1f sols, però que no pot ésser competida pel fragment e2Ff. Aquests resultats sugereixen que la unió d'E2F pot generar una conformació especial del promotor del gen *dhfr*,

de manera que augmenta l'afinitat d'unió de Sp1. En aquest sentit, s'ha demostrat que la unió d'E2F té un efecte dramàtic en el plegament del DNA (Huber *et al.*, 1994).

#### **4.6. REGULACIO DEL GEN *dhfr* EN EL PROCES DE PROLIFERACIO CEL.LULAR**

Un cop establerta la importància del factor de transcripció Sp1 en la transcripció del gen *dhfr*, vam procedir a l'estudi de la regulació del gen en el pas de l'estat quiescent a l'estat proliferatiu. L'expressió del gen que codifica per l'enzim DHFR, involucrat en la síntesi de purines, timidilat i glicina, es troba regulada al llarg del cicle cel.lular i durant el procés de creixement de les cèl.lules (Johnson *et al.*, 1978; Hendrickson *et al.*, 1980; Santiago *et al.*, 1984; Farnham & Schimke, 1985; Means *et al.*, 1992; Slansky *et al.*, 1993). El paper d'E2F en la transcripció i la regulació en el procés del proliferació cel.lular del promotor del gen *dhfr* ha estat àmpliament estudiat pels grups d'Azizkhan (Blake & Azizkhan, 1989; Wade *et al.*, 1992) i de Farnham (Means *et al.*, 1992; Slansky *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994). Tanmateix, fins a l'actualitat, s'ha considerat que el factor de transcripció Sp1 tenia un paper purament constitutiu en relació amb l'activació de la transcripció del gen *dhfr* i que aquest factor no presentava canvis en la seva activitat en la regulació del procés de creixement cel.lular. Aquestes afirmacions es basen en els resultats obtinguts amb construccions que contenen diferents llocs d'unió per Sp1 del promotor del SV40 i portadores del gen marcador *luciferasa*, que es van transfectar en cèl.lules NIH 3T3 de manera transitòria. Les cèl.lules així transfectades van ésser deprivades de sèrum fetal durant 44 o 60 hores i posteriorment, estimulades amb medi fresc amb un 10% de sèrum fetal.

Donada la gran capacitat del factor Sp1 per activar la transcripció, hem reexaminat el paper de Sp1 en la regulació durant la proliferació del promotor del gen *dhfr* de hamster, tot analitzant la unió d'aquest factor a partir d'extractes nuclears obtinguts de cèl.lules CHO en estat quiescent i posteriorment estimulades a proliferar.



El mètode de sincronització que hem emprat ha estat la deprivació de sèrum fetal durant 7 dies, ja que els períodes de temps inferiors no permeten l'obtenció d'un percentatge majoritari de cèl.lules en la fase G<sub>0</sub>. Posteriorment, s'han establert els períodes de temps de l'alliberació per addició de sèrum necessaris per a l'obtenció de poblacions aïllades a cada fase del cicle cel.lular. Alguns autors consideren que el concepte de regulació al llarg del cicle cel.lular només pot aplicar-se en el cas de cèl.lules en estat proliferatiu, i que la sincronització en estat quiescent i posterior estimulació suposa una alteració del cicle cel.lular normal (Farnham & Schimke, 1986). Segons Pardee (1989), la proliferació es defineix com l'increment en el número de cèl.lules que resulta del compliment del cicle cel.lular a partir d'un estat quiescent o de la fase G<sub>1</sub>, a diferència del creixement que equival a un increment de la massa cel.lular. Tanmateix, la progressió del cicle té lloc conjuntament amb el creixement cel.lular, durant les fases G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>. Per aquestes raons, i considerant el tipus d'experiments que hem realitzat hem escollit referir-nos als nostres resultats sota el concepte de regulació a nivell de proliferació.

Una primera conclusió del nostre treball en aquesta direcció, és que la unió de Sp1 al promotor mínim del gen *dhfr* de hamster es troba regulada a nivell de la proliferació quan les cèl.lules CHO en estat quiescent són estimulades per addició de sèrum fetal. Aquesta conclusió contrasta amb les observacions de Dou *et al.* (1991) que descriuen que la unió de Sp1 al promotor del gen *timidina quinasa* és constitutiva al llarg del cicle cel.lular. Una possible explicació per aquests resultats contraposats radica en el fet que aquests autors sincronitzen les cèl.lules per deprivació de sèrum fetal durant 60 hores, en lloc de les 168 hores segons les nostres condicions experimentals. Tal com hem observat, en cèl.lules de hamster, els nivells de proteïna Sp1 a les 72 hores de deprivació de sèrum fetal estan clarament disminuïts i s'observa una reducció del 70% als 7 dies.

L'increment en la unió a nivell de la seqüència de reconeixement de Sp1 s'observa en assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica, tant amb el promotor mínim sencer com amb el fragment d'aquest promotor que només conté el lloc d'unió per Sp1, separat del lloc d'unió per E2F. També hem observat, després de l'estimulació per sèrum de cèl.lules sincronitzades, un increment en la unió a nivell de la seqüència de

reconeixement d'E2F, en consonància amb la conclusió que E2F es troba involucrat en la regulació del promotor del gen *dhfr* durant el creixement cel·lular.

La diferència entre els nostres resultats en relació amb la regulació de la unió de Sp1 i d'E2F al llarg de la proliferació i els d'altres autors (Slansky *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994), que postulen que Sp1 només té un paper constitutiu en la proliferació, pot ésser deguda a l'utilització de línees cel·lulars diferents, de ratolí en lloc de hamster; a la metodologia emprada per avaluar l'activitat transcripcional i al fet de seguir protocols diferents per sincronitzar les cèl·lules, previament a la seva reestimulació.

#### **4.7. REGULACIO DE L'EXPRESSIO DEL GEN *dhfr* EN EL PROCES DE PROLIFERACIO CEL·LULAR**

L'increment observat en la unió del factor Sp1 al promotor del gen *dhfr* en el procés de proliferació de les cèl·lules K1 de CHO, es tradueix en una activació transcripcional del gen, tal com vam determinar a partir de la detecció mitjançant la tècnica de RT-PCR de fragments de transcrits que encara no han sofert l'eliminació dels introns. La filosofia d'aquesta aproximació metodològica radica en considerar que la vida mitja dels introns és molt curta, de l'ordre de 5 a 10 minuts, i per tant variacions en els seus nivells es poden considerar com una mesura de l'activitat transcripcional. La presència d'aquests intermediaris anteriors a la producció del mRNA madur es pot determinar mitjançant la tècnica de RT-PCR si s'inclou en el protocol un pas de degradació del possible DNA genòmic contaminant de la mostra de RNA total, previament a la realització de la síntesi de cDNA que s'utilitza en la reacció de P.C.R. D'aquesta manera només es detecten els fragments que contenen zones intròniques ja transcrites. Aquesta metodologia és molt sensible, relativament senzilla de portar a terme, i requereix uns nivells de radioactivitat molt més baixos que els emprats en la tècnica de run-on per a la determinació de la transcripció.

Paral·lelament a l'activació transcripcional, es produeix l'increment en els nivells de mRNA corresponents al gen *dhfr* després de l'estimulació per sèrum de cèl·lules en estat quiescent. La determinació dels nivells

de mRNA també es va realitzar mitjançant la tècnica de RT-PCR en condicions quantitatives, a partir de RNA total de cèl.lules en cada fase del cicle cel.lular i amb l'utilització d'oligonucleòtids que hibriden a zones exòniques de la seqüència del gen. En aquest cas també la metodologia seguida presenta molts avantatges respecte al mètode clàssic de Northern blot, en relació al temps necessari per portar-lo a terme, i els nivells de radioactivitat emprats.

Els resultats dels nivells de mRNA pel gen *dhfr* estan en consonància amb els obtinguts en els experiments de retardació de la mobilitat electroforètica i confirmen els resultats previs sobre la correlació existent entre la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr* i la seva activitat transcripcional (Ciudad *et al.*, 1992).

L'increment en els nivells de mRNA corresponent al gen *dhfr* també és degut a l'increment de l'estabilitat del missatge madur. La determinació de la vida mitja es va basar en l'incubació de les poblacions cel.lulars amb actinomicina D per bloquejar la síntesi de RNA. A diferents temps i per a cada població, s'obtenien mostres de RNA total per a la reacció de RT-PCR. D'aquesta manera, vam poder establir que la vida mitja del mRNA corresponent al gen *dhfr* en les cèl.lules sincronitzades en Go és només de 45 minuts, mentre que en cèl.lules en fase de creixement exponencial, la vida mitja del mRNA és de 8 hores (Urlaub *et al.*, 1989).

Existeix una certa discrepància sobre els mecanismes moleculars que condueixen a l'increment del mRNA estable corresponent al gen *dhfr* al llarg del cicle cel.lular. Dos mecanismes són possibles per explicar aquest comportament: un increment en el grau de transcripció del gen i/o un increment de l'estabilitat del mRNA format. Fins a l'actualitat s'han descrit resultats que verifiquen les dues possibilitats per separat. Per una part, els grups de Schimke (Famham & Shimke, 1985; 1986) i Johnson (Wu & Johnson, 1982; Santiago *et al.*, 1984) aboguen per un increment en la transcripció del gen a l'interfase G1/S que donaria lloc a un major número de transcrits correctament iniciats i que després de l'eliminació dels introns serien traduïts a proteïna. D'altra banda, els resultats del grup de Kellems (Leys & Kellems, 1981; Leys *et al.*, 1984) expliquen l'increment dels nivells de mRNA pel gen *dhfr* mitjançant variacions en la seva vida mitja, en funció de si les cèl.lules es troben a la fase Go o en creixement exponencial. Segons aquests autors, la quantitat de mRNA estable corresponent al gen *dhfr* es regula

a través de la seva pròpia estabilitat, sense que es produeixi un increment en la transcripció del gen. Pels nostres resultats sobre l'activació transcripcional del gen *dhfr* després de l'estimulació per sèrum de cèl·lules quiescents i sobre l'estabilitat del mRNA en cèl·lules sincronitzades en G<sub>0</sub> i en fase de creixement exponencial, podem concloure que l'increment en els nivells de mRNA corresponents al gen *dhfr* en el procés de proliferació és degut tant a l'activació transcripcional del gen com a l'increment de l'estabilitat del missatger.

Així, les cèl·lules en estat quiescent presentarien nivells molt baixos de missatger perquè la seva degradació es troba molt accelerada i el grau de transcripció és molt baix, i de manera recíproca, les cèl·lules en fase de creixement exponencial podrien arribar a acumular major quantitat de missatger madur degut a la seva major transcripció i estabilitat.

#### **4.8. PAPER DE LA PROTEINA RETINOBLASTOMA EN LA REGULACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN *dhfr***

L'activitat transcripcional del factor E2F es troba regulada al llarg del cicle cel·lular a través de la seva interacció amb la proteïna RB, de forma que a les fases G<sub>0</sub> i G<sub>1</sub> la proteïna RB es troba en el seu estat hipofosforilat i es complexa amb E2F tot bloquejant la seva activitat transcripcional. A nivell de l'interfase G<sub>1</sub>/S, RB es fosforila i allibera a E2F que pot aleshores activar la transcripció dels gens que contenen la seva seqüència de reconeixement. Pels nostres resultats, sabem que la transcripció del gen *dhfr* depèn tant de la interacció d'E2F com de la de Sp1 a les seves seqüències d'unió al promotor, i donat que la unió de Sp1 s'incrementa durant el procés de proliferació, és possible que el factor de transcripció Sp1 també interaccionï amb RB.

En aquesta direcció, una altra conclusió del nostre treball sobre la regulació del promotor del gen *dhfr* ha estat que, efectivament, el producte del gen supressor de tumors RB forma un complex amb Sp1 quan aquest s'uneix al promotor del gen, tal com s'ha mostrat en els experiments de superretradació amb extractes nuclears de cèl·lules CHO i la sonda 410f, corresponent al promotor mínim del gen *dhfr*. Els anticossos contra RB, tant policlonals (N9) com monoclonals (XZ77), a

l'igual que un anticòs policlonal contra Sp1, són capaços de provocar una clara superretardació de la prova 410f.

Per estudiar l'efecte del complex transcripcional entre RB i Sp1, vam procedir a la immunoprecipitació dels extractes nuclears amb un anticòs contra RB o contra Sp1. En aquestes condicions, s'aboleix el patró de bandes retardades que s'obté amb la interacció dels extractes nuclears i les sondes 410f i Sp1f.

També vam assajar si la unió de RB a Sp1, quan aquest interacciona amb el promotor del gen *dhfr*, es produïa de forma selectiva en alguna fase concreta del cycle cel.lular. Dels resultats obtinguts en l'experiment de l'estimulació de cèl.lules quiescents per sèrum en dependència del temps, es pot observar que l'anticòs contra RB és capaç de superretardar la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr* a totes les fases del cycle. Donat que l'antioncoproteïna RB pot actuar com a regulador de la progressió del cycle cel.lular, existia la possibilitat que RB pogués controlar la unió i l'activitat de Sp1, quan aquest s'uneix al promotor del gen *dhfr*. En aquesta direcció, s'ha demostrat que els promotors dels gens que codifiquen per l'IGF-II (Kim *et al.*, 1992), c-fos i c-myc (Udvardia *et al.*, 1993) i c-jun (Chen *et al.*, 1994), poden ésser estimulats per la proteïna RB a través de la regulació de la seva transcripció mitjançada per Sp1. També s'ha observat que la cotransfecció de RB juntament amb Sp1 en cèl.lules Schneider SL2 de *Drosophila* provoca un increment notable de la transcripció del gen *dhfr*, independentment de la presència dels llocs d'unio per E2F en el promotor del gen (Udvardia *et al.*, 1993).

Una altra proteïna supressora de tumors, p53, també augmenta els seus nivells i forma heterocomplexes amb Sp1 que estimulen l'activitat d'unio al DNA d'aquest darrer, en cèl.lules TF-1 proliferants en resposta al GM-CSF (Borellini & Glazer, 1993).

Per totes aquestes raons, necessitavem conèixer els nivells de proteïna, tant de Sp1 com de RB, després de l'estimulació per addició de sèrum fetal de cèl.lules quiescents. Els resultats obtinguts en els assaigs de Western blot revelen que els nivells d'aquestes dues proteïnes experimenten un augment amb l'estimulació per sèrum de cèl.lules sincronitzades en Go. Els canvis que afecten a la proteïna Sp1 es corroboren amb els resultats obtinguts de la localització de la proteïna,

mitjançant tècniques d'immunofluorescència *in situ*, després de l'addició de sèrum fetal. Per tant, l'increment de la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr* després de l'estimulació per sèrum es pot deure a l'augment dels nivells de Sp1, i també a l'increment de proteïna RB, que després de complexar-se amb Sp1, podria facilitar la unió d'aquest darrer a la seva seqüència de reconeixement. De fet, s'ha descrit recentment que la proteïna RB recombinant afavoreix l'activitat d'unió al DNA de Sp1 (Chen *et al.*, 1994).

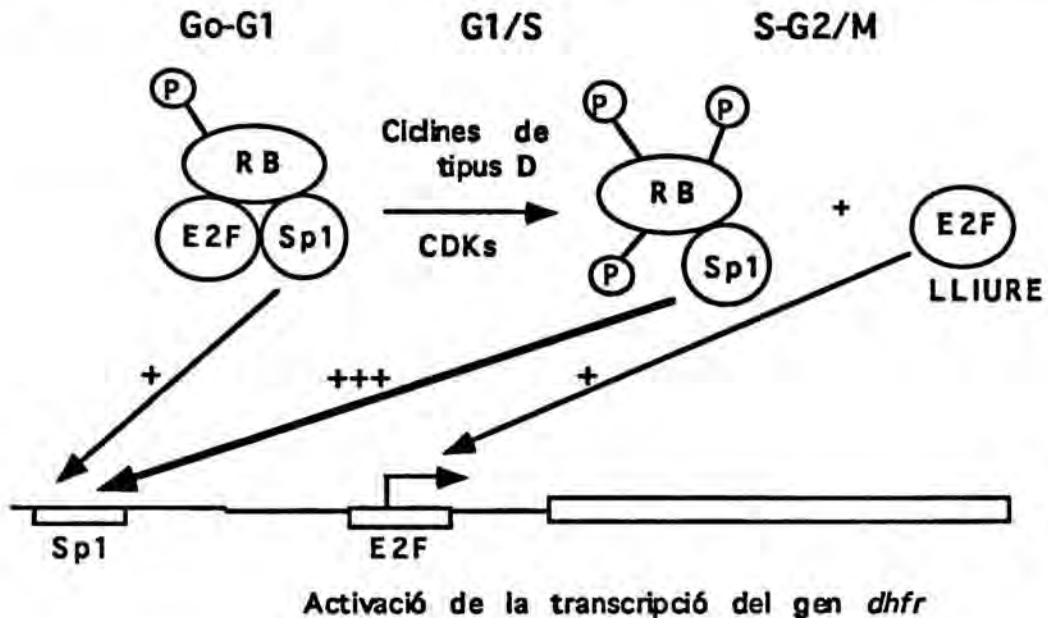
#### **4.9. MODEL PER A LA REGULACIO DEL PROMOTOR DEL GEN *dhfr* EN LA PROLIFERACIO CEL.LULAR**

Fins a l'actualitat, el paper de RB en la regulació del gen *dhfr* s'ha limitat al segrestament del factor de transcripció E2F en cèl.lules sincronitzades, de manera que l'activació del promotor del gen queda bloquejada. L'estimulació de la proliferació cel.lular, i el fet que RB (Buchkovich *et al.*, 1989; DeCaprio *et al.*, 1989) i E2F (Fagan *et al.*, 1994) es fosforilen, comporta l'alliberació d'E2F que pot aleshores incrementar la transcripció dels gens que contenen seqüències de reconeixement per aquest factor, com és el cas del gen *dhfr*. Encara que no ha estat analitzat en aquest treball, RB es troba presumiblement en la seva forma hiperfosforilada a la fase S del cicle cel.lular. D'acord amb els nostres resultats, el promotor del gen *dhfr* podria ésser activat transcripcionalment, no només pel factor E2F lliure, sino també pels nivells de Sp1 units a RB, que pot incrementar la transcripció mitjançada per Sp1.

Per tant, la proteïna RB exerciria dos papers en la regulació gènica, un a través del seu estat de fosforilació al llarg del cicle i un segon a través dels seus nivells de proteïna, que facilita l'acció de factors de transcripció. D'acord amb els resultats presentats en aquest treball, podem concloure que el promotor del gen *dhfr* de hamster es troba regulat després de l'estimulació per sèrum fetal, a través d'increments tant en la unió del factor de transcripció Sp1 com d'E2F.

En un nivell de regulació superior es trobaria la proteïna RB, que paral.lelament a l'alliberació de E2F a conseqüència de la seva hiperfosforilació, facilitaria la transcripció mitjançada pel factor Sp1.

A l'esquema següent, es mostra el model que proposem per a la regulació del promotor del gen *dhfr* a través dels factors de transcripció Sp1 i E2F, i de la proteïna RB.



ESQUEMA 5. REGULACIO DE LA TRANSCRIPCIO DEL GEN *dhfr*

#### 4.10. RELACIO ENTRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIO Sp1 I EL MECANISME DE RESISTENCIA AL MTX

Donada la importància del factor de transcripció Sp1 en la regulació del promotor del gen *dhfr*, i que un increment de la transcripció de determinats gens pot ésser el punt de partida de la resistència cel·lular per amplificació gènica, vam estudiar si existia alguna relació entre la unió del factor Sp1 al promotor del gen *dhfr* i el desenvolupament de la resistència al MTX.

Hem observat que la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr* s'incrementa en condicions que afavoreixen l'aparició de la resistència, com és el cas del tractament amb TPA. Aquest ester de forbol provoca l'increment del número de colònies resistents al MTX per activació de la PKC. L'increment observat en la unió del factor Sp1 a conseqüència de l'incubació cel·lular amb TPA pot ésser contrarrestat per acció de l'inhibidor de la PKC calfofina C, resultat que concorda també amb l'efecte de la calfofina C sobre el número de colònies resistents incrementat després del tractament amb TPA. Aquest inhibidor de la

PKC també és capaç de reduir la unió de Sp1 al promotor del gen en condicions basals, sense estimulació per TPA. D'igual manera hem observat la capacitat de la calfofostina C per reduir la resistència al MTX en condicions basals. Per tant, hem arribat a establir un lligam entre l'activitat de la PKC, el desenvolupament de la resistència al MTX i la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr*.

Donat que Sp1 pot ésser regulat per mecanismes de fosforilació, existeix la possibilitat que la PKC sigui capaç de fosforilar aquest factor de transcripció. En aquestes condicions, Sp1 podria activar la transcripció del gen *dhfr* i desencadenar així el procés d'amplificació gènica, segons un dels mecanismes postulats.

El paper de Sp1 en el mecanisme de l'amplificació gènica podria estar regulat pels productes dels gens supressors de tumors, p53 i RB. En aquest sentit, s'ha descrit que alguns tipus d'inestabilitat genètica com l'amplificació gènica i l'aneuploidia es troben relacionats amb la pèrdua de funcionalitat de p53 (Livingstone *et al.*, 1992; Yin *et al.*, 1992). També s'ha observat que p53 és capaç de provocar l'acumulació de la forma hipofosforilada de RB mitjançant l'inhibició a través de p21 de les CDKs que catalitzen el procés de fosforilació de RB (El-Deiry *et al.*, 1994). p53 és capaç de formar heterocomplexes amb el factor de transcripció Sp1 que estimulen la unió d'aquest darrer al DNA (Borellini & Glazer, 1993), i pels nostres resultats sabem que RB es complexa amb el factor de transcripció Sp1 a totes les fases de la proliferació. És possible, per tant, proposar una via responsable del control de la progressió del cicle cel·lular i de l'estabilitat genètica que involucra tant als dos productes dels gens supressors de tumors, p53 i RB, com al factor de transcripció Sp1. La pèrdua o alteració de la funcionalitat tant de p53 com de RB podrien modular l'activitat transcripcional de Sp1 de manera que el resultat final consistiria en l'amplificació de determinats gens controlats per Sp1.



## **5. CONCLUSIONS**

- Hem demostrat que en cèl·lules CHO la resistència al quimioteràpic metotrexat s'incrementa per un mecanisme bioquímic dependent de calci, i de l'activació de la proteïna quinasa C, ja que els ionòfors A23187 i ionomicina, l'angiotensina II, i l'ester de forbol TPA augmenten el número de colònies resistents al tractament.

- Els inhibidors de la proteïna quinasa C, H-7, àcid glicirretínic, estaurosporina i calfostina C són capaços de reduir la resistència al metotrexat incrementada per acció del TPA.

Tanmateix, l'ús de l'estaurosporina en incubacions cel·lulars queda restringit a concentracions molt baixes ja que a concentracions elevades produeix la mort cel·lular per apoptosi. A més, l'estaurosporina és capaç de translocar la PKC a les membranes.

Dels inhibidors estudiats, hem considerat la calfostina C com el més idoni ja que no és tòxic a les concentracions que redueixen la resistència, és molt específic per la PKC, i no produeix la translocació de l'enzim.

-Altres compostos que tenen la capacitat d'activar la PKC en les cèl·lules CHO, com l'àcid araquidònic i un del seus metabòlits lipoxigenats, el 12-HETE, són capaços d'incrementar la resistència al MTX en incubacions cel·lulars. El paracetamol, que inhibeix la glutathion S-transferasa, és capaç per ell mateix d'incrementar la resistència al MTX, i en combinació amb l'àcid araquidònic s'observa un efecte additiu en la resistència. El sulfur de dialil i el proadifen, que actuen per inhibició del citocrom P450, tenen la capacitat de contrarrestar l'increment en el número de colònies resistents al MTX generat pel tractament amb àcid araquidònic. La calfostina C també és capaç de reduir el número de colònies resistents incrementat per acció de l'àcid araquidònic.

- La calfostina C també té la capacitat de reduir la resistència basal al metotrexat, sense necessitat de tractament previ amb TPA. Aquesta propietat de la calfostina C podria tenir aplicació en clínica, mitjançant la utilització d'aquest inhibidor com a modulador de la resistència, o quimiosensibilitzador, conjuntament amb la teràpia amb MTX. Com a primera aproximació hem determinat que el tractament amb calfostina C no afecta la viabilitat, ni la funcionalitat de limfòcits humans avaluada per l'expressió dels antígens CD69 i CD25.

- L'increment de la resistència al metotrexat originat pel TPA és degut en el 75% dels casos a l'amplificació gènica. Els inhibidors de la síntesi de DNA, HU i APH, provoquen la resistència al MTX a través del mateix mecanisme.

- Hem endegat un nou mètode per determinar l'amplificació gènica basat en la tecnologia de PCR en condicions quantitatives. Aquest mètode utilitza oligonucleòtids que hibriden a zones intròniques del gen; la seva sensibilitat permet discernir entre 1 i 2 còpies del gen considerat. El material de partida per a aquesta determinació són colònies aïllades a partir de la primera selecció amb metotrexat. D'aquesta manera s'evita el procés de sobreamplificació que es pot produir en l'expansió dels clons resistents fins a obtenir un número de cèl.lules suficient com per procedir a la determinació pel mètode de Southern. A més, tot el procés, des de la recollida de la colònia resistent fins a l'obtenció dels resultats, es pot realitzar en un sol dia.

- Els factors de transcripció que interaccionen amb el promotor mínim del gen *dhfr* són Sp1 i E2F tal com hem determinat mitjançant tècniques de retardació i super-retardació de la mobilitat electroforètica. S'ha estudiat la importància relativa de la unió de cadascun d'aquests factors. Sp1 és el que s'uneix amb més intensitat, però la presència de la seqüència de reconeixement d'E2F afavoreix la unió de Sp1 a la caixa GC. La identitat de la unió de Sp1 s'ha determinat

per experiments de competició, mutacions puntuals, incubació amb la droga mitramicina, i amb un anticòs específic.

- La unió de Sp1 i E2F al promotor mínim del gen *dhfr* està regulada en el procés de proliferació cel.lular. Per addició de sèrum fetal a cèl.lules quiescents, obtingudes per creixement en medi al 0.5% de sèrum fetal durant 7 dies, s'observa un increment en la unió d'aquests dos factors que és cicle cel.lular-depenent. Per tant demostrem que Sp1 no té un paper constitutiu.

- L'increment en la unió de Sp1 al promotor es correspon amb una activació transcripcional del gen *dhfr* en el procés de proliferació. Aquest increment de l'activitat transcripcional del gen es tradueix en un increment dels nivells de mRNA per la DHFR. L'increment dels nivells de mRNA és degut no solament a l'activació transcripcional sino també a un increment en l'estabilitat d'aquest missatger madur, la vida mitja del qual passa de 45 minuts en cèl.lules quiescents a 8 hores en cèl.lules en creixement exponencial.

- Hem desenvolupat un mètode alternatiu al del "run-on" per a la determinació de l'activitat transcripcional. Aquest mètode està basat en la tècnica de la PCR quantitativa, tot utilitzant oligonucleòtids que hibriden a zones intròniques, i com a material de partida s'utilitza el producte de la reacció de transcriptasa inversa del RNA total, després de digestió amb DNAsa. D'aquesta manera es detecten transcrits de hnRNA, que tenen una vida mitja que oscil.la entre 5 i 10 minuts, i que poden considerar-se indicatius de l'activitat transcripcional.

- La proteïna RB, que juga un paper central en la progressió del cicle cel.lular, forma part d'un complex transcripcional amb Sp1 quan aquest s'uneix al promotor del gen *dhfr*. El complex constituït per RB i Sp1 es troba present a totes les fases del cicle cel.lular, tal com hem

determinat en assaigs de super-retardació de la mobilitat electroforètica.

- Els nivells de proteïna Sp1 s'incrementen després de l'estimulació per addició de sèrum fetal a cèl.lules quiescents. L'increment en els nivells de proteïna també s'han pogut avaluar en assaigs d'immunofluorescència *in situ* (tècnica FISH). Els nivells de proteïna RB també s'incrementen en el procés de proliferació.

- La immunoprecipitació de la proteïna RB aboleix el patró de bandes retardades corresponents a la unió de Sp1. El mateix efecte sobre la unió de Sp1 s'observa quan els extractes nuclears, a mena de control, es sotmeten previament a la immunoprecipitació de la proteïna Sp1.

- La unió del factor de transcripció Sp1 al promotor mínim del gen *dhfr* s'incrementa en condicions que afavoreixen el desenvolupament de la resistència al MTX, com és el tractament amb TPA. L'increment en la unió de Sp1 generat per acció del TPA es pot contrarrestar per acció de la calfofostina C. Aquest inhibidor de la PKC també és capaç de reduir la unió de Sp1 al promotor del gen *dhfr* en condicions basals, sense tractament amb TPA. Amb aquests resultats hem establert una correlació entre la resistència al MTX i la unió del factor de transcripció Sp1 al promotor del gen *dhfr*.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

- Allegra, C.J. 1990. Antifolates, p. 110-153. In: Chabner, B.A. & Collins, J.M., Ed. Cancer chemotherapy: principles and practice. J.B. Lippincott, Philadelphia.
- Alt, F.W., Kellems, R.E., Bertino, J.R. & Schimke, R.T. 1978. Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J. Biol. Chem.* **253**: 1357-1370.
- Andrulis, I.L. & Siminovitch, L. 1982. Amplification of the gene for asparagine synthetase, p. 75-80. In: Schimke, R.T., Ed. Gene Amplification. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Aquino, A., Hartman, K., Knode, M., Grant, S., Huang, K., Niu, C. & Glazer, R. 1988. Role of protein kinase C in phosphorylation of vinculin in Adriamycin-resistant HL-60 leukemic cells. *Cancer Res.* **48**: 3324-3329.
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. & Nevins, J.R. 1990. Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A *trans* -activation. *Cell* **62**: 659-669.
- Bandara, L.R. & La Thangue, N.B. 1991. Adenovirus E1A prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* **351**: 494-497.
- Barker, P.E., Drwinga, H.L., Hittelman, W.N. & Maddox, A.M. 1980. Double minutes replicate once during S phase of the cell cycle. *Exp. Cell Res.* **130**: 353-360.
- Baker, R.M. & Ling, V. 1978. Membrane mutants of mammalian cells in culture. p. 337-384. In: Korn, E., Ed. Methods in membrane biology, **9**. Plenum Publishing Corp., New York.

- Barsoum, J. & Varshavsky, A. 1983. Mitogenic hormones and tumor promoters greatly increase the incidence of colony-forming cells bearing amplified dihydrofolate reductase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 5330-5334.
- Bates, S., Bonetta, L., MacAllan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C. & Peters, G. 1994. CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* **9**: 71-79.
- Beach, L.R. & Palmiter, R.D. 1981. Amplification of the metallothionein-1 gene in cadmium-resistant mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 2110-2114.
- Bell, D.R., Gerlach, J.H., Kartner, N., Buick, R.N. & Ling, V. 1985. Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* **3**: 311-315.
- Biedler, J.L. & Spengler, B.A. 1976. Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products. *Science* **191**: 185-187.
- Biedler, J.L. & Peterson, R.H.F. 1981. Altered plasma membrane glycoconjugates of Chinese hamster cells with acquired resistance to actinomycin D, daunorubicin, and vincristine, p. 453-476. In: Sartorelli, A.C., Lazo, J.S. & Bertino, J.R., Ed. *Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents*. Academic Press, New York.
- Biemann, H.P.N. & Erikson, R.L. 1990. Abnormal protein kinase C down regulation and reduced substrate levels in non-phorbol ester-responsive 3T3-TNR9 cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2122-2132.
- Blake, M.C. & Azizkhan, J.C. 1989. Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4994-5002.
- Blake, M.C., Jambou, R.C., Swick, A.G., Kahn, J.W. & Azizkhan, J.C. 1990. Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATA-less promoter. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6632-6641.



- Blobe, G.C., Sachs, C.W., Khan, W.A., Fabbro, D., Stabel, S., Wetsel, W.C., Obeid, L.M., Fine, R.L. & Hannun, Y.U. 1993. Selective regulation of expression of protein kinase C (PKC) isoenzymes in multidrug-resistant MCF-7 cells. Functional significance of enhanced expression of PKC  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **268**: 658-664.
  
- Blume, S.W., Snyder, R.C., Ray, R., Thomas, S., Koller, C.A. & Miller, D.M. 1991. Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **88**: 1614-1621.
  
- Bojan, F., Kinsella, A.R. & Fox, M. 1983. Effect of tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on recovery of methotrexate-, N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-, and cadmium-resistance colony-forming mouse and hamster cells. *Cancer Res.* **43**: 5217-5221.
  
- Bourhis, J., Goldstein, L.J., Riou, G., Pastan, I., Gottesman, M.M & Benard, J. 1989. Expression of a human multidrug resistance gene in ovarian carcinomas. *Cancer Res.* **49**: 5062-5065.
  
- Bradley, G., Naik, M. & Ling, V. 1989. P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **49**: 2790-2796.
  
- Brady, J.F., Li, D.C., Ishizaki, H. & Yang, C.S. 1988. Effect of diallyl sulfide on rat liver microsomal nitrosamine metabolism and other monooxygenase activities. *Cancer Res.* **48**: 5937-5940.
  
- Brennard, J., Chinault, A.C., Konecki, D.S., Melton, D.W. & Caskey, C.T. 1982. Cloned cDNA sequences of the hypoxanthine/guanine phosphoribosyl-transferase gene from a mouse neuroblastoma cell line found to have amplified genomic sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 1950-1954.
  
- Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P. & Tjian, R. 1986. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**: 47-52.

- Brown, P.C., Tlsty, T.D. & Schimke, R.T. 1983. Enhancement of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by treatment of mouse 3T6 cells with hydroxyurea. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1097-1107.
- Borellini, F. & Glazer, R.I. 1993. Induction of Sp1-p53 DNA-binding heterocomplexes during granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1. *J. Biol. Chem.* **268**: 7923-7928.
- Buchkovich, K.J., Duffy, L.A. & Harlow, E. 1989. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**: 1097-1105.
- Carothers, A.M., Urlaub, G., Ellis, N. & Chasin, L.A. 1983. Structure of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1997-2012.
- Center, M.S. 1985. Mechanisms regulating cell resistance to Adriamycin: evidence that drug accumulation in resistant cells is modulated by phosphorylation of a plasma membrane glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 1471-1476.
- Chambers, T.C., McAvoy, E.M., Jacobs, J.W. & Eilon, G. 1990. Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 7679-7687.
- Chasseaud, L.F. 1979. The role of glutathione and glutathione-S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.* **29**: 175-274.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. & Nevins, J.R. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**: 1053-1061.
- Chen, L.I., Nishinaka, T., Kwan, K., Kitabayashi, I., Yokoyama, K., Fu, Y.F., Grünwald, S. & Chiu, R. 1994. The retinoblastoma gene product RB stimulates Sp1-mediated transcription by liberating Sp1 from a negative regulator. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4380-4389.

- Chen P.L., Scully, P., Shew, J.-Y., Wang, J. & Lee, W.-H. 1989. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58: 1193-1198.
- Chin, D.J., Luskey, K.L., Anderson, R.G.W., Faust, J.R., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. 1982. Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 1185-1189.
- Chittenden, T., Livingston, D.M. & Kaelin, W.G.Jr. 1991. The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* 65: 1073-1082.
- Ciudad, C.J., Urlaub, G. & Chasin, L.A. 1988. Deletion analysis of the Chinese hamster dihydrofolate reductase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 263: 16274-16282.
- Ciudad, C.J., Morris, A.E., Jeng, C. & Chasin, L.A. 1992. Point mutational analysis of the hamster dihydrofolate reductase minimum promoter. *J. Biol. Chem.* 267: 3650-3656.
- Courey, A.J. & Tjian, R. 1988. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55: 887-898.
- Curt, G.A., Camey, D.N., Cowan, K.H., Jolivet, J., Bailey, B.D., Drake, J.C., Kao-Shan, C.S., Minna, J.D. & Chabner, B.A. Unstable methotrexate resistance in human small-cell carcinoma associated with double minute chromosomes. 1983. *N. Engl. J. Med.* 308: 199-202.
- Dalton, S. 1992. Cell cycle regulation of the human cdc2 gene . *EMBO J.* 11: 1797-1804.
- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J., Huang, C.-M-, Lee, W.-H., Marsilio, E., Paucha, E. & Livingston, D.M. 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54: 275-283.

- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Piwnica-Worms, H., Huang, C.-M. & Livingston, D.M. 1989. The product of the retinoblastoma gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* **58**: 1085-1095.
  
- Defeo-Jones, D., Huang, P.S., Jones, R.E., Haskell, K.M., Vuocolo, G.A., Hanobik, M.G., Huber, H.E. & Oliff, A. 1991. Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **352**: 251-254.
  
- Devoto, S.H., Mudryj, M., Pines, J., Hunter, T. & Nevins, J.R. 1992. A cyclin A-protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity: p33<sup>cdk2</sup> is a component of the E2F-cyclin A complex. *Cell* **68**: 167-176.
  
- Díaz-Guerra, M.J., Junco, M. & Boscà, I. 1991. Oleic acid promotes changes in the subcellular distribution of protein kinase C in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **266**: 23568-23576.
  
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. & Roeder, R. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1475-1489.
  
- Dolnick, B.J., Berenson, R.J., Bertino, J.R., Kaufman, R.J., Nunberg, J.H. & Schimke, R.T. 1979. Correlation of dihydrofolate reductase elevation with gene amplification in a homogeneously staining chromosomal region in L5178Y cells. *J. Cell. Biol.* **83**: 394-402.
  
- Dou, Q.-P., Fridovich-Keil, J.L. & Pardee, A.B. 1991. Inducible proteins binding to the murine thymidine kinase promoter in late G<sub>1</sub>/S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 1157-1161.
  
- Dou, Q.-P., Zhao, S., Levins, A.H., Wang, J., Helin, K. & Pardee, A.B. 1994. G<sub>1</sub>/S-regulated E2F-containing protein complexes bind to the mouse thymidine kinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **269**: 1306-1313.
  
- Dowdy, S.F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S.I., Arnold, A. & Weinberg, R.A. 1993. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* **73**: 499-511.

- Draetta, G., Piwnica-Worms, H., Morrison, D., Druker, B., Roberts, T. & Beach, D. 1988. Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate. *Nature* **336**: 738-744.
- Dynan, W.S. & Tjian, R. 1985. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* **316**: 774-778.
- Dynan, W.S. & Tjian, R. 1983. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* **32**: 669-680.
- Dynan, W.S. & Tjian, R. 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35**: 79-87.
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. & Harlow, E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**: 934-937.
- Dyson, N., Buchkovich, K., Whyte, P. & Harlow, E. 1989. The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell* **58**: 249-255.
- Dulic, V., Lees, E. & Reed, S.I. 1992. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* **257**: 1958-1961.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.-H. & Elledge, S.J. 1993. The retinoblastoma protein associates with the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**: 555-569.
- Eamshaw, W.C. & Pluta, A.F. 1994. Mitosis. *Bioessays* **16**: 639-643.
- Eastman, H.B., Swick, A.G., Schmitt, M.C. & Azizkhan, J.C. 1991. Stimulation of dihydrofolate reductase promoter activity by antimetabolic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 8572-8576.

- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825.
- El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**: 1169-1174.
- Endicott, J.A. & Ling, V. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 137-171.
- Ewen, M.E., Ludlow, J.W., Marsilio, E., DeCaprio, J.A., Millikan, R.C., Cheng, S.H., Paucha, E. & Livingston, D.M. 1989. An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110<sup>Rb</sup> and a second cellular protein, p120. *Cell* **58**: 257-267.
- Ewen, M.E., Faha, B., Harlow, E. & Livingston, D.M. 1992. Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science* **255**: 85-87.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J.-Y. & Livingston, D.M. 1993. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* **73**: 487-497.
- Fagan, R., Flint, K.J. & Jones, N. 1994. Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein. *Cell* **78**: 799-811.
- Falcieri, E., Martelli, A.M., Bareggi, R., Cataldi, A. & Cocco, L. 1993. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 19-25.

- Fang, F. & Newport, J.W. 1991. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* **66**: 731-742.
- Farnham, P.J. & Schimke, R.T. 1985. Transcriptional regulation of mouse dihydrofolate reductase in the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **260**: 7675-7680.
- Farnham, P.J. & Schimke, R.T. 1986. Murine dihydrofolate reductase transcripts through the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 365-371.
- Featherstone, C. & Russell, P. 1991. Fission yeast p107<sup>w<sup>ee</sup>1</sup> mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* **349**: 808-811.
- Feder, J.N., Assaraf, Y.G., Seamer, L.C. & Schimke, R.T. 1989. The pattern of dihydrofolate reductase expression through the cell cycle in rodent and human cultured cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 20583-20590.
- Federspiel, N.A., Beverley, S.M., Schilling, J.W & Schimke, R.T. 1984. Novel DNA rearrangements are associated with dihydrofolate reductase gene amplification. *J. Biol. Chem.* **259**: 9127-9140.
- Ferguson, P. & Cheng, Y. 1987. Transient protection of cultured human cells against antitumor agents by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* **47**: 433-441.
- Fesquet, D., Labbe, J.C., Derancourt, J., Capony, J.P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M. & Cavadore, J.C. 1993. The *MO15* gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J.* **12**: 3111-3121.
- Fine, R., Patel, J. & Chabner, B.A. 1988. Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 582-586.
- Fisher, R.P. & Morgan, D.O. 1994. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**: 713-724.



- Flemington, E.K., Speck, S.H. & Kaelin, W.G. 1993. E2F-1 mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 6914-6918.
- Flintoff, W.F, Davidson, S.V. & Siminovitch, L. 1976. Isolation and partial characterization of three methotrexate-resistant phenotypes from Chinese hamster ovary cells. *Somat. Cell. Genet.* **2**: 245-261.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Alberts, D.M. & Dryja, T.P. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**: 643-646.
- Fung, Y.-K.T., Murphree, A.L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S.H. & Benedict, W.F. 1987. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* **236**: 1657-1661.
- Gautier, J., Solomon, M.J., Booher, R.N., Bazan, J.F. & Kirschner, M.W. 1991. *cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34<sup>cdc2</sup>. *Cell* **67**: 197-211.
- Giulotto, E., Saito, I. & Stark, G.R. 1986. Structure of DNA formed in the first step of CAD gene amplification. *EMBO J.* **5**: 2115-2121.
- Glotzer, M., Murray, A.W. & Kirschner, M.W. 1991 Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-138.
- Goodrich, D.W., Wang, N.P., Qian, Y.-W., Lee, E.Y.-H.P. & Lee, W.-H. 1991. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **67**: 293-302.
- Green, M.R. 1989. When the products of oncogenes and anti-oncogenes meet. *Cell* **56**: 1-3.
- Gu, W., Schneider, J.W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B. 1993. Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* **72**: 309-324.



- Gunderson, S.I., Murphy, J.T., Knuth, M.W., Steinberg, T.H., Dahlberg, J.H. & Burgess, R.R. 1988. Binding of transcription factors to the promoter of the human U1 RNA gene studied by footprinting. *J. Biol. Chem.* **263**: 17603-17610.
- Hagemeir, C., Cook, A. & Kouzarides, T. 1993. The retinoblastoma protein binds E2F residues required for activation in vivo and TBP binding in vitro. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4998-5004.
- Hamada, H., Hagiwara, K., Nakajima, T. & Tsuruo, T. 1987. Phosphorylation of the  $M_r$  170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug resistant tumor cells: effects of verapamil, trifluoroperazine, and phorbol esters. *Cancer Res.* **47**: 2860-2865.
- Hannon, G.J. & Beach, D. 1994. p15<sup>INK4b</sup> is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* **371**: 257-261.
- Harlow, E., Whyte, P., Franza, R.Jr. & Schley, C. 1986. Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1579-1589.
- Heichman, K.A. & Roberts, J.M. 1994. Rules to replicate by. *Cell* **79**: 557-5562.
- Helin, K., Harlow, E. & Fattaey, A. 1993. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6501-6508.
- Helin, K. & Harlow, E. 1993. The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor. *Trends Cell Biol.* **3**: 43-45.
- Helin, K., Lees, J.A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E. & Fattaey, A. 1992. A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* **70**: 337-350.
- Hendrickson, S.L., Wu, J.S. & Johnson, L.F. 1980. Cell cycle regulation of dihydrofolate reductase mRNA metabolism in mouse fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 5140-5144.

- Herschman, H.R. 1985. A 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-nonproliferative variant of 3T3 cells is resistant to TPA-enhanced gene amplification. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1130-1135.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. & Sasaki, Y. 1984. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* **23**: 5036-5041.
- Hiebert, S.W., Blake, M., Azizkhan, J.C. & Nevins, J.R. 1991. Role of E2F transcription factor in E1A-mediated trans activation of cellular genes. *J. Virol.* **65**: 3547-3552.
- Hiebert, S.W., Chellapan, S.P., Horowitz, J.M. & Nevins, J.R. 1992. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* **6**: 177-185.
- Hii, C.S.T., Ferrante, A., Edwards, Y.S., Huang, Z.H., Hartfield, P.J., Rathjen, D.A., Poulos, A. & Murray, A.W. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase by arachidonic acid in rat liver epithelial WB cells by a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **270**: 4201-4204.
- Hill, A.B. & Schimke, R.T. 1985. Increased gene amplification in LK5178Y mouse lymphoma cells with hydroxyurea-induced chromosomal aberrations. *Cancer Res.* **45**: 5050-5057.
- Hinds, P.W. & Weinberg, R.A. 1994. Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 135-141.
- Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I. & Weinberg, R.A. 1992. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70**: 993-1006.
- Hoang, A.T., Cohen, K.J., Barrett, J.F., Bergstrom, D.A. & Dang, C.V. 1994. Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 6875-6879.

- Horns, R.C., Dower, W.J. & Schimke, R.T. 1984. Gene amplification in a leukemic patient treated with methotrexate. *J. Clin. Oncol.* **2**: 2-7.
- Hoy, C.A., Rice, G.C., Kovacs, M. & Schimke, R.T. 1987. Overreplication of DNA in S-phase CHO cells after DNA synthesis inhibition. *J. Biol. Chem.* **262**: 11927-11943.
- Hu, Q., Bautista, C., Edwards, G.M., Defeo-Jones, D., Jones, R.E. & Harlow, E. 1991. Antibodies specific for the human retinoblastoma protein identify a family of related polypeptides. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5792-5799.
- Hu, Q., Lees, J.A., Buchkovich, K.J. & Harlow, E. 1992. The retinoblastoma protein physically associates with the human cdc2 kinase. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 971-980.
- Huang, H.-J.S., Yee, J.-K., Shew, J.-Y., Chen, P.-L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E.Y.-H.P. & Lee, W.-H. 1988. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* **242**: 1563-1566.
- Huang, S., Lee, W.-H & Lee, E.Y.-H.P. 1991. Identification of a cellular protein that competes with SV40 T antigen for binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* **350**: 160-162.
- Huber, H.E., Goodhart, P.J. & Huang, P.S. 1994. Retinoblastoma protein reverses DNA bending by transcription factor E2F. *J. Biol. Chem.* **269**: 6999-7005.
- Ido, M., Sato, K., Sakurai, M., Inagaki, M., Saitoh, M., Watanabe, M. & Hidaka, H. 1987. Decreased phorbol ester receptor and protein kinase C in P388 murine leukemic cells resistant to etoposide. *Cancer Res.* **47**: 3460-3463.
- Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S. & Tjian, R. 1990. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* **63**: 155-165.

- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D. & Nevins, J.R. 1993. Expression of transcription E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**: 349-352.
- Johnson, G. & Noguera, G. 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Methods* **43**: 349-350.
- Johnson, L.F., Fuhrman, C.L. & Wiedemann, L.M. 1978. Regulation of dihydrofolate reductase gene expression in mouse fibroblasts during the transition from the resting to growing state. *J. Cell. Physiol.* **97**: 397-406.
- Johnson, L.F. 1984. Expression of dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase genes in mammalian cells, p. 25-47. In: Stein, G.S. & Stein, J.L. Ed., *Recombinant DNA and cell proliferation*. Academic Press, Inc., New York.
- Johnston, R.N., Feder, J., Hill, A.B., Sherwood, S.W. & Schimke, R.T. 1986. Transient inhibition of DNA synthesis results in increases dihydrofolate reductase synthesis and subsequent increased DNA content per cell. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3373-3381.
- Jones, K.A., Yamamoto, K.R. & Tjian, R. 1985. Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter *in vitro*. *Cell* **42**: 559-572.
- Kadonaga, J.T., Jones, K.A. & Tjian, R. 1986. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 20-23.
- Kadonaga, J.T., Jones, K.A. & Tjian, R. 1986. Promoter-specific interaction of RNA polymerase II transcription by Sp1. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 20-23.
- Kadonaga, J.T., Camer, K.R., Masiarz, F.R & Tjian, R. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**: 1079-1090.

- Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J & Tjian, R. 1988. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242**: 1566-1569.
  
- Kaelin, W.G.Jr., Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Kaye, F.J. & Livingston, D.M. 1991. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* **64**: 521-532.
  
- Kaelin, W.G.Jr., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Achenbaum, F., Fuchs, C.S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P.J., Blanar, M.A., Livingston, D.M. & Flemington, E.K. 1992. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**: 351-364.
  
- Kanalas, J.J. & Suttle, D.P. 1984. Amplification of the UMP synthase gene and enzyme overproduction in pyrazofurin-resistant rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 1848-1853.
  
- Kaufman, R.J. & Schimke, R.T. 1981. Amplification and loss of dihydrofolate reductase genes in a Chinese hamster ovary cell line. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 1069-1076.
  
- Kessler, O., Jiang, Y. & Chasin, L.A. 1993. Order of intron removal during splicing of endogenous adenine phosphoribosyltransferase and dihydrofolate reductase pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6211-6222.
  
- Kessel, D. 1987. Effects of phorbol esters and doxorubicin transport systems. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 2297-2299.
  
- Kim, S.-J., Lee, H.-D., Robbins, P.D., Busam, K., Sporn, M.B. & Roberts, A.B. 1991. Regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1 gene expression by the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 3052-3056.
  
- Kim, S.-J., Onwuta, U.S., Lee, Y.I., Li, R., Botchan, M.R. & Robbins, P.D. 1992. The retinoblastoma gene product regulates Sp1-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2455-2463.

- Kim, S.-J., Wagner, S., Liu, F., O'Reilly, M.A., Robbins, P.D. & Green, M.R. 1992. Retinoblastoma gene product activates expression of the human TGF- $\beta$ 2 gene through transcription factor ATF-2. *Nature* **358**: 331-334.
- Kleinberger, T., Etkin, S. & Lavi, S. 1986. Carcinogen-mediated methotrexate resistance and dihydrofolate reductase amplification in Chinese hamster cells. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1958-1964.
- Kleinberger, T., Flint, Y.B., Blank, M., Etkin, S. & Lavi, S. 1988. Carcinogen-induced trans-activation of gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 1366-1370.
- Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. & Tamaoki, T. 1989. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 548-555.
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R. & Roberts, J.M. 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* **257**: 1689-1694.
- Kovetski, I., Reichel, R. & Nevins, J.R. 1986. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* **45**: 219-228.
- Krishan, A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell. Biol.* **71**: 188-193.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, E.Y.-H.P., to, H., Shew, J.-Y., Bookstein, R., Scully, P. & Lee, W.-H. 1988. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* **241**: 218-221.
- Lee, S.A., Karaszkiwicz, J.M. & Anderson, W.B. 1992. Elevated level of nuclear protein kinase C in multidrug-resistant MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **52**: 3750-3759.

- Lee W.-H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.-J., Shew, J.-Y. & Lee, E.Y.-H.P. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. *Science* **235**: 1394-1399.
  
- Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S.I. & Harlow, E. 1992. Cyclin E/cdk2 and Cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev.* **6**: 1874-1885.
  
- Lees, J.A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N. & Helin, K. 1993. The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7813-7825.
  
- Levan, A., Levan, G & Mitelman, F. 1977. Chromosomes and cancer. *Hereditas* **86**: 15-29.
  
- Lewis, W.H. & Srinivasan, P.R. 1983. Chromosome-mediated gene transfer of hydroxyurea resistance and amplification of ribonucleotide reductase activity. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1053-1061.
  
- Leys, E.J. & Kellems, R.E. 1981. Control of dihydrofolate reductase messenger ribonucleic acid production. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 961-971.
  
- Leys, E.J., Crouse, G.F. & Kellems, R.E. 1984. Dihydrofolate reductase gene expression in cultured mouse cells is regulated by transcript stabilization in the nucleus. *J. Cell. Biol.* **99**: 180-187.
  
- Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. & Stillman, B. 1995. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA dependent DNA replication and DNA repair. *Nature*, in press.
  
- Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A. & Xiong, Y. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**: 2261-2268.
  
- Li, Y., Nichols, M.A., Shay, J.W. & Xiong, Y. 1995. Transcription repression of the D-type cyclin-dependent kinases inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product, pRb. *Cancer Res.*, in press.

- Li, Y., Slansky, J.E., Myers, D.J., Drinkwater, N.R., Kaelin, W.J. & Farnham, P.J. 1994. Cloning, chromosomal location, and characterization of mouse E2F1. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1861-1869.
- Ling, V., Kartner, N., Sudo, T., Siminovitch, L. & Riordan, J.R. 1983. Multidrug-resistance phenotype in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Treat. Rep.* **67**: 869-874.
- Liu, B., Timar, J., Howlett, J., Diglio, C.A. & Honn, K.V. 1991. Lipoxygenase metabolites of arachidonic and linoleic acids modulate the adhesion of tumor cells to endothelium via regulation of protein kinase C. *Cell Reg.* **2**: 1045-1055.
- Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T. & Tlsty, T.D. 1992. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* **70**: 923-935.
- Looney, J.E. & Hamlin, J.L. 1987. Isolation of the amplified dihydrofolate reductase domain from methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 569-577.
- Lucke-Huhle, C. & Herrlich, P. 1987. Alpha-radiation-induced amplification of integrated SV40 sequences is mediated by a trans-acting mechanism. *Int. J. Cancer* **39**: 94-98.
- Ludlow, J.M., Glendening, C.L., Livingston, D.M. & DeCaprio, J.A. 1993. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 367-372.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. & Beach, D. 1991. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**: 1111-1122.
- Ma, L., Marquardt, D., Takemoto, L. & Center, M.S. 1991. Analysis of P-glycoprotein phosphorylation in HL60 cells isolated for resistance to vincristine. *J. Biol. Chem.* **266**: 5593-5599.



- Mariani, B.D., Slate, D.L. & Schimke, R.T. 1981. S phase specific synthesis of dihydrofolate reductase in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 4985-4989.
- Mariani, B.D. & Schimke, R.T. 1984. Gene amplification in a single cell cycle in Chinese Hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 1901-1910.
- Matsushime, H., Roussel, M.F., Ashmun, R.A. & Sherr, C.J. 1991. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**: 701-713.
- Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.-Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. 1992. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34<sup>PSK-J3</sup>/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* **71**: 323-334.
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. & Kato, J.-Y. 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 2066-2076.
- McClean, S. & Hill, B.T. 1992. An overview of membrane, cytosolic and nuclear proteins associated with the expression of resistance to multiple drugs in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* **1114**: 107-127.
- McConlogue, L., Gupta, M., Wu, L. & Coffino, P. 1984. Molecular cloning and expression of the mouse ornithine decarboxylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 540-544.
- McGrogan, M., Simonsen, C.C., Smouse, D.T., Farnham, P.J. & Schimke, R.T. 1985. Heterogeneity at the 5' termini of mouse dihydrofolate reductase mRNAs. *J. Biol. Chem.* **260**: 2307-2314.
- Means, A.L. & Farnham, P.J. 1990. Transcription initiation from the dihydrofolate reductase promoter is positioned by HIP1 binding at the initiation site. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 653-661.
- Means, A.L., Slansky, J.E., McMahon, S.L., Knuth, M.W. & Farnham, P.J. 1992. The HIP1 binding site is required for growth regulation of the dihydrofolate reductase gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1054-1063.

- Meikrantz, W., Gisselbrecht, S., Tam, S.W. & Schlegel, R. 1994. Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3754-3758.
  
- Mellon, I., Spivak, G. & Hanawalt, P.C. 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* **51**: 241-249.
  
- Mitchell, P.J., Carothers, A.M., Han, J.H., Harding, J.D., Kas, E., Venolia, L. & Chasin, L.A. 1986. Multiple transcription start sites, DNase I-hypersensitive sites, and an opposite-strand exon in the 5' region of the CHO *dhfr* gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 425-440.
  
- Nevins, J.R. 1992. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**: 424-429.
  
- Ng, W.F., Sarangi, F., Zastawny, R.L., Veinot-Drebot, L. & Ling, V. 1989. Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1224-1232.
  
- Nunberg, J.H., Kaufman, R.J., Schimke, R.T., Urlaub, G. & Chasin, L.A. 1978. Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate resistant Chinese hamster ovary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 5553-5556.
  
- Nurse, P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**: 547-550.
  
- O'Brian, C.A., Fan, D., Ward, N.E., Seid, C. & Fidler, I.J. Level of protein kinase C activity correlates directly with resistance to Adriamycin in murine fibrosarcoma cells. *FEBS Lett.* **246**: 78-82.
  
- O'Brian, C.A., Ward, N.E. & Vogel, V.G. 1990. Inhibition of protein kinase C by the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate antagonist glycyrrhetic acid. *Cancer Lett.* **49**: 9-12.

- O'Connor, P.M., Ferris, D.K., Pagano, M., Draetta, G., Pines, J., Hunter, T., Longo, D.L. & Kohn, K.W. 1993. G2 delay induced by nitrogen mustard in human cells affects cyclin A/cdk2 and cyclin B1/cdc2-kinase complexes differently. *J. Biol. Chem.* **268**: 8298-8308.
- Özdemirler, G., Aykaç, G., Uysal, M. & Öz, H. 1994. Liver lipid peroxidation and glutathione-related defence enzyme systems in mice treated with paracetamol. *J. Appl. Toxicol.* **14**: 297-299.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**: 961-971.
- Pardee, A.B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**: 603-608.
- Parry, D., Bates, S., Mann, D.J. & Peters, G. 1995. Lack of cyclin D/Cdk complexes in RB-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumor suppressor gene product. *EMBO J.* **14**: 503-511.
- Pascal, E & Tjian, R. 1991. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.* **5**: 1646-1656.
- Peterson, R.H.F., Meyers, M.B., Spingler, B.A. & Biedler, J.H. 1983. Alteration of plasma membrane glycopeptides and gangliosides of Chinese hamster cells accompanying development of resistance to daunorubicin and vincristine. *Cancer Res.* **43**: 222-228.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 2934-2938.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. & Koff, A. 1994. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**: 9-22.

- Pugh, B.F. & Tjian, R. 1990. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* **61**: 1187-1197.
- Qian, Y., Luckey, C., Horton, L., Esser, M. & Templeton, D.J. 1992. Biological function of the retinoblastoma protein requires distinct domains for hyperphosphorylation and transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5363-5372.
- Qian, Y.-W., Wang, Y.-C.J., Hollingsworth, R.E., Jones, D., Ling, N. & Lee. E.Y.-H. 1993. A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature* **364**: 648-652.
- Qin, X.-Q., Chittenden, T., Livingston, D.M. & Kaelin, W.G. 1992. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev.* **6**: 953-964.
- Rice, G.C., Hoy, C. & Schimke, R.T. 1986. Transient hypoxia enhances the frequency of dihydrofolate reductase gene amplification in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 5978-5982.
- Robbins, P.D., Horowitz, J.M. & Mulligan, R.C. 1990. Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. *Nature* **346**: 668-671.
- Rossana, C., Roa, I.G. & Johnson, L.F. 1982. Thymidylate synthetase overproduction in 5-fluorodeoxyuridine-resistant mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1118-1125.
- Rustgi, A.K., Dyson, N. & Bernards, R. 1991. Amino-terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* **352**: 541-544.
- Rutledge, M.L., Robey-Cafferty, S.S., Silva, E.G. & Bruner, J.M. 1990. Monoclonal antibody C219 detection of multidrug-resistant protein P-glycoprotein in routinely processed tissues: a study of 36 cases of ovarian carcinoma. *Mod. Pathol.* **3**: 298-301.

- Santiago, C., Collins, M. & Johnson, L.F. 1983. In vitro and in vivo analysis of the control of the dihydrofolate reductase gene transcription in serum-stimulated mouse fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **118**: 79-86.
  
- Schimke, R.T., Brown, P.C., Kaufman, R.J., McGrogan, M. & Slate, D.L. 1981. Chromosomal and extrachromosomal localization of amplified dihydrofolate reductase genes in cultured mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **55**: 785-797.
  
- Schweitzer, B.I., Dicker, A.P. & Bertino, J.R. 1990. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.* **4**: 2441-2452.
  
- Serrano, M., Hannon, G.J. & Beach, D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**: 704-707.
  
- Shan, B., Zhu, X., Chen, P.-L., Durfee, T., Yang, Y., Sharp, D. & Lee, W.-H. 1992. Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5620-5631.
  
- Sharma, R.C. & Schimke, R. 1989. Enhancement of the frequency of methotrexate resistance by gamma-radiation in Chinese hamster ovary and mouse 3T6 cells. *Cancer Res.* **49**: 3861-3866.
  
- Shearman, M.S., Naor, Z., Sekiguchi, K., Kishimoto, A. & Nishizuka, Y. 1989. Selective activation of the  $\gamma$ -subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. *FEBS Lett.* **243**: 177-182.
  
- Sherr, C.J. 1993. Mammalian G1 Cyclins. *Cell* **73**: 1059-1065.
  
- Sherwood, S.W., Schumacher, R.I. & Schimke, R.T. 1988. Effect of cycloheximide on development of methotrexate resistance of Chinese hamster ovary cells treated with inhibitors of DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2822-2827.

- Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J.A., Morgan, J., Livingston, D.M. & Chittenden, T. 1992. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* **68**: 157-166.
  
- Slansky, J.E., Li, Y., Kaelin, W.G. & Farnham, P.J. 1993. A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1610-1618.
  
- Slebos, R.J., Lee, M.H., Plunkett, B.S., Kesis, T.D., Williams, B.O., Jacks, T., Hedrick, L., Kastan, M-B. & Cho, K.R. 1994. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 5320-5324.
  
- Snyder, R.C., Ray, R., Blume, S. & Miller, D.M. 1991. Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters. *Biochemistry* **30**: 4290-4297.
  
- Spornins, V.L., Venegas, P.L. & Wattenberg, L.W. 1982. Glutathione S-transferase activity: enhancement by compounds inhibiting chemical carcinogenesis and by dietary constituents. *J. Natl. Cancer Inst.* **68**: 493-496.
  
- Spornins, V.L., Barany, G. & Wattenberg, L.W. 1988. Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo[a]pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* **9**: 131-134.
  
- Stewart, S.E. & Roeder, G.S. 1989. Transcription by RNA polymerase I stimulate mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3464-3472.
  
- Swick, A.G., Blake, M.C., Kahn, J.W. & Azizkhan, J.C. 1989. Functional analysis of GC element binding and transcription in the hamster dihydrofolate reductase gene promoter. *Nucleic Acids Res.* **17**: 9291-9304.

- Tamaoki, T., Nomoto, T., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. & Tomita, F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**: 397-402.
- Tlsty, T.D., Brown, P.C. & Schimke, R.T. 1984. UV radiation facilitates methotrexate resistance and amplification of the dihydrofolate reductase gene in cultured 3T6 mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1050-1056.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. 1981. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **41**: 1967-1972.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. 1982. Increased accumulation of vincristine and Adriamycin in drug-resistant tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.* **42**: 4730-4733.
- Tsuruo, T., Iida, H., Nojiri, M., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. 1983. Circumvention of vincristine and Adriamycin resistance *in vitro* and *in vivo* by calcium influx blockers. *Cancer Res.* **43**: 2905-2910.
- Udvardi, A.J., Rogers, K.T., Higgins, P.D.R., Murata, Y., Martin, K.H., Humphrey, P.A. & Horowitz, J.M. 1993. Sp-1 binds promoter elements regulated by the RB protein and Sp-1-mediated transcription is stimulated by RB coexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 3265-3269.
- Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M. & Chasin, L.A. 1983. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell* **33**: 405-412.
- Urlaub, G., Mitchell, P.J., Kas, E., Funanage, V.L., Myoda, T.T. & Hamlin, J.L. 1986. Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions. *Somatic Cell Mol. Genet.* **12**: 555-566.



- Urlaub, G., Mitchell, P.J., Ciudad, C.J. & Chasin, L.A. 1989. Nonsense mutations in the dihydrofolate reductase gene affect RNA processing. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2868-2880.
  
- Van der Blik, A-M-, Van der Velde-Koerts, T., Ling, V. & Borst, P. 1986. Overexpression and amplification of five genes in a multidrug-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1671-1678.
  
- Varshavsky, A. 1981. Phorbol ester dramatically increases incidence of methotrexate-resistance mouse cells: Possible mechanisms and relevance to tumor promotion. *Cell* **25**: 561-572.
  
- Venolia, L., Urlaub, G. & Chasin, L.A. 1987. Polyadenylation of Chinese hamster dihydrofolate reductase genomic genes and minigenes after gene transfer. *Somat. Cell Mol. Genet.* **13**: 491-504.
  
- Wade, M., Kowalik, T.F., Mudryj, M., Huang, E.-S. & Azizkhan, J.C. 1992. E2F mediates dihydrofolate reductase promoter activation and multiprotein complex formation in human cytomegalovirus infection. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4364-4374.
  
- Waga, S., Hannon, G.J, Beach, D. & Stillman, B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**: 574-578.
  
- Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., Kikkawa, U. & Nishizuka, Y. 1992. Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C- $\delta$  subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10159-10163.
  
- Whal, G.M., Padgett, R.A. & Stark, G.R. 1979. Gene amplification causes overproduction of the first three enzymes of UMP synthesis in N-(phosphoacetyl-1-aspartate) resistant hamster cells. *J. Biol. Chem.* **254**: 8679-8689.
  
- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A. & Harlow, E. 1988. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**: 124-129.



- Wiedemann, L.M. & Johnson, L.F. 1979. Regulation of dihydrofolate reductase gene expression in mouse fibroblasts during the transition from the resting to growing state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 397-406.
- Wolf, M. & Baggiolini, M. 1988. The protein kinase inhibitor staurosporine, like phorbol esters, induces the association of protein kinase C with membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 1273-1279.
- Won, K.A., Xiong, Y., Beach, D. & Gilman, M.Z. 1992. Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9910-9914.
- Wu, J.R. & Johnson, L.R. 1982. Regulation of dihydrofolate reductase gene transcription in methotrexate-resistant mouse fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **110**: 183-189.
- Xiong, Y., Zhang, H. & Beach, D. 1992. D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**: 505-514.
- Yeung, C.-Y., Ingolia, D.E., Bobonis, C., Dunbar, B.S., Riser, M.E., Siciliano, M.J. & Kellems, R.E. 1983. Selective overproduction of adenosine deaminase in cultured mouse cells. *J. Biol. Chem.* **258**: 8338-8345.
- Ying, Y., Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C. & Wahl, G.M. 1992. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **70**: 937-948.
- Young, A.P. & Ringold, G.M. 1983. Mouse 3T6 cells that overproduce glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **258**: 11260-11266.
- Zhang, H., Hannon, G.J. & Beach, D. 1994. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes dev.* **8**: 1750-1758.