

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR DE ÁCIDOS BILIARES
NR1H4 ("FARNESOID X RECEPTOR", FXR) EN EL
CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS
EN EL DESARROLLO DE QUIMIORRESISTENCIA.
CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE SUS ISOFORMAS

TESIS DOCTORAL

JAVIER VAQUERO RODRÍGUEZ

2013

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR DE ÁCIDOS
BILIARES *NR1H4* ("FARNESOID X RECEPTOR", FXR)
EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES
IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE
QUIMIORRESISTENCIA. CARACTERÍSTICAS
FUNCIONALES DE SUS ISOFORMAS**

Memoria que presenta **D. Javier Vaquero Rodríguez** para
optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 31 de enero de 2013



D. EMILIO FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR DE ÁCIDOS BILIARES *NR1H4* (“FARNESOID X RECEPTOR”, FXR) EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE QUIMIORRESISTENCIA. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE SUS ISOFORMAS” presentada por D. Javier Vaquero Rodríguez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. D. José Juan García Marín y Dña. M^a Jesús Monte Río del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y la Dra. M^a Ángeles Serrano García del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 31 de enero de 2013

Fdo. Emilio Fernández Sánchez

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, D^a. M^a JESÚS MONTE RÍO, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA y D^a. M^a ÁNGELES SERRANO GARCÍA, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR DE ÁCIDOS BILIARES *NR1H4* (“FARNESOID X RECEPTOR”, FXR) EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE QUIMIORRESISTENCIA. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE SUS ISOFORMAS” presentada por D. Javier Vaquero Rodríguez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 31 de enero de 2013

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. M^a Jesús Monte Río

Fdo. M^a Ángeles Serrano García

El doctorando ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, con Referencia AP2007-00105.

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto GR75/2008. “Resistencia a la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer hepático y digestivo. Investigación de los mecanismos implicados y desarrollo de un método predictivo”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2008-2010.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto SAF2009-08493. “Papel del receptor nuclear FXR en la defensa contra el estrés oxidativo y la carcinogénesis”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2010.

Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto: SAF2010-15517. “Relación entre FXR y riesgo de carcinogénesis en tejidos del circuito enterohepático. Implicaciones terapéuticas”. Investigador principal: JJ García Marín. 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA023A11-2. “Evaluación de estrategias de supresión tumoral por inducción de diferenciación celular mediante la activación de la vía de señalización regida por el gen NR1H4”. Investigador Principal: MJ Monte Río. 2011-2013.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. Proyecto SA070A11-2. “Valor diagnóstico e interés como diana farmacológica en el tratamiento del colangiocarcinoma del gen SLC10A2”. Investigador Principal: RI Rodríguez Macías. 2011-2012.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. Proyecto BIO/11. “Bases moleculares de la respuesta SOS mediada por el receptor nuclear FXR y su papel en la hepatocarcinogénesis”. Investigador Principal: JJ García Marín. 2011-2012.

Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Proyecto PII1/00337. “Efecto de analgésicos y antiinflamatorios prescribibles durante el embarazo sobre la expresión/función de la proteína de resistencia a la quimioterapia en el cáncer de mama (BCRP) en la barrera placentaria”. Investigador principal: María José Pérez García.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Martinez-Becerra P, **Vaquero J**, Romero MR, Lozano E, Anadon C, Macias RI, Serrano MA, Grañé-Boladeras N, Muñoz-Bellvis L, Alvarez L, Sangro B, Pastor-Anglada M, Marin JJ. No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Molecular pharmaceutics*. 2012; 9 (6):1693-1704

Martinez-Becerra P, Monte I, Romero MR, Serrano MA, **Vaquero J**, Macias RI, Del Rio A, Grañé-Boladeras N, Jimenez F, San-Martin FG, Pastor-Anglada M, Marin JJ. Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy. *Pharmacol Res*. 2012. 66(5): p. 419-27.

Herraez E, Gonzalez-Sanchez E, **Vaquero J**, Romero MR, Serrano MA, Marin JJ, Briz O. Cisplatin-Induced Chemoresistance in Colon Cancer Cells Involves FXR-Dependent and FXR-Independent Up-Regulation of ABC Proteins. *Molecular pharmaceutics*. 2012; 9 (9):2565-2576.

En forma de abstract en las siguientes revistas:

Briz O, Herráez E, González-Sánchez E, Romero MR, **Vaquero J**, Pérez MJ, Sánchez-Vicente L, Monte MJ, Muntané J, Serrano MA, Marín JJG (2011). Activación de FXR de forma independiente de ABs: papel en la quimiorresistencia asociada a la expresión de MRP2. *Gastroenterología y Hepatología* 34 (1), 141.

Maria J Monte, Maria A Serrano, Elisa Herraez, **Javier Vaquero**, Ester Gonzalez-Sanchez, Marta R Romero, Ruben Rosales, Alba G Blazquez, Maria J Perez, Rocio I Macias, Laura Sanchez-Vicente, Elisa Lozano, Felipe Jimenez, Francisco Gonzalez-San Martin, Jordi Mutane, Oscar Briz, Jose J Marin (2011). Chemoresistance can be induced by bile acid-independent activation of FXR in liver and intestinal cancer cells. *Hepatology* 54 (1), 713.

J Vaquero, E Herraez, O Briz, R Rosales and JJG Marin (2012). Role of BCRP in FXR-induced chemoresistance in liver and intestinal cancer cells. *The FEBS Journal* 279 (Suppl 1), 154-155

J Vaquero, O Briz, E Herráez, MR. Romero, J Muntané, MJ Monte, MA Serrano, JJG Marín (2013). Papel de FXR en la quimioprotección de los hepatocitos y la quimiorresistencia de tumores hepáticos. *Gastroenterología y Hepatología* 36 (1).

Han sido presentados en los siguientes congresos:

Congreso: XXXVI Congreso Anual de la Asociación Española para el estudio del Hígado. Autores: O Briz, E Herráez, E González-Sánchez, MR Romero, **J Vaquero**, MJ Pérez, L Sánchez-Vicente, MJ Monte, J Muntané, MA Serrano y JJG Marín Título: Activación de FXR de forma independiente de ácidos biliares: papel en la quimiorresistencia asociada a la expresión de MRP2. Tipo de participación: Poster. Lugar celebración: Madrid, Fecha: 23-25/02/2011.

Congreso: XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología. Autores: **Javier Vaquero Rodríguez**, Elisa Herráez Aguilar, Rubén Rosales Rodríguez, Marta Rodríguez Romero, Ester González-Sánchez, Jordi Muntane, Oscar Briz Sánchez y José Juan García Marín. Título: La quimiorresistencia puede ser inducida por activación de FXR independiente de ácidos biliares en células hepáticas e intestinales. Tipo de participación: Oral. Lugar celebración: Barcelona, Fecha: 5-8/09/2011.

Congreso: The 62nd Annual Meeting Of The American Association For The Study Of Liver Diseases (AASL). Autores: María J Monte, María A Serrano, Elisa Herraез, **Javier Vaquero**, Ester Gonzalez-Sanchez, Marta R Romero, Ruben Rosales, Alba G Blazquez, María J Perez, Rocio I Macias, Laura Sanchez-Vicente, Elisa Lozano, Felipe Jimenez, Francisco Gonzalez-San Martin, Jordi Mutane, Oscar Briz, Jose J Marin. Título: Chemoresistance can be induced by bile acid-independent activation of FXR in liver and intestinal cancer cells. Tipo de participación: Poster. Lugar celebración: San Francisco, Fecha: 4-8/11/2011.

Congreso: 8th YSA-PhD-Symposium. Autores: **J Vaquero**, MJ Monte, MA Serrano, E Herraез, E Gonzalez-Sanchez, MR Romero, R Rosales, AG Blazquez, MJ Perez, RI Macias, L Sanchez-Vicente, E Lozano, F Jimenez, F Gonzalez-San Martin, J Mutane, O Briz, JJ Marin. Titulo: Chemoresistance can be induced by bile acid-independent activation of FXR in liver and intestinal cancer cells. Tipo de participación: Poster. Lugar celebración: Viena, Fecha: 13-14/06/20012.

Congreso: 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress. Autores: **J Vaquero**, E Herraез, O Briz, R Rosales and JJG Marin. Título: Role of BCRP in FXR-induced chemoresistance in liver and intestinal cáncer cells. Tipo de participación: Poster. Lugar celebración: Sevilla, Fecha: 4-9/09/2012.

Congreso: XXXVIII Congreso Anual de la Asociación Española para el estudio del Hígado. Autores: **J Vaquero**, O Briz, E Herráez, MR. Romero, J Muntané, MJ Monte, MA Serrano, JJG Marín. Título: Papel de FXR en la quimiprotección de los hepatocitos y la quimiorresistencia de tumores hepáticos. Tipo de participación: Poster. Lugar celebración: Madrid, Fecha: 20-22/02/2013.

AGRADECIMIENTOS:

Todos estos años de trabajo y dedicación no hubieran dado sus frutos sin la ayuda de muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

A mis directores:

Al Dr. José Juan García Marín por darme la oportunidad de formar parte de este magnífico equipo, y permitirme iniciar mi andadura en la investigación científica. Me ha ofrecido su confianza y sobre todo su apoyo y consejos en los momentos de crisis científica, que no han sido pocos.

A la Dra. M^a Jesús Monte Río, por su paciencia y exigencia, y sobre todo por su gran ayuda durante todo el desarrollo de este trabajo, especialmente en la corrección de este texto. Por haberme enseñado a ser riguroso en la realización y análisis los experimentos. Muchas gracias por transmitirme ese entusiasmo personal y científico.

A la Dra. M^a Ángeles Serrano por su apoyo incondicional, su cariño y sus buenos consejos, por hacerlo todo mucho más fácil y estar siempre dispuesta para prestar ayuda, a pesar de sus nuevas obligaciones. Por ser un ejemplo de discreción, elegancia y generosidad.

Al resto de miembros del grupo:

A la Dra. Rocío I. Rodríguez Macías por haberme abierto las puertas del grupo y por su gran ayuda en el mundo de la inmunodetección.

A la Dra. M^a José Pérez por los buenos ratos pasados en el laboratorio, a pesar de nuestras constantes luchas por el cuarto de cultivos. Gracias por tu compañerismo, por tu rigor en el trabajo, y por demostrarme día a día cómo se hace el buen trabajo.

A la Dra. Marta Rodríguez Romero, porque con ella di mis primeros pasos en los cultivos celulares. Por su simpatía y su ánimo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Oscar Briz Sánchez por toda la ayuda recibida, por todo lo que me ha enseñado y por ejercer de base de datos del laboratorio con su impresionante memoria para reactivos y protocolos.

A Alba G. Blázquez, por ser tan buena compañera, por su simpatía y por estar siempre dispuesta a echar una mano. Muchas gracias por la ayuda con los “reports” y las cartas.

A Elisa Herráez, por todo lo vivido durante estos años en el laboratorio, que no sabría cómo resumir en un solo párrafo. Por tu inestimable ayuda en los interminables papeleos, sin la que probablemente no podría haber presentado esta Tesis. Por los “salvame deluxe”, por el “secreto ibérico”, por el “plan mamut”, por la “tat-empresa”, por tantas y tantas cosas...

A Elisa Lozano y Laura Sánchez, por todo el tiempo que hemos compartido, por su ayuda siempre desinteresada y su atenta disposición. Gracias Elisa por tu ayuda con las líneas de colangiocarcinoma.

A Ester González porque sin ninguna duda no podría haber terminado este trabajo sin tu apoyo durante tantas y tantas horas de laboratorio. Por tu ayuda, cariño y comprensión durante estos años, dentro y fuera del laboratorio. Por haber sido el pilar en el que apoyarme en los momentos de crisis existencial cuando los experimentos no salían...o salían al revés. En definitiva, por no haberme dejado abandonar este mundo que tanto me gusta.

A los nuevos tesinandos (Alex M., Alex P., Alex J., Alicia, Lara, Laura, etc), por su simpatía y gran sentido del humor y sobre todo por hacerme recordar el lado divertido de este nuestro laboratorio.

A los compañeros que ya han abandonado el laboratorio. A Pablo Martínez Becerra por todos los buenos ratos pasados dentro y fuera del laboratorio, y su gran ayuda, ya sea en temas de investigación, la descarga de capítulos o la organización de cierta cena de laboratorio... A Rubén Rosales por su amabilidad, su simpatía y por estar siempre dispuesto a ayudar a los demás.

A todos los técnicos, auxiliares de laboratorio y personal de limpieza que han facilitado la realización de este trabajo, en especial a Tomy por su ayuda técnica y Narci por su gran trabajo y su sentido del humor. A Javier Escudero Curto por su gran trabajo en secretaria.

Aunque me repita, quiero dar las gracias a todos otra vez por su infinita paciencia ante mis constantes preguntas y peticiones de ayuda. Con compañeros así da gusto trabajar en el laboratorio.

También me gustaría dar las gracias a los Dres. Luis Álvarez, Jesús Bañales y Jordi Muntané, por su gran disposición a la hora de prestar materiales y técnicas para algunos de mis experimentos.

Y a todas las personas que fuera de los muros de este laboratorio han contribuido de alguna manera a que este barco llegue a buen puerto.

A mi gran y numerosa familia...a toda ella. A mis padres por su cariño, su ánimo y por haberme apoyado siempre en mis decisiones. A mi hermano Juan y mi cuñada Mirja, por sus sabios consejos, por su infinita paciencia y su (más infinita todavía) ayuda en la reparación de mi ordenador. A mi hermana Isabel y mi cuñado Nacho, por su preocupación, su ayuda y sobre todo...como no...porque han cumplido su “palabra” a tiempo para la Tesis. A mis sobrinos, porque en estos últimos meses de escritura, estrés y nervios infinitos, basta con acordarme de ellos para que todos los males pasen. A mis tías salmantinas, a las dos, por darme cobijo durante estos años cuando lo he necesitado, por vuestro cariño y por haber sido mis segundas madres. A la “primidad” (que no primación) y asociados, por las cenas en Narrillos, por los viajes a Salamanca y Madrid, por la “Black Card”, por vuestra amistad incondicional y porque sin vuestro interminable buen humor estos últimos años no hubieran sido lo mismo.

A los Colonos de Catán por haber sido una estupenda y necesaria escapatoria de este absorbente mundo de investigación en estos últimos meses.

Y por último, a los pocos biologitos que quedamos en Salamanca (Saúl, Charly, Pepín, etc), que nos dedicamos a la investigación y que poco a poco vamos emigrando a tierras extranjeras.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

DEDICADA A:

*Mi familia, en especial a mi tía
Toñi porque sé que le hubiera
encantado estar hoy aquí.*

ABREVIATURAS

- 6 α -ECDCA:** “6 α -ethyl-chenodeoxicholic acid”
- AEDT:** Ácido etilendiamino tetraacético
- AGC:** Ácido glicocólico
- AGDC:** Ácido glicodesoxicólico
- AGQDC:** Ácido glicoquenodesoxicólico
- AC:** Ácido cólico
- ABC:** “ATP Binding Cassette”
- AB:** Ácido biliar
- ACC:** Adenocarcinoma de colon
- ADC:** Ácido desoxicólico
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ADN copia
- AF-1:** Dominio de transactivación independiente de ligando
- AF-2:** Dominio de transactivación dependiente de ligando
- ALC:** Ácido litocólico
- Allo-CA:** Ácido allo-cólico
- APC:** “Adenomatous Polyposis Coli”
- AQDC:** Ácido quenodesoxicólico
- AMP:** Amplicón
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- ASBT:** “Apical sodium-dependent bile acid transporter”
- ATC:** Ácido taurocólico
- ATP:** Adenosín trifosfato
- ATC:** Ácido taurocólico
- ATDC:** Ácido taurodesoxicólico
- ATQDC:** Ácido tauroquenodesoxicólico
- AUDC:** Ácido ursodesoxicólico
- BAAT:** “Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase”
- BACS:** “Bile acid:CoA synthase”
- BCL2:** “B Cell Lymphoma Gene-2”
- BAX:** “Bcl-2-associated X protein”
- BCRP:** “Breast Cancer Resistance Protein”
- BSEP:** “Bile Salt Export Pump”
- C/EBP:** “CCAAT/enhancer binding protein”
- CAR:** “Constitutive Androstane Receptor”
- CC:** Colangiocarcinoma

CCL: “Chemokine ligands”
Ct: “Cycle Threshold”
CTM: “Cirrhotic Tumor Margins”
CYP: “Cytochrome P450”
DAPI: “4',6-diamidino-2-phenylindole”
DBD: “DNA Binding Domain”
DMEM: “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DMSO: Dimetilsulfóxido
DR: “Direct Repeats”
EC50: “Half maximal effective concentration”
ECL: “Enhanced ChemioLuminiscence”
EEM: Error Estándar de la Media
EGFR: “Epidermal Growth Factor Receptor”
ERK: “Extracellular signal-regulated kinases”
FGF: “Fibroblast Growth Factor”
FGFR: “Fibroblast Growth Factor Receptor”
FIC: “Familial Intrahepatic Cholestasis”
FRET: “Fluorescence Energy Transfer Assay”
FXR: “Farnesoid X Receptor”
FXRE: “FXR Response Element”
GADD45: “Growth arrest and DNA-damage inducible”
GAPDH: “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”
GS: Guggulsterona
GSH: Glutathion
H: “Hairpin”
HB: Hepatoblastoma
HCC: Carcinoma hepatocelular
Hepes: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
HNF: “Hepatocyte Nuclear Factor”
HPLC: “High-Performance Liquid Chromatography”
HR: “Homologous Recombination”
IBABP: “Ileal Bile Acid Binding Protein”
IR: “Inverted Repeats”
kb: Kilobase
kDa: Kilodalton
KRT: “Keratin”
LB: Luria Bertani
LBD: “Ligand Binding Domain”
LBP: “Ligand Binding Pocket”

LDL: “Low Density Lipoproteins”
LRH: “Liver Receptor Homolog”
Luc: Luciferasa
MAPK: “Mitogen-Activated Protein Kinases”
MDR: “Multidrug Resistance”
MEM: “Minimum essential médium eagle”
minPr: “Minimal Promoter”
MMR: “Mistmatch Repair”
MOC: “Mechanism Of Chemoresistance”
MOPS: Ácido morfolino propansulfónico
MRP: “Multidrug Resistance Protein”
NER: “Nucleotide Excision Repair”
norADC: Ácido nordesoxicólico
NTCP: “Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide”
OATP: “Organic Anion Transporter Polipeptide”
OCT: “Organic Anion Transporter”
ORF: “Open Reading Frame”
OST: “Organic Solute Transporter”
PBS: “Phosphate Buffered Saline”
PCR: “Polimerase Chain Reaction”
PDGFR: “Platelet Derived Growth Factor Receptor”
PFIC: “Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis”
PGC: “PPAR γ coactivator”
PKC: “Protein Kinase C”
pb: Pares de bases
Pm: Peso molecular
PXR: “Pregnane X Receptor”
RIP: “RXR-Interacting Protein”
RIPA: “Radioimmunoprecipitation assay”
ROS: “Reactive Oxygen Species”
RPL: “Ribosomal Protein L”
RT: “Reverse-Transcription”
RXR: “Retinoid X Receptor”
SDS: “Sodium Dodecyl Sulfate”
SIRT: “Sirtuin”
SULT: “Sulfotransferase”
SHP: “Small Heterodimer Partner”
SNP: “Single Nucleotide Polimorfism”
SQSTM: “Sequestosome”

SRC: "Steroid Receptor Coactivator"

TAE: "Tris-Acetate-EDTA"

TC-NER: "Transcription Coupled Nucleotide Excision Repair"

TEMED: N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina

TF: "Transcription Factor"

TNF: "Tumoral Necrosis Factor"

TLDA: "TaqMan Low Density Array"

UA: Unidades arbitrarias

UGT2B4: "UDP glucuronosyltransferase"

VDR: "Vitamin D Receptor"

VEGFR: "Vascular Endothelial Growth Factor Receptor"

WT: "Wild Type"

ÍNDICE

1- OBJETIVOS	1
2- INTRODUCCIÓN	5
2.1- ÁCIDOS BILIARES	7
2.1.1- Síntesis de ácidos biliares en el hígado.....	8
2.1.2- Conjugación de los ácidos biliares.....	10
2.1.3- Biotransformación de ácidos biliares por las bacterias intestinales.....	11
2.1.4- Papel fisiológico de los ácidos biliares.....	11
2.1.5- Transporte de ácidos biliares en la circulación enterohepática.....	13
2.2- FARNESOID X RECEPTOR	14
2.2.1- Clonación y estructura de FXR.....	14
2.2.2- Patrones de distribución tisular de FXR.....	16
2.2.3- Elementos de respuesta y cofactores de FXR.....	17
2.2.4- Ligandos de FXR.....	18
2.2.5- Modificaciones postraduccionales de FXR.....	24
2.2.6- Variabilidad genética de FXR.....	26

2.3- REGULACIÓN DEL METABOLISMO Y EL TRANSPORTE DE ÁCIDOS BILIARES MEDIADA POR FXR	.27
2.4- ASPECTOS PATOFISIOLÓGICOS DE FXR	.30
2.4.1- Colestasis	.30
2.4.2- Colelitiasis	.31
2.4.3- Enfermedades intestinales	.32
2.4.4- Regeneración hepática	.33
2.4.5- Tumorigénesis	.34
2.4.5.1- Tumorigénesis hepática	.34
2.4.5.2- Tumorigénesis intestinal	.34
2.5- MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA	.36
2.5.1- Resistencia a la quimioterapia en cáncer hepático	.37
2.5.2- Resistencia a la quimioterapia en cáncer de colon	.39
3- MATERIAL Y MÉTODOS	.41
3.1- MATERIAL	.43
3.1.1- Material Biológico	.43
3.1.1.1- Muestras humanas	.43
3.1.1.2- Líneas celulares	.43

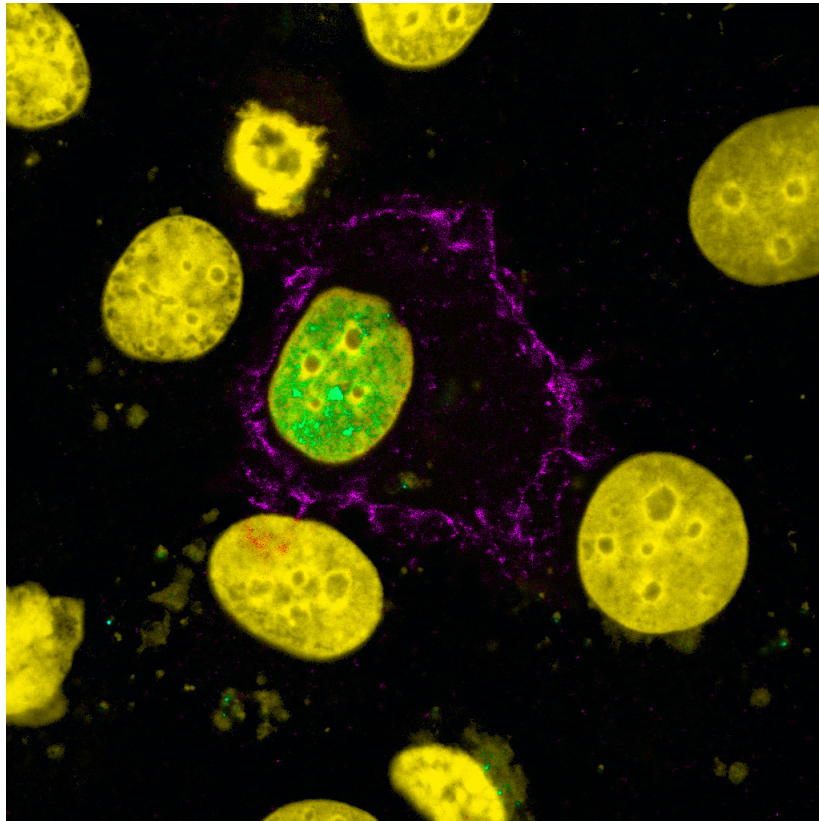
3.1.1.3- Bacterias.....	44
3.1.2- Productos.....	44
3.1.3- Medios instrumentales.....	47
3.1.4. Soluciones comunes utilizadas.....	49
3.2- MÉTODOS.....	50
3.2.1- Métodos de Clonación.....	50
3.2.1.1- Clonación por recombinación Gateway.....	50
3.2.2- Cultivos celulares.....	55
3.2.2.1- Medios de cultivo.....	55
3.2.2.2- Cultivo de células para cuantificación absoluta del ARNm de FXR.....	56
3.2.2.3- Estudio del efecto de agonistas de FXR en células LS 174T y LS 174T/R.....	56
3.2.2.4- Estudio del efecto de agonistas de FXR en células HepG2 y HuH-7.....	57
3.2.2.5- Experimentos de transfección.....	57
3.2.2.6- Experimentos en hepatocitos humanos.....	60
3.2.3- Análisis de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa.....	61
3.2.3.1- Extracción del ARN total.....	61
3.2.3.2- Transcripción reversa (RT).....	61

3.2.3.3- Tratamiento con la enzima de restricción <i>DpnI</i>	61
3.2.3.4- Diseño de cebadores.....	62
3.2.3.5- Realización de la PCR cuantitativa.....	64
3.2.3.6- Cuantificación absoluta.....	64
3.2.3.7- Cuantificación relativa.....	65
3.2.3.8- Tarjetas microfluídicas (TLDA).....	65
3.2.4- Detección de proteínas por Western blot.....	66
3.2.4.1- Obtención de lisados celulares.....	66
3.2.4.2- Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	67
3.2.4.3- Inmunodetección.....	67
3.2.5- Detección de proteínas por inmunofluorescencia.....	68
3.2.5.1- Procesamiento de las muestras.....	68
3.2.5.2- Inmunodetección.....	68
3.2.6- Detección de proteínas por inmunohistoquímica.....	68
3.2.6.1- Obtención y preparación de las muestras.....	68
3.2.6.2- Inmunodetección.....	69
3.2.7- Métodos analíticos.....	69
3.2.7.1- Valoración del ARN por el método del RiboGreen.....	69

3.2.7.2- Valoración del ADN por el método del PicoGreen.....	69
3.2.7.3- Determinación de la viabilidad celular mediante el test de formazán ..	69
3.2.7.4- Determinación de proteínas totales.....	69
3.2.7.5- Determinación de la actividad luciferasa.....	70
3.2.7.6- Análisis de ácidos biliares por HPLC-MS/MS.....	70
3.2.7.7- Electroforesis en gel de agarosa.....	71
3.2.8- Análisis estadístico.....	71
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
4.1- CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES E IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LAS ISOFORMAS DE FXR.....	75
4.1.1- Cuantificación absoluta de la expresión de FXR y sus isoformas.....	76
4.1.2- Activación de FXR por ácidos biliares en hepatocitos humanos en cultivo primario.....	82
4.1.3- Activación de FXR por ácidos biliares en líneas celulares hepáticas humanas.....	85
4.1.3.1- Líneas celulares con expresión endógena de FXR (HepG2 y HuH-7).....	85
4.1.3.2- Líneas celulares que carecen de expresión endógena de FXR (Alexander).....	87
4.1.4- Activación de FXR por ácidos biliares en líneas celulares intestinales humanas.....	104

4.1.4.1- Activación de las isoformas de FXR por ligandos endógenos y sintéticos.....	104
4.1.4.2- Actividad agonista de ácidos biliares libres y conjugados.....	108
4.1.5- Hipótesis propuestas para explicar las diferencias de actividad de los ácidos biliares libres y conjugados.....	110
4.2- PAPEL DE FXR EN LOS MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA DE TUMORES DEL CIRCUITO ENTEROHEPÁTICO.....	112
4.2.1- Papel de FXR en la activación de mecanismos de quimiorresistencia en tumores hepáticos.....	113
4.2.2- Papel de FXR en la activación de mecanismos de quimiorresistencia en tumores de colon	116
4.3- PAPEL DE FXR EN EL DESARROLLO DE PROCESOS DE QUIMIORRESISTENCIA EN CÉLULAS HEPÁTICAS E INTESTINALES.....	121
4.3.1- Efecto protector de FXR frente a la toxicidad producida por distintos tóxicos en células hepáticas.....	121
4.3.2- Inducción de un elemento IR1 de respuesta a FXR por cisplatino.....	124
4.3.3- Efecto del cisplatino sobre genes diana de FXR en células hepáticas.....	126
4.3.4- Activación de la ruta de p53 por cisplatino en células hepáticas.....	128
4.3.5- Efecto del cisplatino en hepatocitos humanos en cultivo primario.....	129
4.3.6- Activación de la ruta de señalización de FXR en células LS 174T/R.....	131
4.3.7- Efecto protector de FXR frente a la toxicidad del cisplatino en células intestinales.....	132

4.3.8- Análisis de la expresión de genes implicados en mecanismos de quimiorresistencia.....	134
4.3.9- Efecto protector de BCRP frente a la toxicidad del cisplatino en células intestinales.....	144
4.3.10- Expresión del gen <i>TCEA2</i> en respuesta al cisplatino.....	146
4.4- MODELO PROPUESTO DEL PAPEL DE FXR EN QUIMIORRESISTENCIA.....	147
5- CONCLUSIONES.....	151
6- BIBLIOGRAFÍA.....	157
7-ENGLISH SUMMARY.....	183
7.1- OBJECTIVES.....	185
7.2- RESULTS.....	186
7.2.1- Functional characteristics and physiological importance of FXR isoforms.....	186
7.2.2- Role of FXR in mechanisms of chemoresistance associated to enterohepatic tumors.....	228
7.2.3- Role of FXR in the development of chemoresistance by hepatic and intestinal cells.....	252
7.3- CONCLUSIONS.....	297



“Si supiera lo que estoy haciendo no lo llamaría investigación, ¿No crees?”

Albert Einstein

1. Objetivos

El descubrimiento de receptores específicos de membrana, como TGR5, y nucleares, como FXR (de “Farnesoid X Receptor”, gen *NR1H4*), sensibles a la activación por ácidos biliares (ABs) ha hecho que se reconsidere el papel fisiológico de estos esteroides no sólo como meros detergentes digestivos sino también como moléculas señalizadoras implicadas en el control de diversas facetas del metabolismo.

En diferentes especies con distinto grado de evolución, desde peces teleósteos hasta mamíferos superiores se ha descrito la expresión de ortólogos del gen *NR1H4* y la presencia de distintas isoformas. Concretamente, en humanos existen cuatro isoformas de FXR, cuyo patrón de expresión varía según los tejidos, pero de las que se conoce muy poco sobre sus funciones específicas.

FXR se ha considerado tradicionalmente como un sensor metabólico, involucrado principalmente en la regulación de la homeostasis de los ABs, pero también del metabolismo de otros lípidos y de la glucosa. Sin embargo, en los últimos años se está describiendo su papel en otros procesos como la prevención de la tumorigénesis hepática e intestinal, la regeneración hepática, el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal o la atenuación de los efectos adversos de situaciones patológicas que cursan con colestasis. Para llevar a cabo estas funciones, este receptor nuclear regula la expresión de numerosos genes implicados en mecanismos de quimiorresistencia, lo que podría sugerir un posible papel de FXR en la protección de los tejidos en los que se expresa frente a la toxicidad inducida por xenobióticos.

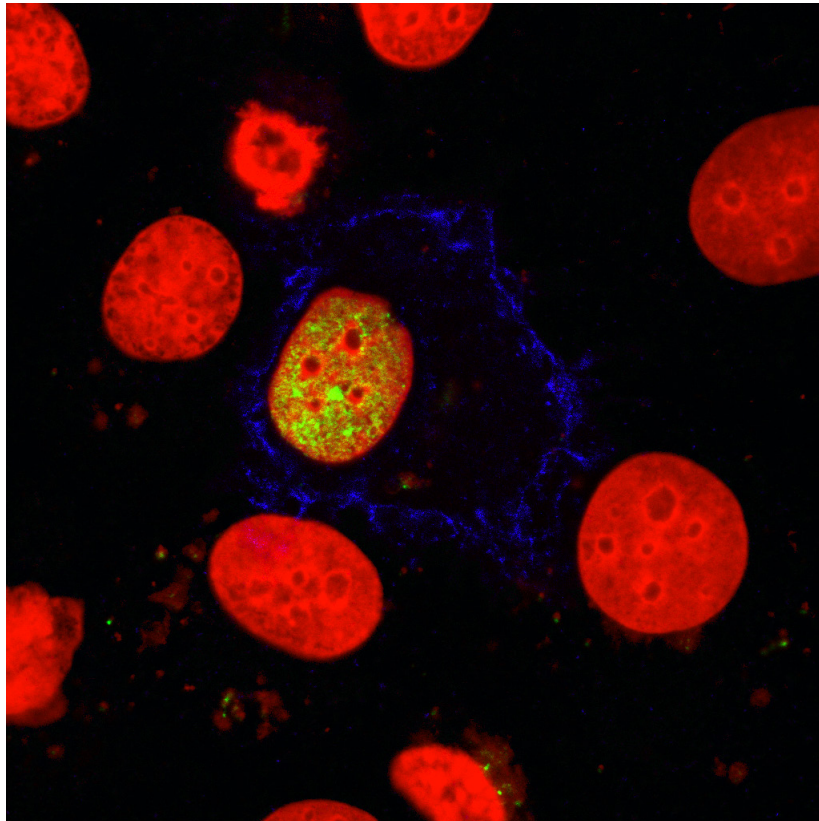
Por todo ello nos planteamos como **objetivo global** de esta Tesis Doctoral profundizar en el estudio del papel que juega la vía de señalización de FXR y las isoformas de este receptor nuclear en los mecanismos de regulación de genes implicados en el desarrollo de quimiorresistencia. Para alcanzar este objetivo se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

Objetivo primero: Caracterizar aspectos diferenciales del papel fisiológico de las distintas isoformas de FXR, tales como su localización subcelular, su expresión en los principales tejidos expuestos a ABs, su respuesta a agonistas y las repercusiones fenotípicas de su activación.

Objetivo segundo: Investigar el efecto de las variaciones en el núcleo esteroide y en el estado de conjugación de la cadena lateral con glicina o taurina sobre la capacidad de las diferentes especies moleculares de ABs para actuar como agonistas de las distintas isoformas de FXR.

Objetivo tercero: Analizar el papel de FXR y de su vía de señalización en la activación de mecanismos de defensa en células hepáticas e intestinales frente a la toxicidad de diferentes agentes endógenos y xenobióticos.

Objetivo cuarto: Investigar el papel de FXR y sus isoformas en la elevada quimiorresistencia que es característica de los tumores hepáticos e intestinales de origen epitelial.



“No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela.”

Albert Einstein

2. Introducción

2.1- ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares (ABs) son moléculas anfipáticas con un esqueleto esteroide que son sintetizadas a partir de colesterol en los hepatocitos. En especies inferiores, como peces y varios anfibios y reptiles, hay un predominio de ABs en los que se preserva el esqueleto esteroide de 27 átomos de carbono del colesterol. Sin embargo, en la mayoría de mamíferos la cadena lateral sufre un acortamiento de 8 a 5 carbonos durante el proceso de síntesis, dando lugar a ABs de 24 átomos de carbono (C_{24}), predominantes en estas especies y sobre los que se centra este texto. La transformación del colesterol en ABs C_{24} conlleva múltiples pasos enzimáticos, que se detallan en el siguiente apartado, y que son catalizados por enzimas expresadas predominantemente o exclusivamente en el hígado.

Respecto a su estructura química (Figura I-1), los ABs en humanos son esteroides con 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxilados y con un grupo carboxilo en la cadena lateral, que puede estar conjugado con glicina o taurina (Roger et al., 1983). El núcleo esteroide se caracteriza por el número y posición variable de los grupos hidroxilo y en determinadas situaciones por la presencia de dobles enlaces. La base del núcleo esteroide es el anillo ciclopentanoperhidro-fenantreno, que consta de 3 anillos de 6 átomos de carbono (A, B y C) y uno de 5 carbonos (D). Una característica estructural común a todos los ABs y al colesterol es la presencia de 3 grupos metilo, situados en las posiciones C_{10} , C_{13} y C_{20} . La relativa constancia del núcleo esteroide contrasta con la variedad de las sustituciones que puede sufrir. La cadena lateral, que se encuentra unida al anillo D en la posición C_{17} , suele presentar un grupo metilo en la posición C_{20} y termina en un grupo carboxilo.

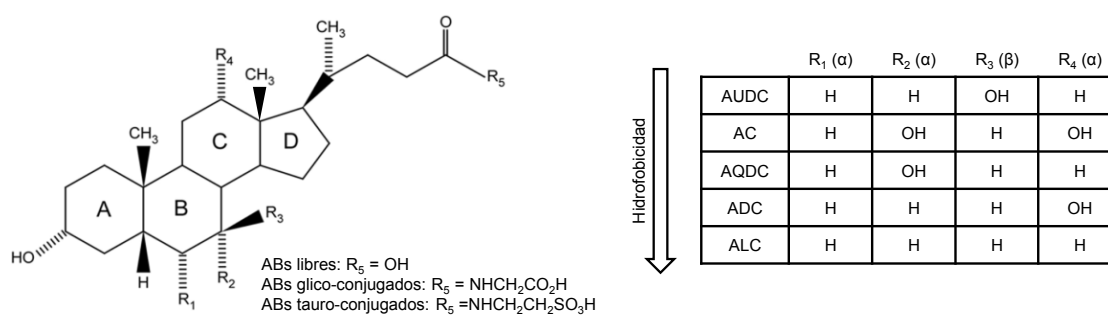


Figura I-1. Estructura y perfil de hidrofobicidad de los ácidos biliares (ABs) más comunes. El ácido cólico (AC) y el ácido quenodesoxicólico (AQDC) son ABs primarios, mientras que el ácido desoxicólico (ADC) y el ácido litocólico (ALC) son ABs secundarios. El ácido ursodesoxicólico (AUDC) es un AB primario predominante en el oso. Los grupos hidroxilo en orientación α se localizan por debajo del núcleo esteroide y son axiales con respecto al plano del núcleo esteroide. Los grupos hidroxilo en orientación β se localizan por encima del núcleo esteroide y son ecuatoriales al plano del núcleo esteroide. Adaptado de Modica et al., 2010.

Los términos “ABs” y “sales biliares” suelen utilizarse indistintamente, pero indican situaciones diferentes del estado de ionización de estas moléculas. Las sales biliares son las formas ionizadas más hidrosolubles, que aparecen en bilis acompañadas de Na^+ o K^+ , mientras que los ABs son formas no ionizadas menos hidrosolubles. Aunque en los fluidos biológicos de pH 7 o superior la mayor parte de estas moléculas se encuentra en forma

aniónica (Hofmann, 1998), en este texto se incluirán ambas formas moleculares bajo el término de ABs.

2.1.1- Síntesis de ácidos biliares en el hígado

Los productos inmediatos de las vías de síntesis de ABs son los denominados ABs primarios. El ácido cólico (ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colanoico) (AC) y el ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colanoico) (AQDC) son los ABs primarios en humanos (Figura I-2). La diversidad química del “pool” de ABs se ve incrementada por la actividad metabólica de las bacterias de la flora intestinal, que tras una serie de modificaciones dan lugar a los denominados ABs secundarios. En humanos, el ácido desoxicólico (ácido 3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colanoico) (ADC) y el ácido litocólico (ácido 3 α -hidroxi-5 β -colanoico) (ALC) (Figura I-2) representan la mayoría de las especies de ABs secundarios y derivan de los AC y AQDC, respectivamente.

Los pasos que conducen a la formación de los ABs primarios incluyen la hidroxilación del colesterol en la posición C₇ del anillo esteroide o en las posiciones C₂₄, C₂₅ y C₂₇ de la cadena lateral, diversas modificaciones del anillo esteroide y, por último, un acortamiento de la cadena lateral.

El paso de hidroxilación catalizado por la enzima microsomal colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1), es la primera etapa de la denominada “ruta clásica o neutra” de biosíntesis de ABs, llamada así porque los intermediarios de la ruta son esteroides neutros. Esta reacción, que produce 7 α -hidroxicolesterol (Figura I-2), es considerada la etapa limitante de la ruta y la CYP7A1 está sujeta a complejos mecanismos de control que regulan su actividad (ver apartado 2.3).

Las moléculas de colesterol hidroxiladas en las posiciones C₂₄, C₂₅ y C₂₇ de la cadena lateral pueden servir de sustratos para la síntesis de ABs, pero sólo la síntesis a partir de 27-hidroxicolesterol tiene lugar en cantidades relevantes en humanos y roedores, por medio de la que se conoce como “ruta alternativa o ácida”, debido a que los intermediarios de la ruta son de carácter ácido. Este oxiesteroide, el más abundante en el plasma humano, es sintetizado por la enzima 27-hidroxicolesterol mitocondrial (CYP27A1), una enzima expresada de forma ubicua, en una reacción considerada como la etapa limitante de esta ruta. Para su conversión en AB, el 27-hidroxicolesterol debe sufrir 7 α -hidroxilación por la enzima microsomal CYP7B1.

La contribución relativa de la vía clásica y la vía alternativa a la biosíntesis global de los ABs no está muy clara, aunque parece ser que la vía clásica sería la mayoritaria en la biosíntesis de ABs en humanos en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la vía alternativa puede adquirir un papel fundamental en pacientes con algunas enfermedades hepáticas, y parece ser la vía predominante durante la vida fetal (Back y Walter, 1980). La vía clásica genera AC y AQDC en cantidades similares, mientras que el principal producto de la vía alternativa es el AQDC (Bjorkhem, 1992).

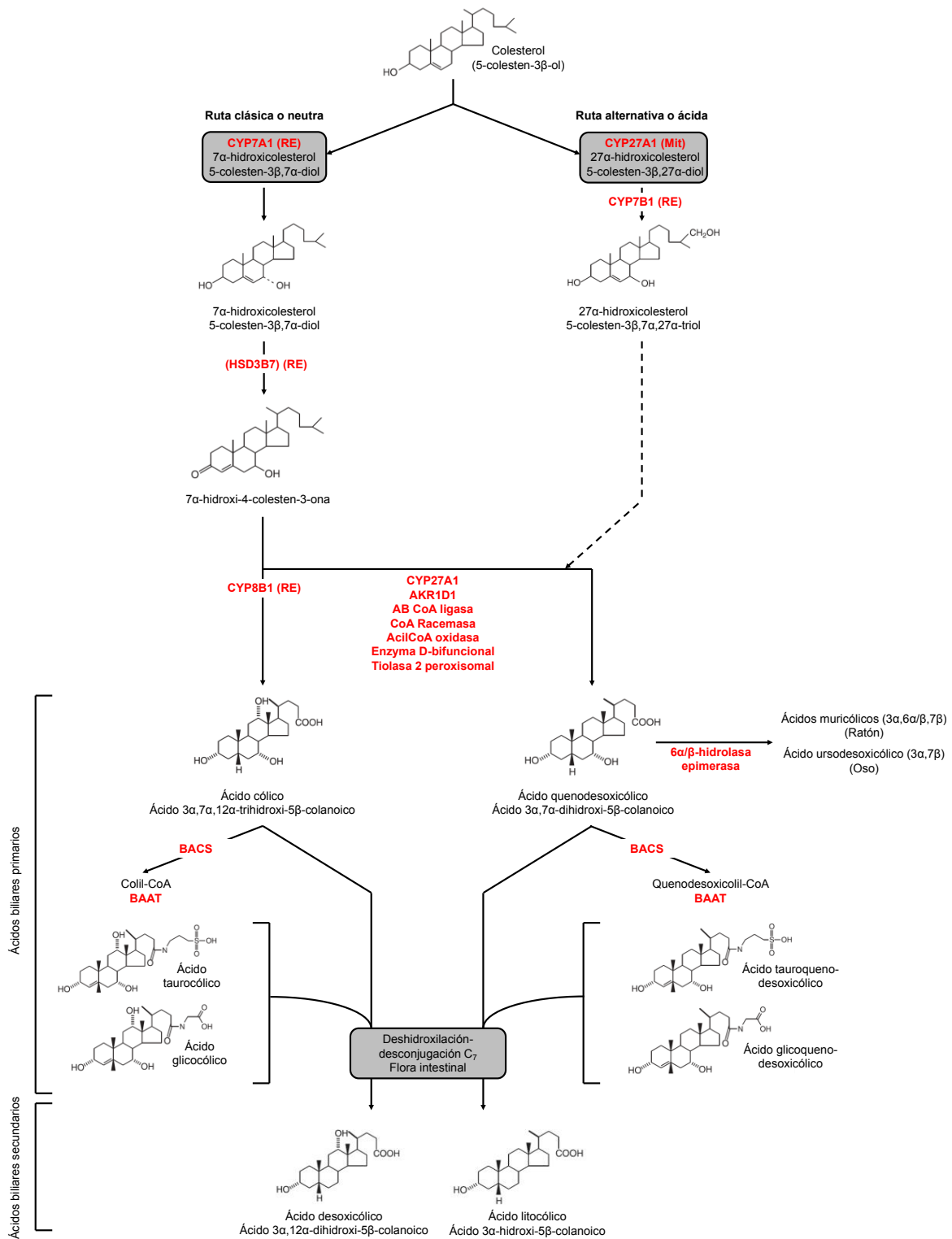


Figura I-2. Rutas de síntesis de ácidos biliares (ABs) en humanos. También se muestra la ruta de transformación del ácido quenodesoxicólico (AQDC) en ácido muricólico y ursodesoxicólico (AUDC) en ratón y oso, respectivamente. En la figura se muestran las principales reacciones enzimáticas en la síntesis de ABs desde el esqueleto de colesterol. La importancia funcional de alguna de las enzimas (indicadas en rojo) se detalla en el texto. La localización subcelular de las reacciones enzimáticas se indica en la figura (RE, Retículo Endoplasmático; Mit, Mitocondria). Adaptado de Lefebvre et al., 2009.

Los intermediarios 7α -hidroxi formados por la CYP7A1 y la CYP7B1 son, posteriormente, convertidos en intermediarios $3\text{-oxo},\Delta^4$ por acción de la 3β -hidroxi- Δ^5 -C₂₇-esteroide oxidoreductasa microsomal (HSD3B7). Los productos de esta reacción pueden seguir posteriormente dos rutas, una en la que el intermediario $3\text{-oxo},\Delta^4$ interacciona con la esteroide 12α -hidroxilasa microsomal (CYP8B1), produciendo AC, y otra en la que el intermediario evita la 12α -hidroxilación, generándose AQDC (Figura I-2). De esta forma, la actividad de la CYP8B1 determina la proporción en que los ABs primarios están siendo formados y, por tanto, las propiedades biológicas y fisicoquímicas del “pool” de ABs.

Los siguientes pasos en la cascada biosintética implican la oxidación y el acortamiento progresivo de la cadena lateral. Este proceso de acortamiento tiene lugar en varias etapas en las que están involucradas la enzima CYP27A1 mitocondrial y varias enzimas localizadas en los peroxisomas. En humanos, los productos finales de esta ruta biosintética son el AC y el AQDC. Sin embargo, en el ratón y en el oso, el AQDC es convertido en ácidos muricólicos y ácido ursodesoxicólico (AUDC), respectivamente.

En humanos adultos, el núcleo de los ABs aparece curvado debido a que los anillos A y B se encuentran en configuración “cis”, disponiéndose en planos perpendiculares, uno respecto al otro, cuando el H del C₅ se dispone en posición β . Por ello, a estos ABs se los denomina 5β -ABs. En ciertas situaciones, como la regeneración y carcinogénesis hepática (El-Mir et al., 2001; Starkel et al., 2009), así como en fetos humanos sanos, aparecen ABs en los que los anillos A y B se encuentran en el mismo plano, es decir, con el H del C₅ en posición α ; a éstos se les llama 5α -ABs, ABs planos o allo-ABs.

2.1.2- Conjugación de los ácidos biliares

Antes de ser secretados al lumen del canalículo biliar, los ABs primarios son conjugados en sus cadenas laterales con taurina o glicina, para mejorar su hidrofiliidad. Este proceso tiene lugar en dos fases: primero la enzima AB-CoA sintetasa (BACS) sintetiza un AB-CoA, que es utilizado, posteriormente, por la AB Coenzima A:aminoácido N-aciltransferasa (BAAT) para formar un enlace amida con un aminoácido (Figura I-2) (Falany et al., 1994). La reacción de conjugación es muy eficiente, ya que prácticamente todos los ABs en la bilis de todas las especies de mamíferos estudiadas están conjugados (Moschetta et al., 2005).

Aunque el término conjugación es usado generalmente para referirse a la amidación de los ABs con glicina o taurina, es importante tener en cuenta que estas moléculas pueden ser objeto de otras reacciones de conjugación, como por ejemplo, reacciones metabólicas de fase II, similares a las involucradas en la inactivación de endo- y xenobióticos. Entre estas reacciones se incluyen la sulfatación, catalizada por la sulfotransferasa 2A1 (SULT2A1) (Song et al., 2001), y la glucuronidación, que puede ser catalizada por varias UDP glucuronosiltransferasas, siendo la principal la UGT2B4 (Barbier et al., 2003). A diferencia de la amidación con glicina o taurina, la sulfatación o la glucuronidación son vías minoritarias en individuos sanos. Sin embargo, cobran importancia en situaciones como la colestasis, en la que tanto la sulfatación como la glucuronidación de los ABs se

incrementan con objeto de formar especies más hidrosolubles que puedan ser eliminadas por la orina.

2.1.3- Biotransformación de ácidos biliares por las bacterias intestinales

La flora microbiana del intestino grueso afecta de forma importante al metabolismo de los ABs y, viceversa, la bilis y los ABs contribuyen a una supresión considerable de la colonización bacteriana del intestino delgado (Inagaki et al., 2006) (ver apartado 2.4.3). Entre las modificaciones estructurales que tienen lugar en el intestino grueso se encuentran: la desconjugación, la oxidación de grupos hidroxilo en las posiciones C₃, C₇ y C₁₂, y la 7 α /7 β -deshidroxilación.

La desconjugación para liberar los residuos de glicina o taurina de la posición C₂₄ del AB es completa en el intestino grueso humano, hecho de gran importancia para la generación de las especies secundarias de ABs, como se comentará más adelante.

La oxidación y epimerización de los grupos hidroxilo de las posiciones C₃, C₇ y C₁₂, es llevada a cabo por hidroxisteroide deshidrogenasas expresadas en varias cepas bacterianas, y da lugar a oxo-ABs estables que pueden encontrarse en las heces humanas (Setchell et al., 1983).

La 7 α -deshidroxilación de los AC y AQDC, para generar ADC y ALC, representa la biotransformación más importante cuantitativamente en el colon humano, como demuestra el hecho de que el ADC y el ALC son las especies de ABs predominantes en las heces humanas (Setchell et al., 1983). Curiosamente, la reacción de deshidroxilación parece restringirse a ABs libres, implicando una interacción funcional entre las actividades de desconjugación y deshidroxilación en el intestino grueso (Ridlon et al., 2006). Estas acciones combinadas incrementan la hidrofobicidad y el pKa de los ABs, permitiendo de ese modo su absorción por difusión pasiva a través del epitelio colónico y su ingreso en el "pool" de ABs. Debido a que el hígado humano es incapaz de rehidroxilar el ADC, a diferencia del hígado de roedor, este AB secundario constituye una parte significativa del "pool" de ABs circulante en humanos (\approx 35%). Por el contrario, los niveles de ALC son muy bajos debido a su eficiente sulfatación y posterior secreción en la bilis, la cual limita la reabsorción intestinal, previniendo, por tanto, su acumulación en la circulación enterohepática.

2.1.4- Papel fisiológico de los ácidos biliares

Los efectos fisiológicos de los ABs son muy diversos. En el hígado, su secreción genera el flujo biliar dependiente de los ABs por su efecto osmótico en la luz canalicular. Además, estimulan la contracción canalicular, que colabora en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar, inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, y modulan la biosíntesis de colesterol, ya que un aumento de la síntesis de estas moléculas origina un aumento, también, en la síntesis o en la utilización de colesterol como molécula precursora. El flujo de ABs a través del hepatocito

también determina la cantidad de los receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

En la bilis forman micelas que transportan sustancias hidrofóbicas (colesterol, protoporfirinas, etc) y actúan como tampones para el Ca^{2+} . A nivel intestinal, estas micelas permiten emulsionar las grasas y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) de la dieta facilitando así su absorción. También activan lipasas intestinales, modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal, la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina (Izukura et al., 1991), e inducen la secreción de agua y electrolitos.

Los ABs también juegan un papel en la homeostasis energética, ya que, al menos en modelos animales, inhiben la obesidad inducida por la dieta y previenen el desarrollo de resistencia a la insulina (Ikemoto et al., 1997). Del mismo modo, se ha demostrado su participación en el control de la proliferación y apoptosis en los tejidos donde estas moléculas se encuentran en concentraciones elevadas (Marin et al., 1993).

Además, están implicados en otros procesos de naturaleza muy variada como la activación de los mastocitos (Quist et al., 1991) y la estimulación de la captación intestinal de hierro (Sanyal et al., 1990). Por otro lado, se ha estudiado la posible acción genotóxica de los ABs, y se ha observado que los ABs secundarios generados por transformación bacteriana tienen un poder genotóxico mayor que los ABs primarios producidos por el hígado, lo que parece estar relacionado con el mayor o menor carácter hidrofóbico de las distintas especies de ABs (Figura I-1) (Rosignoli et al., 2008). Curiosamente, un AB primario predominante en el oso, como es el AUDC, posee gran interés terapéutico. Este AB difiere del AQDC, mucho más tóxico, sólo en la orientación ecuatorial del grupo 7β -hidroxilo, pero esta propiedad permite que el AUDC sea marcadamente más hidrofílico que otros ABs (Perez y Briz, 2009). Así, diversos estudios han confirmado su utilidad en la disolución de cálculos biliares en la vesícula (Portincasa et al., 2009) y en el tratamiento de la cirrosis biliar (Gong et al., 2008).

En los últimos años se ha iniciado una nueva era en la investigación de los ABs a consecuencia del descubrimiento del papel de estas moléculas en la señalización celular, como ligandos del receptor acoplado a proteínas G TGR5 (Kawamata et al., 2003) y de receptores nucleares como FXR (de "Farnesoid X Receptor", también conocido como BAR, de "Bile Acid Receptor") (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang et al., 1999). Este descubrimiento reveló una función hasta ahora desconocida de los ABs en el control de la expresión génica. Años más tarde se descubrió que, muchos de los genes codificantes para proteínas involucradas en la síntesis, metabolismo y transporte en la circulación enterohepática de los ABs, están estrictamente controlados por estos compuestos a través de la activación de FXR y sus cascadas de señalización. Más tarde se descubrió que los ABs también atienden funciones específicas como "integradores metabólicos", en el control de la utilización de las grasas, los azúcares y en el metabolismo energético, a través de la modulación de la expresión génica, un papel señalizador que puede ser en parte dependiente y en parte independiente de las vías de señalización de FXR, y que

también involucra a TGR5 (Keitel et al., 2008). Por tanto, los ABs están involucrados en una gran variedad de procesos biológicos y juegan un importante papel en la homeostasis celular, que va más allá de su clásica función como meros detergentes.

2.1.5- Transporte de ácidos biliares en la circulación enterohepática

La eficiente reabsorción de ABs en el íleon resulta en una acumulación de ABs en el organismo, a la que se conoce como conjunto o “pool” de ABs y que circula entre el intestino y el hígado en la denominada circulación enterohepática. La conservación del “pool” de ABs dentro de la circulación enterohepática requiere la acción coordinada de varias proteínas transportadoras, expresadas en las membranas canalicular y basolateral de los hepatocitos y en las membranas apical y basal de los ileocitos.

Los ABs recién sintetizados y los que retornan desde el intestino durante el transcurso de la circulación enterohepática son secretados activamente por los hepatocitos hacia el lumen canalicular por acción de la bomba exportadora de sales biliares (BSEP, gen *ABCB11*), un miembro de la superfamilia de proteínas transportadoras ABC (de “ATP Binding Cassette”). La secreción activa de ABs proporciona una importante fuerza impulsora para la formación de bilis (Trauner y Boyer, 2003) y, por tanto, es de crucial importancia para la eliminación hepática de una variedad de compuestos endógenos potencialmente tóxicos y xenobióticos a través de la vía hepatobiliar. Además, la secreción de ABs impulsa la secreción de fosfolípidos y colesterol a la bilis. La secreción de estos lípidos también depende de forma crucial de la actividad de transportadores de la superfamilia ABC, como por ejemplo, MDR3 (gen *ABCB4*), en el caso de los fosfolípidos, y el heterodímero ABCG5/ABCG8, para el transporte de colesterol (Elferink y Groen, 2002). La secreción conjunta de ABs, fosfolípidos y colesterol permite la formación de micelas mixtas en la bilis, que son determinantes para la protección del sistema biliar de las acciones detergentes provocadas por las altas concentraciones de ABs (Smit et al., 1993).

La bilis primaria, que contiene ABs y lípidos asociados en el rango milimolar de concentración, es almacenada en la vesícula biliar, donde se concentra por absorción de agua, y es descargada dentro del lumen intestinal tras la ingestión de una comida rica en grasa mediante de la contracción de la vesícula biliar inducida por la colecistoquinina. En el lumen del intestino delgado, los ABs actúan como detergentes para solubilizar y facilitar la absorción de las grasas y vitaminas liposolubles de la dieta. Debido a su relativamente bajo valor de pKa, la absorción pasiva de los ABs conjugados es mínima y sus concentraciones intraluminales permanecen elevadas a lo largo del intestino delgado. Los ABs son reabsorbidos de forma activa y muy eficaz por acción de sistemas transportadores específicos en el íleon terminal, como el transportador apical sodio dependiente de ABs (ASBT, gen *SLC10A2*) y el transportador de solutos orgánicos heterodimérico OST α /OST β , localizado basolateralmente. El transporte transcelular entre las dos membranas del ileocito es llevado a cabo por la proteína citosólica intestinal de unión a ABs (IBABP), que está acoplada, en el compartimento citoplasmático, a ASBT (Gong et al., 1994). Los ABs que escapan a la reabsorción y entran en el colon pueden ser convertidos en ABs secundarios,

que pueden ser absorbidos pasivamente para entrar en el “pool” de ABs o eliminados a través de las heces. La mezcla de ABs primarios y secundarios que se reabsorbe en el intestino regresa al hígado a través del sistema portal. Después, los ABs son tomados de la sangre portal por los hepatocitos a través del polipéptido cotransportador de ácido taurocólico (ATC) y Na⁺ (NTCP, gen *SLC10A1*), que tiene una especificidad de sustrato limitada básicamente a los ABs conjugados (Hagenbuch y Dawson, 2004), o por sistemas Na⁺-independientes, representados por miembros de la superfamilia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP, familia *SLCO*). Entre ellos, OATP1A2, OATP1B1 y OATP1B3 presentan una especificidad de sustrato que se solapa para ABs conjugados o sin conjugar (Hagenbuch y Meier, 2004). Tras su captación y, si es necesario, reconjugación, los ABs deben ser transportados al polo canalicular de los hepatocitos para ser secretados de nuevo a la bilis, lo que completa su circulación enterohepática. Los procesos involucrados en el movimiento transcelular de los ABs a través de los hepatocitos todavía están pobremente caracterizados.

En vista del tamaño del “pool” de ABs, las fluctuaciones fisiológicas en el flujo de ABs a través del sistema enterohepático durante el día y el escape relativamente pequeño de ABs de este ciclo, es evidente que los sistemas transportadores implicados deben ser muy eficientes. De hecho, diariamente se pierden solamente unos 50-500 mg de ABs, es decir, menos del 5% del “pool” total, que suele ser de 3-5 g, a pesar de que el ciclo se lleva a cabo unas 6-10 veces al día (3-4 veces por comida). Los ABs que son eliminados son reemplazados mediante la síntesis de nuevas moléculas, que se mantiene inhibida por un mecanismo de retroalimentación negativa, de manera que, si la cantidad de moléculas circulantes disminuye, el hígado aumenta la tasa de síntesis para mantener los niveles normales.

2.2- FARNESOID X RECEPTOR

El “Farnesoid X Receptor” (FXR) pertenece a la superfamilia de receptores nucleares activados por ligando y desempeña funciones importantes en diversos aspectos del metabolismo, tanto en condiciones normales como en el desarrollo de varias enfermedades. Actualmente se conoce la existencia de dos genes de FXR, denominados FXR α y FXR β . El gen FXR α está muy conservado desde los peces hasta el ser humano y es funcional (Maglich et al., 2003), mientras que FXR β , que se ha propuesto como un sensor de lanosterol, se expresa en roedores, conejos y perros, pero es un pseudogen en humanos (Otte et al., 2003). En los siguientes apartados de esta Tesis Doctoral se exponen las principales características estructurales y funcionales de FXR α , al que a partir de aquí se nombrará como FXR.

2.2.1- Clonación y estructura de FXR

FXR fue clonado por primera vez en 1995 mediante el uso de un sistema de doble híbrido en el que se utilizó a RXR α (de “Retinoid X Receptor”, gen *NR2B1*) como cebo

(Seol et al., 1995), ya que éste heterodimeriza con varios receptores nucleares. A partir de una librería de ADNcopia (ADNc) de hígado de ratón se identificaron varias secuencias que codificaban proteínas capaces de interactuar con el dominio de unión a ligando de RXR α , entre las que se encontraron dos isoformas de FXR, entonces denominado RIP14 (de “RXR-Interacting Protein 14”). La isoforma RIP14-1 presentaba una inserción central de 4 aminoácidos (MYTG), mientras que RIP14-2 tenía una extensión N-terminal de 38 aminoácidos. En un estudio posterior se clonó el homólogo de RIP14 a partir de una librería de ADNc de hígado de rata (Forman et al., 1995) y se demostró que el farnesol, un intermediario de la ruta del mevalonato, era capaz de activar esta proteína, por lo que RIP14 fue rebautizado como FXR (de “Farnesoid X Receptor”), aunque para ello se necesitaban concentraciones suprafisiológicas (50 μ M) de este compuesto. Años más tarde, en 1999, varios grupos publicaron trabajos paralelos en los que se “des-orfanizó” a FXR al demostrar que los ABs eran sus ligandos endógenos (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang et al., 1999) y eran capaces de activar este receptor a concentraciones fisiológicas. Finalmente, en otro estudio se clonó el homólogo humano de FXR y se aislaron 4 transcritos que daban lugar a 4 isoformas diferentes de este receptor nuclear (Huber et al., 2002). La existencia de 4 isoformas con características similares a las humanas fue demostrada un año más tarde en ratón (Zhang et al., 2003).

En humanos, el gen que codifica para FXR (*NR1H4*) se localiza en el cromosoma 12q23.1 y se compone de 11 exones y 10 intrones (Figura I-3). A pesar de ser un único gen, codifica 4 transcritos, que se traducen en 4 isoformas distintas, como resultado del “splicing” alternativo del exón 5 y el uso de dos promotores distintos que inician la transcripción desde el exón 1 (promotor 5') o desde el exón 3 (promotor 3').

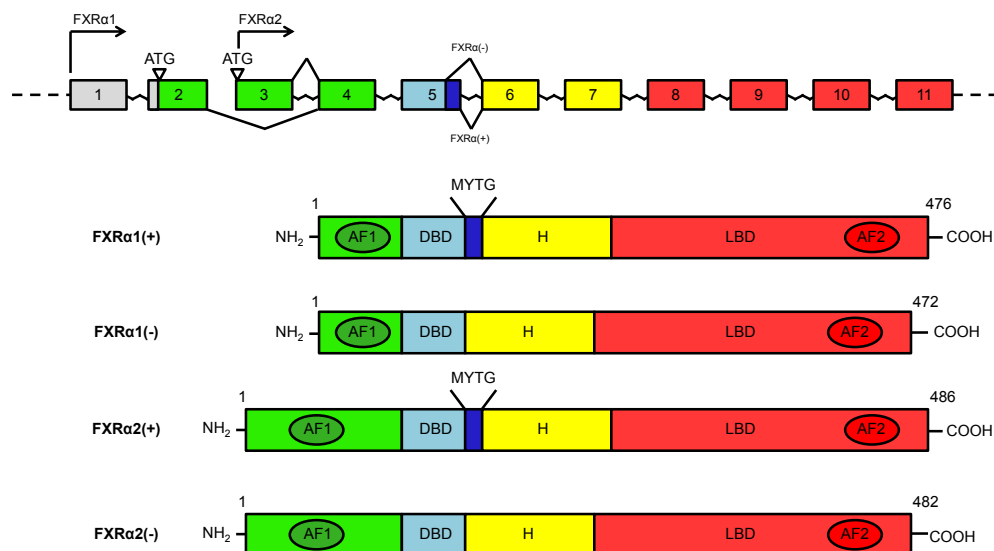


Figura I-3. Estructura y transcritos del gen FXR humano. Se generan 4 isoformas diferentes (FXRa1(+), FXRa1(-), FXRa2(+)) y FXRa2(-)) a partir del gen como consecuencia del “splicing” alternativo del exón 5 y el uso de dos promotores diferentes. Las letras ATG indican la localización de los inicios de traducción. En azul oscuro se indica el inserto MYTG introducido mediante “splicing” alternativo. DBD, dominio de unión a ADN; H, horquilla; LBD, dominio de transactivación independiente (1) y dependiente (2) de ligando. Adaptado de Modica et al., 2010.

Desde su descubrimiento hasta la actualidad, las isoformas de FXR se han clasificado utilizando una nomenclatura inconsistente. Por este motivo, en este texto se denominaran FXR α 1(+), FXR α 1(-), FXR α 2(+) y FXR α 2(-), dependiendo de si su transcripción se inicia desde el exón 1 o el exón 3 (FXR α 1 y FXR α 2, respectivamente), y de la presencia (+) o ausencia (-) de un inserto de 12 pares de bases como resultado del “splicing” alternativo del exón 5, que introduce la secuencia aminoacídica MYTG en la región de la horquilla (Figura I-3). Los exones 4-11 son compartidos por todas las isoformas, sugiriendo que todas ellas se activan de forma no selectiva por los ligandos de FXR (Zhang et al., 2003). Actualmente se sabe poco acerca del papel fisiológico de cada isoforma, aunque se han descrito diferencias en cuanto a la regulación de algunos genes (Anisfeld et al., 2003; Lee et al., 2005).

Las 4 isoformas de FXR comparten la típica estructura modular de otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Figura I-3). Esta estructura incluye el dominio de unión a ADN (DBD, de “DNA binding domain”) en la región N-terminal, y el dominio de unión a ligando (LBD, de “ligand binding domain”) en la región C-terminal. El DBD contiene dos motivos en forma de dedo de zinc implicados en la unión al ADN y en la dimerización con RXR α . Entre el DBD y el LBD se encuentra una región denominada horquilla (H), en la que se localiza el inserto MYTG en las isoformas FXR α 1(+) y FXR α 2(+). La función de la región H es proporcionar la flexibilidad necesaria para que la proteína pueda realizar las interacciones necesarias para la dimerización y la unión al ADN. Los dominios de transactivación independiente (AF-1) y dependiente (AF-2) de ligando se localizan en los extremos N- y C-terminal, respectivamente. Estos dominios (AF-1 y AF-2) se encargan de las interacciones con proteínas co-represoras y co-activadoras necesarias para la regulación de la expresión de los genes diana de FXR.

2.2.2- Patrones de distribución tisular de FXR

FXR es un receptor nuclear expresado predominantemente en el tracto gastrointestinal (Huber et al., 2002), siendo el hígado y el intestino delgado los órganos con mayor expresión, seguidos del colon, esófago y estómago (Lian et al., 2011), que expresan niveles más bajos de este receptor. Sin embargo, también se ha encontrado una expresión elevada de FXR en otros órganos como el riñón o las glándulas adrenales. FXR también se detecta en las células β de los islotes pancreáticos (Popescu et al., 2010), en tejido mamario (Swales et al., 2006), en células endoteliales y musculares lisas de algunos vasos sanguíneos e incluso en células inmunes humanas, como ciertos subconjuntos de linfocitos y monocitos (Schote et al., 2007). Por el contrario, no se ha detectado FXR en órganos como cerebro, corazón, pulmón y músculo esquelético (Huber et al., 2002). La expresión en los tejidos embrionarios parece seguir el mismo patrón que en los tejidos adultos.

Curiosamente, las 4 isoformas de este receptor nuclear se expresan de forma específica en función del tejido. Las isoformas FXR α 1(+)/FXR α 1(-) aparecen predominantemente en el hígado y las glándulas adrenales, mientras que las isoformas FXR α 2(+)/FXR α 2(-) se encuentran altamente expresadas a lo largo del intestino delgado y el colon, así como en

el riñón y el estómago (Huber et al., 2002).

La alteración de la expresión de FXR se ha relacionado con varias condiciones patológicas. Estas alteraciones pueden deberse a cambios en los factores de transcripción que regulan su expresión, en proteínas que regulan su actividad o a mutaciones en la secuencia codificante o en el promotor de FXR. Estos aspectos se tratarán en los apartados correspondientes.

2.2.3- Elementos de respuesta y cofactores de FXR

Al igual que otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, FXR actúa como un factor de transcripción modulado por ligando, cuyo papel es aumentar o disminuir de un modo coordinado la actividad transcripcional de los promotores que regula.

Normalmente FXR se encuentra unido al ADN en forma de heterodímero con RXR α (Figura I-4). En la mayoría de los casos, los elementos de respuesta (FXRE) a los que se une este heterodímero, se componen de dos repeticiones invertidas de 6 nucleótidos separadas por otro nucleótido y con una secuencia consenso AGGTCA, a las que se denomina IR-1 (de "Inverted Repeats") (Chong et al., 2010; Laffitte et al., 2000). Sin embargo, a lo largo de los años se han descubierto genes diana de FXR cuyos promotores contienen FXRE con estructuras muy variadas como IR-0, IR-2, IR-8, DR-1 (de "Direct Repeats"), DR-3, ER-8 (de "Everted Repeats") e incluso se han descubierto elementos de respuesta negativos con una estructura completamente diferente, a la que FXR se une sorprendentemente en forma de monómero, como sucede en el promotor de la ApoA1 humana (Claudel et al., 2002).

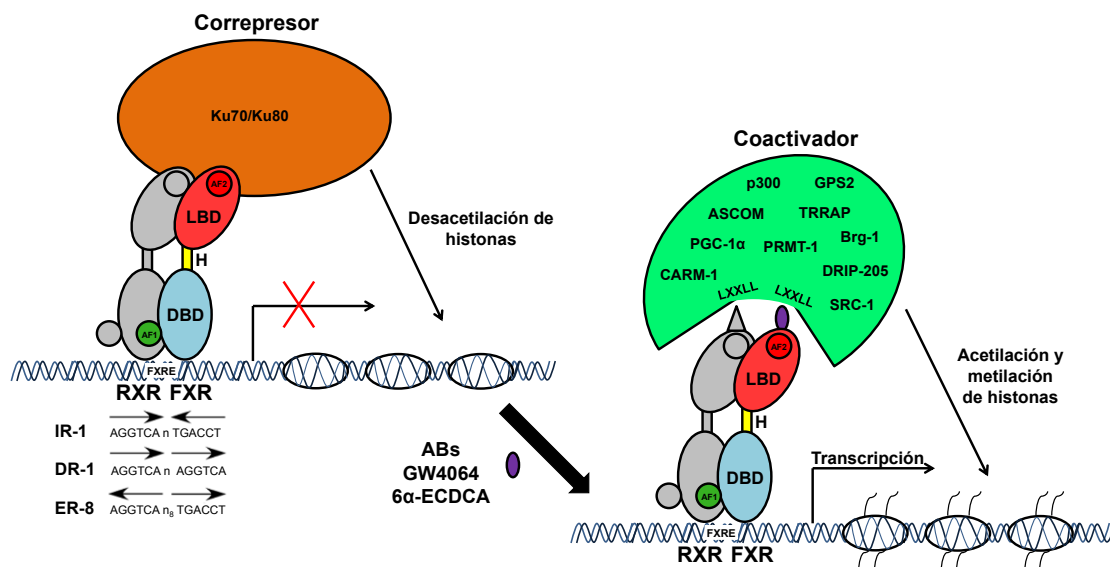


Figura I-4. Esquema de la unión de FXR al ADN de un gen diana y de los cambios provocados por un agonista en cuanto a la unión a cofactores. Se muestra un heterodímero FXR-RXR α unido a un elemento de respuesta (FXRE) que puede tener diferentes estructuras (IR-1, DR-1 o ER-8). La unión de un agonista endógeno (ABs), sintético (GW4064) o semisintético (6 α -ECDCA) determina cambios en la estructura de FXR que conducen a la liberación del complejo correpresor y a la unión a proteínas coactivadoras. La función de los cofactores mostrados en la figura se detalla en el texto. Adaptado de Fiorucci et al., 2007.

En ausencia de ligando, el heterodímero FXR-RXR α se encuentra unido a un FXRE asociado con complejos correpresores, que contienen proteínas con actividad histona desacetilasa que se relaciona con inhibición de la transcripción génica. La unión de un agonista desencadena una serie de cambios conformacionales en FXR que conducen a la liberación de los complejos correpresores y al reclutamiento de proteínas coactivadoras que promueven el inicio de la transcripción de los genes diana (Figura I-4).

En la Tabla I-1 se muestran algunos de los cofactores de FXR descubiertos y sus principales funciones en la regulación de este receptor nuclear.

Tabla I-1. Cofactores transcripcionales de FXR.

Cofactor	Regulación de la señalización de FXR	Referencias
ASCOM	Es un coactivador que aumenta la actividad transcripcional de FXR mediante la tri-metilación de la histona H3 en la lisina 4	(Kim et al., 2009)
Brg-1	Es un coactivador que aumenta la actividad transcripcional de FXR mediante la remodelación de la cromatina en los genes diana	(Miao et al., 2009)
CARM1	Es un coactivador que aumenta la actividad transcripcional de FXR mediante la metilación de la histona H3 en la arginina 17	(Ananthanarayanan et al., 2004)
DRIP205	Es un coactivador de FXR cuya función depende de la heterodimerización con RXR α	(Pineda Torra et al., 2004)
GPS2	Aumenta la actividad transcripcional de FXR facilitando interacciones físicas entre las regiones promotoras y "enhancer" del gen <i>CYP8B1</i>	(Sanyal et al., 2007)
p300	Incrementa la actividad transcripcional de FXR mediante la acetilación de la histona H3 en las lisinas 9/14	(Kemper et al., 2009)
PGC-1 α	Es un coactivador que durante las fases de ayuno incrementa la expresión y la actividad transcripcional de FXR	(Zhang et al., 2004)
PRMT1	Es un coactivador que aumenta la actividad transcripcional de FXR mediante la metilación de la histona H3 en la arginina 3	(Rizzo et al., 2005)
Proteínas Ku	Ku70 y Ku80 son correpresores que actúan interaccionando con el dominio H de FXR disminuyendo su actividad transcripcional	(Ohno et al., 2009)
SIRT1	Disminuye la actividad transcripcional de FXR mediante la desacetilación de la histona H3 en las lisinas 9/14	(Kemper et al., 2009)
SRC-1	Es un coactivador que interacciona con el LBD de FXR y aumenta su actividad transcripcional	(Lew et al., 2004)
TRRAP	Es un coactivador de FXR	(Unno et al., 2005)

Tomado de Kemper, 2011.

2.2.4- Ligandos de FXR

Desde el descubrimiento de los ABs como los auténticos ligandos endógenos de FXR (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang et al., 1999) se ha invertido mucho tiempo y esfuerzo en la búsqueda de nuevos moduladores que activaran o reprimieran la actividad de este receptor nuclear, con el objetivo final de utilizarlos en el tratamiento de los múltiples trastornos en los que está involucrado. La búsqueda actual de ligandos de FXR se basa en tres ejes de investigación (derivados de ABs, extractos naturales y ligandos sintéticos) que se comentarán con más detalle a continuación.

Sin embargo, los datos obtenidos deben ser interpretados con cautela, debido a la gran variedad de modelos experimentales utilizados y/o a la pobre selectividad de algunos de los ligandos identificados, incluidos los ABs, que también son capaces de activar otros receptores nucleares, como VDR (de “Vitamin D Receptor”, gen *NR111*) (Makishima et al., 2002) y PXR (de “Pregnane X Receptor”, gen *NR112*) (Staudinger et al., 2001), y de membrana, como TGR5 (Maruyama et al., 2002). Además, la mayor parte de los ABs producen toxicidad celular significativa a concentraciones por encima de 100 μM , lo que limita su uso como herramientas para el estudio de FXR.

Ácidos biliares y derivados de ácidos biliares

Las propiedades agonistas o antagonistas de los ligandos de un receptor nuclear se evalúan generalmente mediante ensayos de reclutamiento, por parte del LBD del receptor en cuestión, de un péptido derivado del coactivador SRC-1 que contiene un típico motivo LXXLL, en un sistema “in vitro” denominado FRET (de “Fluorescence Energy Transfer Assay”). De esta forma se demostró que el AQDC y sus conjugados con taurina y glicina eran capaces de reclutar un péptido procedente de SRC-1 al LBD de FXR con valores de EC_{50} en torno a 3.5 μM (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999). Los AC, ADC, ALC y sus respectivos conjugados no eran capaces de inducir el reclutamiento del coactivador de forma significativa en concentraciones por debajo de 1000 μM (100 μM para el ADC), pero interferían de forma dosis dependiente en la capacidad del AQDC para inducir la interacción FXR-SRC-1 (Lew et al., 2004; Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Yu et al., 2002), por lo que en este tipo de ensayos actuaban como antagonistas.

Para confirmar los resultados de este modelo de estudio y evaluar la capacidad de los diferentes ABs para activar la expresión génica mediada por FXR, se llevaron a cabo experimentos de transfección. Los estudios iniciales fueron consistentes e indicaron que el AQDC era el activador más potente de FXR ($EC_{50} = 50 \mu\text{M}$), mientras que el ADC y el ALC eran capaces de activar FXR con menor eficacia que el AQDC (Makishima et al., 1999). Los ABs más hidrofílicos, como el AC y el AUDC, no activaban FXR e incluso el AUDC resultó ser un antagonista parcial capaz de inhibir la activación mediada por el AQDC (Campana et al., 2005). Curiosamente, en estos mismos estudios, los conjugados de los AQDC, ADC y ALC, fueron incapaces de activar a FXR, aunque la posterior transfección del transportador ASBT, una proteína que media la captación de ABs conjugados, restauró la capacidad de estos ABs (incluido el AC y sus conjugados) para activar FXR (Wang et al., 1999).

Es importante resaltar que, aparte de estos experimentos en los que se transfectó ASBT y la forma de FXR presente en rata (Wang et al., 1999), no existen evidencias convincentes de que el AC sea un ligando directo de FXR. Sin embargo, el LBD de FXR no está perfectamente conservado entre especies, como demuestra el hecho de que el LBD de la forma de FXR expresada en ratón es mucho más sensible al efecto del AC que la humana (Cui et al., 2002). Esto se refleja en la mayor importancia fisiológica del AC en ratones, que no disponen de AQDC (el activador más potente del FXR humano) porque es convertido en ácidos muricólicos en esta especie.

Por lo tanto, si se analizan todos estos datos en conjunto, no existe una estricta correlación entre la afinidad de los ABs por FXR, su capacidad para promover la interacción de SRC-1 con FXR y su actividad biológica. Esto sugiere que los ensayos de reclutamiento de coactivador no son predictivos de los resultados de los experimentos de actividad transcripcional, probablemente debido a que el resultado transcripcional depende de una multitud de parámetros, incluyendo el proceso de dimerización y las secuencias de unión al ADN (Lew et al., 2004). En base a esto, es posible que el modelo de reclutamiento de coactivadores no sea el más adecuado para investigar los parámetros de activación de los ligandos.

La manipulación química del núcleo esteroide y la cadena lateral de los ABs ha permitido la generación de derivados semisintéticos de ABs, que han proporcionado mucha información en cuanto a la relación estructura-actividad de los ligandos, confirmando, en cierta medida, los estudios cristalográficos sobre la estructura del LBD de FXR.

Por ejemplo, la conversión del grupo carboxilo de la posición C_{24} del AQDC y el AC en un grupo alcohol, genera compuestos con una actividad agonista similar al AQDC (Fujino et al., 2004). Es más, mientras que el AC sólo puede activar FXR en presencia de ASBT, su alcohol derivado es capaz de activar FXR en ausencia del transportador, lo que indica que la modificación del grupo carboxilo en alcohol mejora el transporte por difusión pasiva de los ABs a través de la membrana plasmática.

También se ha comprobado la importancia de los grupos hidroxilo de las posiciones C_3 y C_{12} del núcleo esteroide, demostrando que los epímeros 3β y 12β del ADC y ALC son completamente inactivos en ensayos de transactivación. Del mismo modo, la introducción de un grupo alquil en las posiciones 3β y 12β generaba derivados inactivos (Fujino et al., 2004).

Por otra parte, las moléculas que mantienen una cadena lateral intacta son inactivas, mientras que los ácidos colestanoicos, así como los alcoholes biliares hidroxilados en las posiciones C_{25} y C_{26} son capaces de activar FXR con la misma potencia que el AQDC (Nishimaki-Mogami et al., 2004).

Por último, la modificación del anillo B para mejorar la relación entre las propiedades químicas y la actividad de los ligandos, generó una serie de derivados semisintéticos de ABs que han resultado ser potentes agonistas. En primer lugar se probó el derivado del AQDC metilado en la posición 6α (Pellicciari et al., 2002), que exhibía una potencia 10 veces superior a la molécula original, por lo que, a continuación, se generaron los correspondientes derivados con grupos etilo, propilo y butilo en la misma posición. Entre estos compuestos, el 6α -ECDCA (de "6 α -ethyl-chenodeoxicholic acid", también llamado INT-747) (Figura I-5) fue el más potente en los ensayos de reclutamiento de coactivador, y su actividad en los ensayos transcripcionales fue 3 veces mayor que la del AQDC ($EC_{50} = 99$ nM) (Pellicciari et al., 2002).

Extractos naturales

El guggulípido, un extracto de la resina gomosa de la especie *Commiphora mukul*, es conocido en la medicina tradicional india por sus propiedades hipolipemiantes, consistentes en su capacidad para reducir los niveles séricos de colesterol, LDL y triglicéridos. El principio activo responsable de estos efectos es una mezcla de Z- y E-[4,17(20)-pregnadien-3,16-diona], a la que se denomina guggulsterona (GS) (Figura I-5). Los estudios realizados con la GS han dejado claro que sus efectos metabólicos se deben a su capacidad para modular la actividad de una gran variedad de receptores nucleares (Urizar y Moore, 2003). Ambas formas de GS son capaces de interactuar con varios miembros de la subfamilia de receptores nucleares endocrinos, como el receptor de glucocorticoides (GR), el receptor de mineralocorticoides (MR), el receptor de andrógenos (AR), el receptor de progesterona (PR) y el receptor de estrógenos α (ER α) (Burriss et al., 2005), así como con varios miembros adoptados de la subfamilia de receptores nucleares huérfanos, como PXR (Brobst et al., 2004) y FXR (Cui et al., 2003; Urizar et al., 2002; Wu et al., 2002). En cuanto a FXR, la GS ha demostrado ejercer efectos variados y, en ocasiones, contradictorios sobre este receptor nuclear. Por una parte parece interferir con la actividad agonista del AQDC sobre varios genes diana de FXR, como por ejemplo SHP (de "Small Heterodimer Partner", gen *NR0B2*), en experimentos de transfección. Estas propiedades antagonistas se confirmaron después mediante ensayos de unión a coactivadores, en los que la GS era incapaz de reclutar el coactivador SRC-1 (Urizar et al., 2002; Wu et al., 2002). Sin embargo, los mismos estudios demostraron que este compuesto era capaz de aumentar la activación que ejercían el AQDC y el GW4064 sobre el promotor de BSEP (Cui et al., 2003). Por tanto, a pesar de su relativa falta de selectividad, la GS representa un buen ejemplo de modulador gen-específico de FXR. A la hora de explicar estos efectos se ha hipotetizado acerca de la existencia de un sitio específico de acoplamiento para la GS en el LBD de FXR, pero esta idea no ha sido respaldada todavía por experimentos mutacionales y de cristalografía (Meyer et al., 2005).

Existen otros extractos naturales que contienen moduladores de la actividad de FXR. El cafestol, un diterpeno aislado a partir de una infusión de café sin filtrar, presenta actividad agonista sobre FXR y PXR en experimentos realizados en líneas celulares hepáticas. Sorprendentemente, en los experimentos "in vivo" el cafestol era incapaz de activar los genes diana hepáticos de Fxr, pero sí el Fgf15 (ortólogo en roedores de FGF19, de "Fibroblast Growth Factor 19") intestinal (Ricketts et al., 2007), lo que podría deberse a su baja biodisponibilidad o a su rápido metabolismo hepático. El estigmasterol, un fitosterol derivado de la soja, es capaz de interferir la inducción de genes diana de FXR en células HepG2 (Carter et al., 2007). Por último, se cree que un derivado del lúpulo de cerveza, denominado "xanthohumol", también posee capacidad para modular la actividad de FXR, ya que es capaz de disminuir los niveles séricos y hepáticos de triglicéridos en modelos animales de diabetes, y de inducir la expresión de BSEP en células de hepatoma (Nozawa, 2005).

Compuestos sintéticos

Puesto que los ligandos naturales de FXR, como los ABs, no muestran una fuerte selectividad por este receptor nuclear, los estudios se han dirigido hacia el desarrollo de moléculas sintéticas con alta afinidad y selectividad por este receptor nuclear.

El primer compuesto que cobró importancia a este respecto fue el TTNPB, un retinoide sintético con baja afinidad por FXR, pero que mostró activación en experimentos de reclutamiento de coactivadores (Parks et al., 1999; Zavacki et al., 1997). A partir de la estructura del TTNPB se sintetizaron una serie de derivados del estilbeno (Love et al., 2002; Maloney et al., 2000), de entre los cuales el compuesto denominado GW9047 mostró una buena selectividad, pero una baja afinidad por FXR. Tras una serie de modificaciones en la estructura del GW9047 se desarrolló el GW4064 (Figura I-5), un compuesto con alta selectividad y una potente capacidad activadora de FXR ($EC_{50} = 90$ nM) que, hoy en día, sigue siendo el compuesto de referencia para estudios sobre la actividad de FXR. Sin embargo, este compuesto exhibe una biodisponibilidad muy limitada, lo que impide su uso en estudios clínicos.

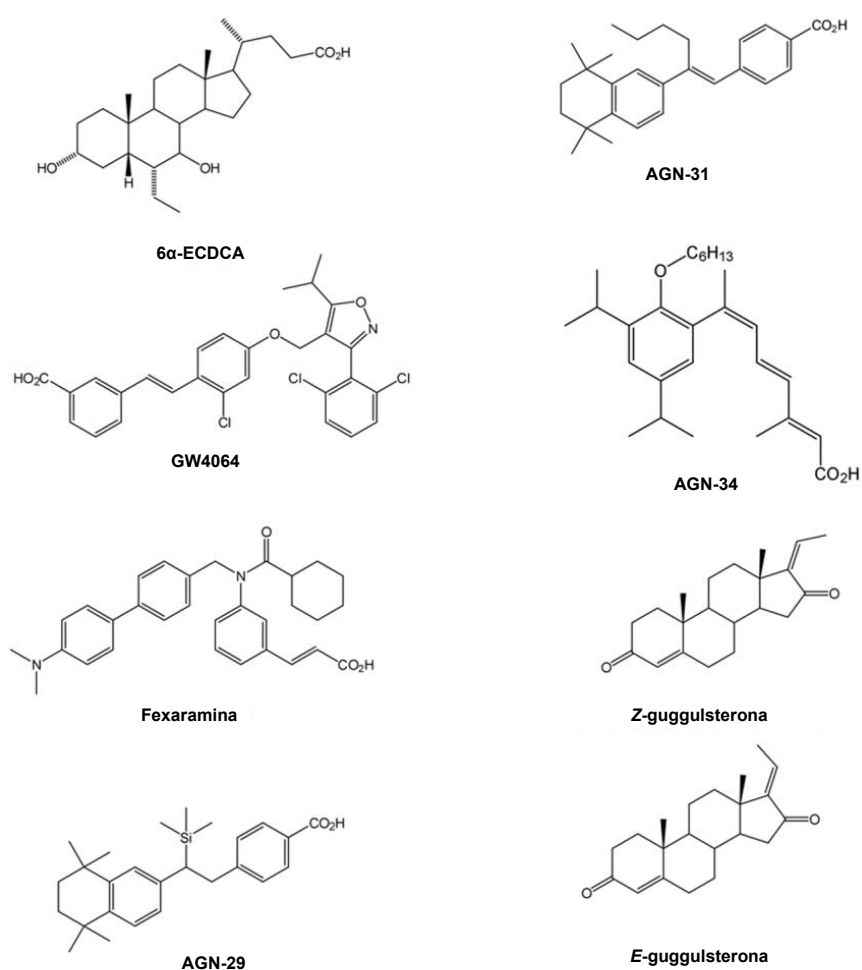


Figura I-5. Ligandos de FXR. Se muestran algunos ejemplos de ligandos semisintéticos (6α-ECDCA), sintéticos (GW4064, fexaramina, AGN-29, AGN-31 y AGN-34) y naturales (Z-guggulsterona y E-guggulsterona). Tomado de Modica et al., 2010.

Utilizando también como base el TTNPB y modificando su estructura para mejorar su selectividad por FXR y evitar la unión al receptor de ácido retinoico (RAR), se obtuvieron tres compuestos denominados AGN-29, AGN-31 y AGN-34 (Figura I-5) (Dussault et al., 2003). Los compuestos AGN-29 y AGN-31 resultaron ser eficientes agonistas de FXR y RXR α , con un valor de EC₅₀ en torno a 1 μ M, mientras que el compuesto AGN-34 mostró actividad antagonista para ambos receptores nucleares.

Otros estudios utilizaron la estructura del benzopirano como punto de partida para generar agonistas de FXR. Entre estos compuestos, la fexamina (Figura I-5) y la fexarina destacaron como potentes y altamente selectivos agonistas de FXR, con valores de EC₅₀ de 38 y 36 nM, respectivamente (Downes et al., 2003).

Curiosamente, un estudio realizado en cultivos primarios de hepatocitos humanos, mostró que el AQDC, el GW4064 y la fexamina activaban genes diana de FXR de forma diferente (Downes et al., 2003), sugiriendo que estos agonistas podían actuar como modulares selectivos de la actividad de FXR, es decir, que cada uno de ellos era capaz de activar o inhibir un grupo diferente de genes diana de FXR. Una posible explicación para este fenómeno es que los diferentes ligandos podrían posicionarse de forma diferente en el bolsillo hidrofóbico del LBD o la existencia de una regulación alostérica de la capacidad de unirse al ligando mediada por RXR α . De hecho, el GW4064 requiere la presencia de RXR α para exhibir su máxima eficacia en ensayos transcripcionales. Sin embargo, la capacidad de los hepatocitos para producir ABs a tasas nada despreciables supone una importante dificultad a la hora de comparar los efectos de estos ligandos en este tipo de modelos celulares. Por tanto, es importante dilucidar la naturaleza de este fenómeno con profundidad antes de explotarlo en la práctica médica, para evitar posibles efectos secundarios.

Por último, los esteres 1,1-bifosfonato mostraron capacidad agonista sobre FXR, con efectos hipocolesterolémicos y antiproliferativos (Niesor et al., 2001).

Propiedades de unión a ligandos de FXR

El LBD de FXR contiene un bolsillo hidrofóbico capaz de acomodar moléculas lipofílicas. Experimentos de cristalización con el LBD de FXR de rata y humano unido a varios ligandos (dos derivados de AQDC y el ligando sintético fexamina) (Downes et al., 2003; Mi et al., 2003) han demostrado que los aminoácidos involucrados en la unión al ligando están conservados entre estas especies. Estos estudios también demostraron que, además de la típica conformación en forma de un haz de 12 hélices α que muestran los LBD de otros receptores nucleares, el LBD de FXR presenta características peculiares. Al igual que en otros receptores, tras la unión a un ligando, el LBD de FXR actúa como un interruptor molecular, promoviendo cambios conformacionales que resultan en el reclutamiento de coactivadores mediante la formación de una abrazadera de carga y un surco hidrofóbico, que interactúan con los motivos LXXLL de las proteínas coactivadoras (Downes et al., 2003; Mi et al., 2003). Sin embargo, a diferencia de los receptores nucleares de otros esteroides, el LBD de FXR acomoda el núcleo esteroide de sus ligandos en una

orientación inversa. Además, se ha encontrado un segundo sitio de acoplamiento para motivos LXXLL (Mi et al., 2003), por lo que un coactivador con un único motivo LXXLL se unirá al LBD de FXR con baja afinidad, mientras que los coactivadores que tengan dos o más motivos de este tipo mostraran más afinidad por FXR. Los estudios estructurales y físicos realizados sobre el complejo FXR-coactivador muestran que el LBD de FXR se une a dos motivos LXXLL de una forma antiparalela, con uno localizado en el surco hidrofóbico y asegurado por la abrazadera de carga, mientras que el segundo sitio de unión carece de esta abrazadera y está localizado en la hélice 3. Al comparar las formas de FXR expresadas en el ser humano y en ratón, se identificaron los aminoácidos responsables de la diferente respuesta de ambos receptores al AQDC. Se identificaron dos residuos, la asparagina 354 y la isoleucina 372, como los responsables de la alta sensibilidad de la forma humana al AQDC, y la mutación de los correspondientes aminoácidos del FXR de ratón consiguió “humanizar” este receptor (Cui et al., 2002).

Si nos centramos en los ABs, estas moléculas anfipáticas poseen una estructura única caracterizada por una cara cóncava hidrofílica (cara α) y una cara convexa hidrofóbica (cara β). En este caso particular, el bolsillo hidrofóbico del LBD de FXR interacciona con los ABs principalmente a través de la cara β , por lo que la inclusión de un sustituyente abultado en este lado suele tener un impacto perjudicial sobre la actividad de este receptor (Fujino et al., 2004). La cara α contiene grupos hidroxilo en las posiciones C_3 , C_7 y/o C_{12} , que tienen un fuerte impacto en la capacidad para activar FXR (Fujino et al., 2004). Para la óptima activación de FXR, es necesario el correcto posicionamiento de la hélice 3 frente a la hélice 12, para generar el surco de acoplamiento para el dominio LXXLL. El grupo 7α -hidroxilo confiere al AQDC y ligandos sintéticos, como la fexaramina y el 6α -ECDCA, capacidad para activar a FXR mediante la inducción de una interacción estable entre ambas hélices, que da como resultado una potente actividad agonista. Sin embargo, la ausencia de este grupo hidroxilo en el ADC y en el ALC, compromete el reclutamiento estable de los coactivadores, resultando en una actividad agonista parcial. En el caso del grupo 12α -hidroxilo, el LBD de FXR no puede acomodar este grupo funcional, lo que explica la menor afinidad del AC y el ADC por FXR. El bolsillo hidrofóbico del LBD contiene una serie de cavidades hidrofóbicas que pueden ser explotadas para generar nuevos contactos e incrementar la afinidad de los ligandos por FXR. Éste es el motivo de la mayor afinidad de los derivados del AQDC con grupos alquilo en la posición 6α , como el 6α -ECDCA. Por último, el extremo carboxílico de los ABs está orientado hacia la entrada del bolsillo hidrofóbico, lo que explica por qué la conjugación de estas moléculas no impide una unión de alta afinidad y permite la activación de FXR por estos compuestos. Sin embargo, variaciones estructurales introducidas en el extremo carboxilo de los ABs pueden producir variaciones sustanciales de la actividad de FXR (Pellicciari et al., 2006).

2.2.5- Modificaciones postraduccionales de FXR

Las modificaciones postraduccionales, como la acetilación o la fosforilación, también juegan un papel importante en la regulación de la actividad transcripcional de FXR, tanto

a nivel del reclutamiento de los distintos cofactores necesarios para la regulación de la transcripción de sus genes diana, como en la degradación del propio FXR.

En los últimos años, se ha demostrado que la acetilación de FXR está regulada de forma dinámica por la acetilasa p300 y la desacetilasa SIRT1, en respuesta a la señalización de los ABs y a los ciclos de ayuno/alimentación en ratones (Kemper et al., 2009). En concreto, las lisinas 157 (localizada en el DBD) y 213 (localizada en la región H) son sitios confirmados de acetilación de FXR (Figura I-6). Como se explicó en el apartado 2.2.1, la región de la horquilla está implicada en la dimerización y en la unión al ADN, de forma que la acetilación de FXR en la lisina 213 inhibe la dimerización con RXR α y la unión de los heterodímeros a la cromatina. Los estudios funcionales llevados a cabo apoyan este hecho, ya que la acetilación de FXR, especialmente en la lisina 213, provoca una disminución de la actividad transactivadora de este receptor nuclear. En respuesta a un estímulo activador, la interacción de FXR con p300 aumenta, mientras que la interacción con SIRT1 disminuye, lo que puede parecer paradójico, ya que, la acumulación de la acetilasa p300 en los sitios de transcripción, y la consecuente acetilación de la histona H3, está relacionada con un aumento de la transcripción de los genes diana. Sin embargo, se ha propuesto que la unión a p300 puede suponer un importante mecanismo de terminación de la respuesta transcripcional de FXR a un estímulo, lo cual es esencial en un sistema regulado dinámicamente para mantener la homeostasis. Del mismo modo, hay que destacar la importancia de un correcto funcionamiento del ciclo acetilación/desacetilación de este receptor nuclear, como demuestran varios modelos de ratón (ratones alimentados con una dieta rica en grasas, ratones ob/ob y ratones knock-out para la SIRT1 hepática) en los que la acetilación de FXR se ve incrementada, mientras que la heterodimerización con RXR α y su unión al ADN se ve disminuida, provocando múltiples anomalías metabólicas derivadas de la falta de actividad de FXR (Kemper et al., 2009).

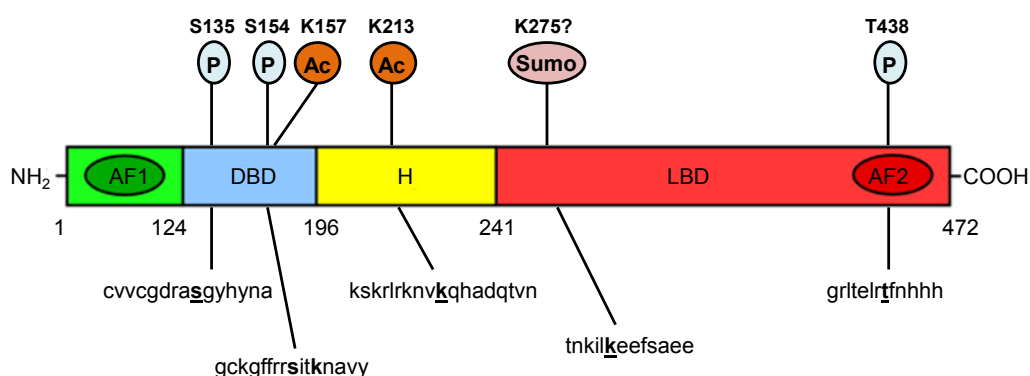


Figura I-6. Modificaciones postraduccionales de FXR. En la parte superior de la figura se muestran los sitios de acetilación (Ac), fosforilación (P) y sumoilación (Sumo) en la isoforma FXR α 1(-). En la parte inferior se muestran las secuencias diana de estas modificaciones postraduccionales, con los aminoácidos modificados subrayados y en negrita. Adaptado de Kemper, 2011.

La fosforilación es otra de las modificaciones postraduccionales descritas para FXR (Figura I-6), concretamente en las serinas 135 y 154 del DBD (Gineste et al., 2008) y en la treonina 438 del LBD (Frankenberg et al., 2008). La fosforilación de las serinas por quinasas dependientes de calcio de tipo PKC promueve la interacción de FXR con el coactivador PGC-1 α e incrementa su actividad transactivadora. En el caso de la treonina 438, es la proteína de membrana FIC1 (de "Familial Intrahepatic Cholestasis 1", gen *ATP8B1*) la que activa la ruta de señalización de PKC zeta que, a su vez, fosforila este residuo, aumentando también la actividad transactivadora y la localización nuclear de FXR. Esta conexión entre FIC1 y FXR a través de la PKC es importante en la homeostasis de los ABs, como demuestra el hecho de que, la presencia de mutaciones en el gen que codifica FIC1, conduce a una variedad de enfermedades hepáticas en las que algunos de los síntomas podrían deberse a una falta de funcionalidad de FXR (Alvarez et al., 2004).

Además de los procesos de acetilación y fosforilación, existen otros mecanismos postraduccionales que podrían regular la actividad de FXR. Aunque se sabe poco acerca de los sitios de ubiquitinización de FXR, se ha demostrado que la inhibición de la actividad del proteosoma conduce a un incremento de los niveles proteicos de FXR (Kemper et al., 2009), por lo que la degradación en este complejo de proteasas está probablemente involucrada en su reciclaje. Además, se ha descrito recientemente un posible sitio de sumoilación, localizado en la lisina 275 del DBD, que podría estar implicado en la regulación de la respuesta inmune innata en el intestino (Figura I-6) (Vavassori et al., 2009).

2.2.6- Variabilidad genética de FXR

La escasez de polimorfismos en el gen *NR1H4* indica su importancia y su elevada conservación evolutiva. Hasta el momento, se han encontrado algunos polimorfismos de un único nucleótido (SNP, de "Single Nucleotide Polimorfism"), como los dos SNPs localizados en el exón 6 (C643T y G646T), a nivel de la región H, o los dos SNPs localizados en los exones 7 (C783T) y 11 (C1341T), pero la frecuencia de estas mutaciones es muy baja (Marzolini et al., 2007). Otras cuatro variantes se han relacionado con la colestasis intrahepática gestacional y en tres de ellas (G-1T, A1G y T518C) se han encontrado defectos en la traducción o en la actividad de la proteína (Van Mil et al., 2007).

Sin embargo, el polimorfismo G-1T, localizado en la secuencia Kozak previa al codón de inicio de la traducción del exón 3, es relativamente frecuente (del 2.5 al 12.1%) en poblaciones europeas, africanas, chinas e hispano-americanas (Marzolini et al., 2007). Aunque la presencia de este SNP provoca una disminución en la actividad transactivadora de FXR, no está claro si este efecto se debe a una disminución de la tasa de transcripción/traducción del receptor nuclear o a la formación de una variante proteica de baja actividad. Además, el efecto de esta mutación en la actividad de FXR parece ser dependiente del gen diana, ya que los individuos portadores de este SNP muestran una disminución de la expresión hepática de SHP, pero no de BSEP. Aun así, las consecuencias fisiológicas de la presencia de esta mutación para los individuos portadores siguen sin estar del todo claras.

2.3- REGULACIÓN DEL METABOLISMO Y EL TRANSPORTE DE ÁCIDOS BILIARES MEDIADA POR FXR

Como se describió en el apartado 2.1, la biosíntesis hepática y el transporte hepato-intestinal de ABs deben ser regulados de forma coordinada para mantener constante el tamaño del “pool” de ABs. Los procesos biosintéticos y transportadores implicados en el circuito enterohepático se regulan a través de complejas redes transcripcionales en las que FXR juega un papel central.

Los propios ABs son capaces de reprimir su síntesis mediante un mecanismo en el que el FXR hepático e intestinal funcionan de manera sinérgica. Como se mencionó en el apartado 2.1.1, la reacción catalizada por la enzima CYP7A1 es la etapa limitante de este proceso biosintético (Russell, 2003). La regulación de la expresión de esta enzima es compleja, ya que en ella intervienen varios receptores nucleares, entre los que se encuentran LRH-1 y HNF4 α , que se unen a secuencias reguladoras en el gen *CYP7A1* y activan su expresión. La represión de *CYP7A1* mediada por FXR tiene lugar a través de una regulación directa del gen SHP por FXR (Figura I-7). SHP es un peculiar receptor nuclear desprovisto de DBD, que ejerce una actividad represora tras dimerizar con varios receptores nucleares, entre los que se incluyen LRH-1 y HNF4 α (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000). Esto sucede a través de varios mecanismos, que pueden implicar el reclutamiento de un complejo Sin3A/Swi-Snf al promotor de *CYP7A1* (Bavner et al., 2005; Kemper et al., 2004). Sin embargo, en ratones “knock-out” para SHP, los ABs siguen siendo capaces de reprimir la expresión de CYP7A1, lo que indica la existencia de otro mecanismo independiente de SHP implicado en la represión de esta enzima. Aquí es donde entra en juego el FXR expresado en el intestino delgado que, tras ser activado por los ABs absorbidos en el íleon, induce la expresión de FGF19. Esta hormona es secretada a la circulación portal y alcanza el hígado, donde se une a su receptor de membrana, el FGFR4 (de “Fibroblast Growth Factor Receptor 4”) y reprime la expresión de CYP7A1 a través de una ruta dependiente de quinasas (Inagaki et al., 2005). Este mecanismo constituye una ruta de interacción entre el hígado y el intestino para la regulación de la síntesis de ABs. La utilización de ratones “knock-out” específicos de tejido ha permitido analizar la contribución relativa de cada órgano a la represión de *CYP7A1* y parece ser que el FXR intestinal tiene un papel más determinante (Kim et al., 2007a).

Del mismo modo, se ha descrito una regulación similar para la enzima CYP8B1, que regula la proporción de síntesis AC:AQDC en la vía clásica (Kim et al., 2007a; Zhang y Chiang, 2001).

Además de la síntesis “de novo”, FXR también controla los procesos de conjugación de los ABs antes de que estos sean secretados a la bilis. Como se ha explicado en el apartado 2.1.2, la reacción de amidación requiere la activación inicial de los ABs por BACS para que puedan ser sustratos de BAAT, que los conjuga con glicina o taurina. La expresión de ambas enzimas es inducida mediante la unión de FXR a sus promotores (Pircher et al., 2003) (Figura I-7).

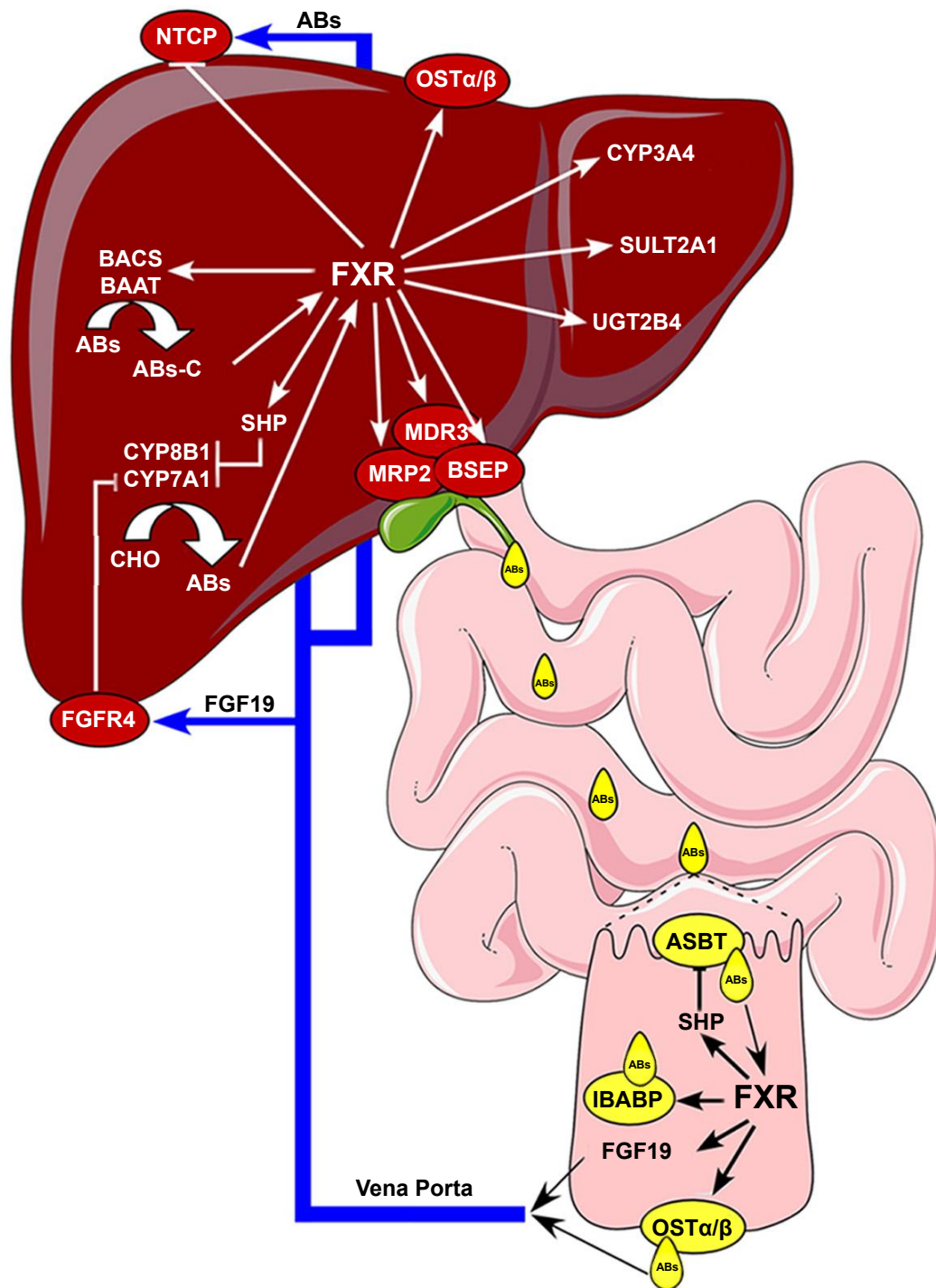


Figura I-7. Regulación del metabolismo de ácidos biliares (ABs) por FXR. Los ABs que recirculan en el sistema enterohepático activan FXR a nivel hepático e intestinal para regular la expresión de genes involucrados en su metabolismo. En el hígado, FXR reprime la síntesis de ABs mediante la inhibición de la expresión de CYP7A1 y CYP8B1 a través de SHP, y promueve la conjugación de ABs (ABs-C) mediante la inducción de BACS y BAAT. Además, FXR controla la entrada de ABs mediante la inhibición de NTCP y su secreción al intestino delgado mediante la inducción de la expresión de BSEP, MRP2 y MDR3. En el intestino delgado, la activación de FXR inhibe la expresión de ASBT a través de SHP y activa la de IBABP y OSTα/β. Además, induce la expresión de la hormona FGF19, que es secretada a la circulación portal y señala en el hígado a través de FGFR4 para reprimir la expresión de CYP7A1. En situaciones en las que los ABs se acumulan a concentraciones tóxicas, FXR induce la expresión hepática de OSTα/β para permitir la eliminación de los ABs por la orina. Además FXR induce la expresión de enzimas de fase I (CYP3A4) y fase II (SULT2A1 y UGT2B4) para transformar los ABs en moléculas más hidrofílicas y menos tóxicas que sean más eficientemente excretables. CHO, colesterol. Tomado de Modica et al., 2010.

Una vez conjugados, los ABs son secretados activamente a los canalículos biliares mediante BSEP y MRP2, ambas inducidas a nivel transcripcional por FXR (Ananthanarayanan et al., 2001; Kast et al., 2002). Del mismo modo, la expresión de MDR3, implicada en la secreción biliar de fosfatidilcolina, también es inducida por FXR (Huang et al., 2003) (Figura I-7). La regulación de estos transportadores de la familia ABC es muy importante para evitar la acumulación de ABs en el hígado y el consecuente daño hepático. De hecho, las mutaciones en BSEP o MDR3 son responsables de los síndromes PFIC (de “Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis”) de tipo 2 (Strautnieks et al., 1998) y de tipo 3 (de Vree et al., 1998), respectivamente.

En situación postprandial, los ABs son secretados desde la vesícula biliar al lumen intestinal para ayudar a la digestión y absorción de los nutrientes lipídicos. La entrada a los enterocitos se produce a través de ASBT, localizada en la membrana apical de los mismos. Después, IBABP los transporta hacia la membrana basolateral para que sean secretados a la sangre portal por el heterodímero OST α/β (Figura I-7). Todo este proceso de transporte a través de las células intestinales también está orquestado por FXR. Una vez activado, FXR reprime la expresión de ASBT a través de SHP (Neimark et al., 2004), mientras que activa la expresión de IBABP (Grober et al., 1999) y OST α/β (Landrier et al., 2006) de forma directa mediante la unión a sus promotores.

Los ABs transportados desde el ileocito a la sangre portal regresan al hígado, donde son captados por NTCP, para completar la circulación enterohepática. FXR también inhibe la expresión de NTCP, mediante un mecanismo específico de especie y que puede involucrar a SHP (Denson et al., 2001).

A pesar de sus efectos beneficiosos en la solubilización de los nutrientes lipídicos gracias a sus propiedades detergentes, la acumulación de altos niveles de ABs, especialmente secundarios, puede ser perjudicial, por lo que el metabolismo de estas moléculas debe ser estrechamente regulado. Por eso, FXR no sólo controla su síntesis y transporte, sino también su metabolismo y aclaramiento en condiciones patológicas, como por ejemplo en colestasis.

El proceso de biotransformación de ABs se desarrolla en dos fases que tienen lugar principalmente en el hígado y que implican reacciones de oxidación de fase I, que generan productos más polares, y enzimas de fase II responsables de la conjugación de los productos de fase I con moléculas endógenas para incrementar la solubilidad en agua de estos compuestos. Estas moléculas conjugadas, mucho más hidrofílicas, no pueden salir del hígado por difusión pasiva, por lo que se necesitan sistemas de secreción activa de fase III.

La enzima hepática implicada en reacciones de fase I más importante es la CYP3A4, que cataliza la hidroxilación de ABs en diferentes posiciones, dando lugar a ABs 3-oxo-, 1 β -, 6 α - y 22-hidroxi (Araya y Wikvall, 1999; Bodin et al., 2005). La activación de FXR por sus ligandos es capaz de inducir la expresión de esta enzima (Gnerre et al., 2004).

En el caso de las reacciones de fase II hay dos enzimas implicadas, cuya expresión también es inducida de forma directa por FXR. La enzima SULT2A1 (Song et al., 2001) lleva a cabo reacciones de sulfatación dando lugar a ABs 3 α -sulfatados, mientras que la UGT2B4 (Barbier et al., 2003) lleva a cabo reacciones de glucuronidación de ABs 6 α -hidroxilados.

En situaciones patológicas, como la colestasis, en las que la secreción de los ABs a bilis se encuentra interrumpida, el transporte de las moléculas derivadas de los procesos de fase I y II se lleva a cabo a través de las proteínas OST α/β , MRP3 y MRP4, que transportan los ABs y sus derivados a la circulación sistémica para que sean eliminados por la orina (Dawson et al., 2005). En condiciones normales, FXR induce la expresión canalicular de BSEP y MRP2, pero cuando los ABs se acumulan en el hígado a niveles tóxicos también induce la expresión basolateral de OST α/β .

2.4- ASPECTOS PATOFISIOLÓGICOS DE FXR

2.4.1- Colestasis

La colestasis es una condición patológica caracterizada por una reducción o ausencia del flujo biliar, que puede deberse a defectos funcionales en el proceso de formación de la bilis a nivel de los hepatocitos o colangiocitos (colestasis intrahepática) o a obstrucciones del flujo biliar a nivel de los conductos biliares (colestasis extrahepática), normalmente mecánicas y debidas a cálculos biliares o a tumores. La principal consecuencia de la alteración del flujo biliar es la acumulación de constituyentes de la bilis potencialmente tóxicos, la cual conduce a un proceso de inflamación y fibrosis hepática que puede desembocar en cirrosis, cáncer y, en último término, fallo hepático.

Independientemente de la etiología de la colestasis, la acumulación de ABs hidrofóbicos en el hígado juega un papel importante en el daño hepático asociado a esta patología. En el caso de las colestasis obstructivas la cirugía es una terapia efectiva, pero en las colestasis no obstructivas el único tratamiento farmacológico reconocido es el uso de AUDC (Paumgartner y Beuers, 2002), un AB polar que reduce la hidrofobicidad y toxicidad del “pool” de ABs, aunque es poco efectivo, en especial en los casos de colestasis derivadas de defectos genéticos (Goulis et al., 1999; Paumgartner y Beuers, 2002). Esta escasez de tratamientos eficaces ha hecho que las terapias se dirijan a la búsqueda de fármacos que reduzcan tanto la hidrofobicidad como el tamaño del “pool” de ABs. Por todo ello, la identificación de FXR como regulador central del metabolismo de ABs ha hecho de este receptor nuclear una posible diana terapéutica para el manejo de esta patología.

A nivel hepático, la activación de FXR durante un proceso colestático reduciría la síntesis de ABs mediante la represión directa de CYP7A1 y CYP8B1, e indirecta mediante la vía FGF19-FGFR4, disminuiría la captación de ABs mediante la represión de NTCP e incrementaría la secreción de ABs a la bilis, induciendo las bombas MDR3 y BSEP, por lo que el resultado final sería una acumulación hepática mucho menor de estos compuestos. En las formas de colestasis en las que la actividad de BSEP y MDR3 está comprometida

(PFIC2 y PFIC3, respectivamente), o en situaciones de obstrucción de la vía biliar, los ABs serían expulsados del hígado a nivel basolateral a través de otros transportadores inducidos por FXR, como OST α/β . Además, FXR activaría las reacciones de fase I y fase II mencionadas anteriormente (Figura I-7) para hacer a los ABs más hidrofílicos y posibilitar su eliminación a nivel renal.

Sin embargo, la complejidad del proceso de formación biliar y la variedad etiológica de las colestasis, sumadas al hecho de que existen otros receptores nucleares como PXR, VDR y CAR (de “Constitutive Androstane Receptor”, gen *NR1I3*), implicados en las reacciones compensatorias (Zollner et al., 2006), hace que el uso de agonistas de FXR no sea una panacea. De hecho, los estudios realizados hasta ahora demuestran que, tanto la activación como la inhibición de FXR, pueden ser beneficiosas. Por una parte, el tratamiento con GW4064 y 6 α -ECDCA ha mostrado ser eficaz en modelos de colestasis intrahepática y extrahepática en rata (Fiorucci et al., 2005; Liu et al., 2003). El mecanismo de protección en estos casos se ha asociado a la reducción de la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de ABs, fundamentalmente Cyp7a1, y a la regulación de genes implicados en el transporte hepatobiliar como Ntcp, Bsep, Mrp2, etc. Por otra parte, se ha observado que los ratones “knock-out” para Fxr están más protegidos que los silvestres frente al daño hepático causado por la colestasis derivada de la ligadura del conducto biliar (Marschall et al., 2006; Stedman et al., 2006). Estos ratones se adaptan a la ligadura mediante la sobreexpresión de Mrp4, lo que sugiere un posible papel de Fxr en la represión de este transportador basolateral. La inducción de la expresión de Mrp4 representa un importante mecanismo adaptativo frente a la colestasis, ya que permite proteger al hígado de la acumulación de ABs mediante el eflujo de estos compuestos a la circulación sistémica para su eliminación renal. Por tanto, la inhibición de FXR a nivel hepático puede representar un mecanismo adaptativo importante frente a la colestasis.

En este sentido, es importante recordar el papel intestinal en la represión de la síntesis hepática de ABs, ya que la terapia más adecuada sería un agonista selectivo capaz de activar FXR únicamente a nivel intestinal, lo que motivaría que la síntesis de ABs se inhibiera y se redujera el tamaño del “pool” de ABs, mientras que la respuesta adaptativa a nivel hepático pudiera seguir su curso normal.

2.4.2- Colelitiasis

La correcta proporción de ABs, colesterol y fosfolípidos en bilis es crucial para mantener el colesterol en solución y prevenir la precipitación de cristales del mismo, el primer paso en la formación de cálculos biliares (Lo Sasso et al., 2008; Portincasa et al., 2006). Una mayor proporción de ABs y fosfolípidos en la bilis protege frente a la aparición de cálculos, mientras que una proporción elevada de colesterol predispone a la aparición de colestiasis, por lo que se ha sugerido un posible papel protector de FXR frente a esta patología.

De hecho, los ratones “knock-out” para Fxr son más susceptibles a la formación de

cálculos que los ratones silvestres cuando son alimentados con una dieta litogénica, y esto es consecuencia de la menor proporción de ABs y fosfolípidos en la bilis de estos animales (Moschetta et al., 2004). A nivel molecular, presentan una reducción de la expresión de Bsep y Mdr2, mientras que los transportadores biliares de colesterol no sufren cambios. Además, el tratamiento con GW4064 induce la expresión de Bsep y Mdr2, desequilibrando la balanza en favor de los ABs y los fosfolípidos, reduciendo el índice de saturación del colesterol de la bilis y, por tanto, protegiendo a estos animales de la formación de cálculos frente a los ratones tratados con el vehículo (Moschetta et al., 2004). Por todo ello, la utilización de agonistas de FXR puede ser beneficiosa para la prevención y tratamiento de la colelitiasis.

Sin embargo, como en el caso de la colestasis, la activación de FXR también tiene un lado negativo y es que inhibe la expresión de Cyp7a1, disminuyendo la síntesis de ABs y, en consecuencia, reduciendo el tamaño del “pool” de ABs, el factor más importante para la secreción de los mismos a la bilis. Este efecto negativo predispondría a la formación de cálculos biliares por la disminución de la cantidad de ABs respecto a la de colesterol. Por ello, la adición de un suplemento de AC a la dieta litogénica sería beneficioso al compensar la inhibición de la Cyp7a1 y mantener el tamaño del “pool” de ABs y los efectos beneficiosos del tratamiento con GW4064 (Moschetta et al., 2004).

En el caso de los pacientes con colelitiasis, estos sujetos pueden ser tratados con agonistas de FXR conjuntamente con ABs hidrofílicos, como el AUDC, induciendo así la secreción de ABs y fosfolípidos a la bilis, pero manteniendo constante el tamaño y disminuyendo la hidrofobicidad del “pool”.

2.4.3- Enfermedades intestinales

Los niveles de ABs en la luz intestinal también deben estar estrechamente regulados. Una reducción en la concentración intestinal de ABs puede llevar a un sobrecrecimiento de las bacterias intestinales y su translocación a través de la mucosa, pudiendo provocar una infección sistémica. El caso contrario, una elevación de los niveles de ABs en el intestino, puede provocar diarrea crónica, enfermedad inflamatoria intestinal e incluso promover tumorigénesis intestinal.

Las propiedades surfactantes de los ABs, responsables de mantener bajo control la proliferación bacteriana en el intestino, se conocen desde hace mucho tiempo. Sin embargo, ha sido recientemente cuando se ha observado que parte de la actividad antibacteriana de los ABs es mediada a través de FXR (Inagaki et al., 2006). En este sentido, los ratones “knock-out” para Fxr presentan una proliferación intestinal desmesurada y una barrera epitelial comprometida, con la consecuente inflamación producida por la infiltración bacteriana y el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos activados (Inagaki et al., 2006; Modica et al., 2008). Además, el tratamiento de ratones silvestres con GW4064 es capaz de revertir tanto el sobrecrecimiento bacteriano como la integridad de la barrera epitelial causada por la ligadura del conducto biliar (Inagaki et al., 2006).

Incluso en condiciones fisiológicas, la activación intestinal de FXR es importante para controlar la proliferación bacteriana y la integridad de la barrera epitelial. A nivel transcripcional, FXR induce la expresión de genes involucrados en la defensa de la mucosa intestinal, como la interleucina 18 (IL18), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la anhidrasa carbónica 12 (CAR12). Además, algunas de las funciones protectoras de FXR parecen estar mediadas por Fgf15, ya que los ratones “knock-out” para esta proteína presentan una morfología intestinal alterada (Inagaki et al., 2005).

En humanos, la reducción de la reabsorción intestinal de ABs y el incremento de su excreción fecal, contribuyen a la aparición de diarrea crónica en diferentes contextos, que incluyen: la enfermedad de Crohn, el síndrome post-gastrectomía y el síndrome del intestino corto. Una de las consecuencias del fallo en la reabsorción es un mal funcionamiento de FXR, que conlleva una reducción en los niveles de FGF19 y SHP con el consecuente aumento de expresión de CYP7A1, lo que conduce a un círculo vicioso de incremento en la síntesis de ABs. Actualmente, el tratamiento más utilizado en estos casos es la colestiramina, una resina que secuestra ABs en el intestino, protegiéndole de los elevados niveles de ABs a nivel del colon. Sin embargo, esta resina tiene un sabor desagradable y su uso va acompañado de varios efectos secundarios (Crouse, 1987; Hathcock, 1985). Además, este tratamiento puede provocar un incremento de la producción de ABs, ya que interrumpe el efecto represor de su síntesis que ejercen los propios ABs. En modelos de ratón se ha observado que la reactivación de Fxr con GW4064 produce una reducción en el tamaño del “pool” de ABs mediante la inhibición de la expresión de Cyp7a1 a través del Shp hepático y el Fgf15 intestinal (Jung et al., 2007). Este descubrimiento sugiere que la utilización de ligandos sintéticos de FXR, o terapias basadas en FGF19, puede ser beneficiosa para pacientes con enfermedades asociadas a la malabsorción de ABs.

2.4.4- Regeneración hepática

La capacidad de los ABs para inducir la proliferación de los hepatocitos y la regeneración hepática se conoce desde hace casi dos décadas (Barone et al., 1996), pero ha sido recientemente cuando se ha sugerido que FXR puede tener un papel en la mediación de este proceso. La administración de una dieta suplementada con un 0.2% de AC estimula la regeneración hepática en ratones silvestres, mientras que los ratones “knock-out” para Fxr carecen de la habilidad de regeneración después de hepatectomía parcial (Huang et al., 2006), lo que sugiere que este receptor nuclear está directamente implicado en el proceso de regeneración hepática inducido por ABs. En los últimos años se ha demostrado que los ABs son capaces de inducir el factor de proliferación Foxm1b (gen *Foxm1*) a través de la activación de Fxr (Chen et al., 2010). Además, la utilización de ratones “knock-out” específicos de tejido, ha demostrado que la eliminación de Fxr en el hígado retrasa, pero no detiene, la regeneración hepática tras hepatectomía parcial en ratones, lo que sugiere un posible papel del Fxr intestinal, probablemente a través de la vía de Fgf15 (Borude et al., 2012).

2.4.5- Tumorigénesis

2.4.5.1- Tumorigénesis hepática

El hepatocarcinoma (HCC), cuyas características principales se comentarán en el apartado 2.5.1, es el principal tipo de tumor hepático y una de las formas más frecuentes de cáncer en el mundo. Independientemente de la etiología subyacente, uno de los mecanismos generales de hepatocarcinogénesis consiste en una regeneración hepática irregular y descontrolada (Shibata et al., 1998; Ueno et al., 2001). Algunos de los cambios patológicos típicos en el desarrollo de tumores hepáticos incluyen la inflamación y el daño hepático crónico, los cuales conducen a una proliferación continua de los hepatocitos a una tasa mayor que la de las células hepáticas normales, impidiendo que esta proliferación se detenga y haciendo que se des controle, a diferencia de un proceso de regeneración hepática típico en el que la proliferación cesa cuando el hígado alcanza su tamaño normal.

En los últimos años se ha demostrado que los ABs son capaces de promover la tumorigénesis hepática (Yang et al., 2007), y, teniendo en cuenta que FXR regula su metabolismo, protegiendo de los efectos dañinos de estos compuestos, se ha supuesto que este receptor nuclear debe jugar un papel en el desarrollo del HCC. En efecto, los ratones “knock-out” para *Fxr*, que presentan niveles crónicos elevados de ABs circulantes, desarrollan HCC espontáneamente entre los 12-15 meses de vida (Kim et al., 2007b; Yang et al., 2007). Tradicionalmente se pensaba que FXR actuaba como oncosupresor metabólico, manteniendo las concentraciones de ABs a niveles fisiológicos, reduciendo así las propiedades tóxicas de los mismos. Sin embargo, existen pocas evidencias sobre si FXR suprime directamente la tumorigénesis hepática y, si es así, cómo lo hace. Los estudios más recientes adjudican un papel directo para este receptor nuclear, inhibiendo la expresión en hígado de ratón de la gankirina, una subunidad del proteosoma, impidiendo la degradación de proteínas oncosupresoras como p53, Rb o HNF4 α , y previniendo, por tanto, el desarrollo de cáncer hepático (Jiang et al., 2012).

Resulta interesante que FXR sea necesario tanto para el proceso de regeneración hepática como para el de tumorigénesis. Esto sugiere la existencia de una conexión entre ambos procesos, que debe ser explorada para el desarrollo de nuevas terapias frente al HCC.

2.4.5.2- Tumorigénesis intestinal

El papel de FXR en carcinogénesis no se restringe únicamente al hígado, sino que varios estudios han demostrado su implicación como oncosupresor en la tumorigénesis intestinal (Maran et al., 2009; Modica et al., 2008).

El adenocarcinoma de colon (ACC) (ver apartado 2.5.2) es un largo proceso que surge de una combinación de causas genéticas y ambientales. Las mutaciones en el gen supresor de tumores *APC* (de “Adenomatous Polyposis Coli”) se consideran el primer

desencadenante para la iniciación de la mayoría de formas esporádicas y hereditarias de cáncer colorrectal. Sin embargo, no todos los individuos que presentan mutaciones en *APC* desarrollan cáncer necesariamente, sino que se necesitan mutaciones adicionales para el desarrollo de los tumores y es aquí donde los factores ambientales parecen cobrar importancia (Kinzler y Vogelstein, 1996), especialmente las dietas ricas en grasas y colesterol, como la dieta occidental, que contribuyen al desarrollo de esta patología, entre otras cosas, a través de una exposición crónica a niveles tóxicos de ABs derivados del catabolismo aumentado del colesterol. En este sentido, varios estudios han relacionado la dieta occidental con un incremento de las concentraciones colónicas de ABs y, en último término, con el ACC (Bianchini et al., 1989; Reddy et al., 1978). Además, la colecistectomía, un proceso que conlleva un aumento de la exposición intestinal a ABs, se considera un factor condicionante para el desarrollo de este tipo de cáncer (Giovannucci et al., 1993; Lagergren et al., 2001).

Sin embargo, parece que FXR no está involucrado en la mediación de los efectos tumorigénicos de los ABs a nivel intestinal, sino que, por el contrario, la expresión de FXR se encuentra reducida en el cáncer colorrectal tras la aparición de mutaciones en el gen *APC*, como ocurre en los ratones *APC*^{min} (Maran et al., 2009; Modica et al., 2008), una estirpe con una mutación inactivante en este gen, y en los pacientes con poliposis adenomatosa familiar (Modica et al., 2008), una forma hereditaria de cáncer de colon que también se caracteriza por mutaciones inactivantes en *APC* (Powell et al., 1993). Un dato que refuerza esta hipótesis es que los animales generados tras el cruce de ratones “knock-out” para *Fxr* y ratones *APC*^{min} muestran un mayor número y tamaño de tumores intestinales y una mortalidad más temprana que los ratones *APC*^{min} (Maran et al., 2009; Modica et al., 2008).

Es importante tener en cuenta que, a diferencia de lo que sucede en el territorio hepático, la susceptibilidad de los ratones “knock-out” para *Fxr* a la tumorigénesis intestinal no está relacionada con los niveles elevados de ABs, como demuestra el hecho de que el tratamiento con colestiramina no fue capaz de disminuir la aparición de los tumores en estos animales. Esto indica que la pérdida de *Fxr*, y no sólo las elevadas concentraciones de ABs, promueven el desarrollo de tumores intestinales. Para comprender el papel de *Fxr* hay que tener en cuenta varios factores. Por una parte, se ha observado que los macrófagos activados promueven la señalización por la vía *Wnt*/ β -catenina y el desarrollo de tumores intestinales en ratones *APC*^{min} a través del factor de necrosis tumoral α (*Tnf*- α) (Oguma et al., 2008). Además, los ratones “knock-out” para *Fxr* muestran una arquitectura intestinal comprometida, con la consecuente translocación bacteriana a través de la barrera epitelial y el reclutamiento de macrófagos/neutrófilos activados (Inagaki et al., 2006). Por tanto, la pérdida de *Fxr* conduce a un aumento de la susceptibilidad a desarrollar este tipo de tumores mediante la inducción de la señalización *Wnt* a través del *Tnf*- α liberado por los macrófagos que se infiltran en la mucosa intestinal a través de las uniones comunicantes o “gap junctions” que se encuentra alteradas (Modica et al., 2008).

Además de actuar como un gen oncosupresor de forma indirecta, manteniendo la integridad de la mucosa intestinal, la activación de FXR también induce una mayor

actividad oncosupresora de forma directa, ya que reduce la proliferación e induce apoptosis en células de cáncer colorrectal, a través de la inducción de la expresión de genes pro-apoptóticos, como p21, BAK1 (de “BCL-2 Antagonist Killer 1”), FADD (de “Fas-Associated Death Domain”) y la represión de genes anti-apoptóticos, como BCL2 (de “B Cell Lymphoma Gene-2”) y TNF- α (Modica et al., 2008). También se ha descrito que FXR es capaz de inhibir la proliferación celular mediante la regulación del estado de fosforilación de la vía de ERK por FXR, en varias líneas celulares humanas de adenocarcinoma de colon, a través de la regulación de la quinasa Src (Peng et al., 2012).

2.5- MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA

Los mecanismos implicados en la falta de respuesta de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos son complejos y, frecuentemente, se activan y cooperan entre sí para determinar el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos o MDR (de “multidrug resistance”). Para poder desarrollar estrategias encaminadas a superar esta grave limitación del tratamiento farmacológico del cáncer, es indispensable un buen conocimiento de los mecanismos subyacentes. En esta Tesis Doctoral se seguirá la nomenclatura propuesta recientemente para clasificar los procesos responsables del fenotipo MDR en cinco grandes grupos, o MOC (de “Mechanism Of Chemoresistance”) (Figura I-8) (Marin et al., 2010).

En el MOC-1 se engloban aquellos mecanismos que determinan una reducción de la concentración del fármaco dentro de las células tumorales. En base a esto, se pueden distinguir dos tipos de mecanismos: los que implican un descenso en la captación de los fármacos antitumorales (MOC-1a) y los que implican la activación de procesos de exportación de estos compuestos fuera de la célula (MOC-1b). Ambos se deben a cambios en la expresión, o en la función, de proteínas transportadoras de membrana, que en el caso del MOC-1a pertenecen a la familia SLC, mientras que en el caso del MOC-1b se trata de transportadores activos primarios, que en su mayoría pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC. No obstante, existen ATPasas de tipo P implicadas en la resistencia a fármacos que no pertenecen a esta superfamilia.

En el MOC-2 se incluyen los mecanismos que implican una reducción de la eficacia de la terapia antitumoral mediante modificaciones en la cantidad intracelular de fármaco en su forma activa. Esto puede ocurrir por un aumento de la inactivación de un agente activo, o por un defecto en la activación intracelular de pro-fármacos inactivos, por lo que las enzimas implicadas en los procesos de detoxificación de fase I y fase II son los responsables de estos mecanismos.

En el MOC-3 se agrupan los mecanismos que se relacionan con cambios en las moléculas o vías que actúan como dianas de los agentes antitumorales. La alteración de la ruta o la potenciación de una vía alternativa, así como los cambios de expresión, o la mutación de una diana molecular sobre la que debería actuar el fármaco, pueden reducir la eficacia de los tratamientos antitumorales.

Los mecanismos que implican un aumento de la actividad de los procesos de reparación del ADN constituyen el MOC-4. La actividad de muchos agentes quimioterapéuticos se basa en su capacidad para atacar al ADN, produciendo lesiones que pueden llevar a la muerte de las células tumorales, por lo que un aumento en la eficacia de los procesos de reparación daría como resultado un incremento en la resistencia a este tipo de fármacos.

Por último, en el MOC-5 se engloban los mecanismos que alteran el balance apoptosis/supervivencia y que juegan un papel fundamental en determinar el éxito o fracaso de la quimioterapia antitumoral. La reducción de sensibilidad al fármaco puede deberse a cambios de expresión o función de genes que potencian los procesos de supervivencia por activación del ciclo celular y de la invasividad de las células tumorales (MOC-5b), o por reducción de la activación de los mecanismos de apoptosis (MOC-5a).

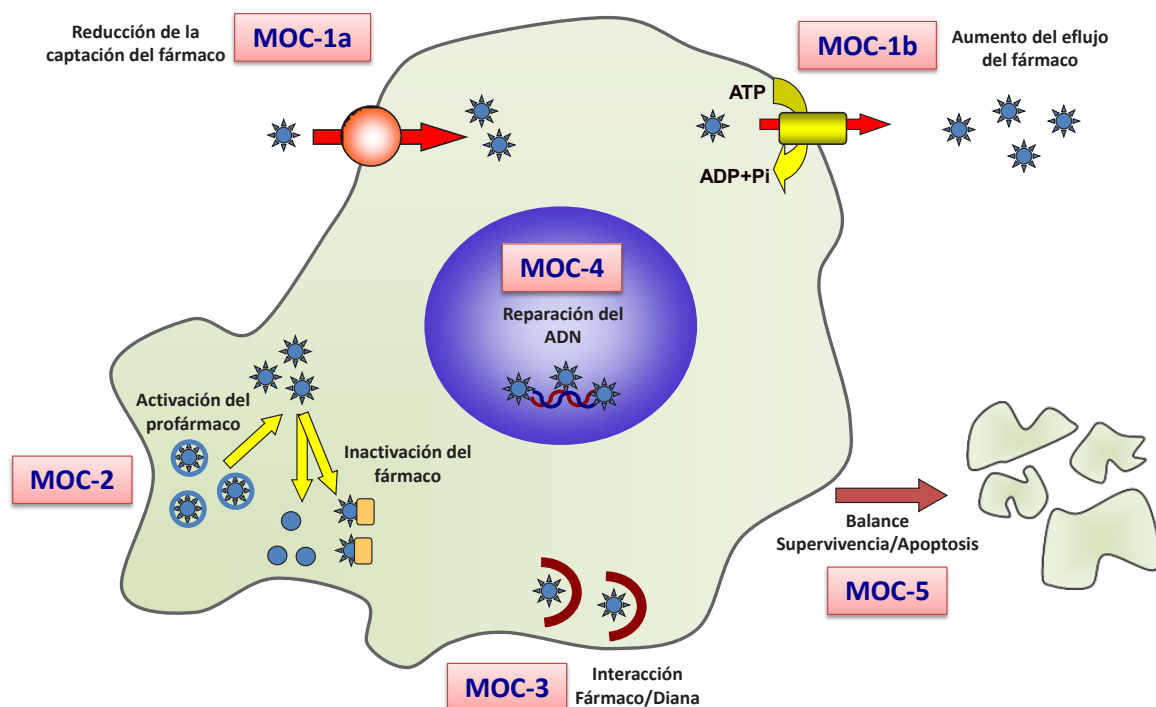


Figura I-8. Mecanismos responsables del desarrollo de quimiorresistencia a la terapia antitumoral por parte de las células tumorales. MOC, "Mechanism Of Chemoresistance".

Es importante destacar que los procesos implicados en estos MOC pueden estar ya presentes en las células tumorales, o pueden ser inducidos y potenciados por la presión y selección que representa la exposición a los fármacos antitumorales.

2.5.1- Resistencia a la quimioterapia en cáncer hepático

El HCC es un grupo heterogéneo de tumores malignos, con múltiples etiologías y una media de supervivencia de 6 a 20 meses desde el diagnóstico (Bialecki y Di Bisceglie, 2005). Estos tumores se desarrollan casi exclusivamente sobre un tejido hepático cirrótico por cualquier causa, aunque con más frecuencia asociada a la hepatitis crónica por infección

vírica B o C o por hemocromatosis hereditaria. Es la sexta neoplasia más común en todo el mundo y la tercera causa de muerte por cáncer (9.2%) (Ferlay et al., 2010). A pesar de que presenta una clara diferencia en su distribución geográfica, la mayor incidencia se da en los países en desarrollo, donde se concentran casi el 85% de los nuevos casos diagnosticados cada año. Se estima que la prevalencia global del HCC es de 10.8 casos por cada 100.000 habitantes (Parkin et al., 2005).

Para el manejo quirúrgico estándar de estos pacientes se contempla la ablación locorregional, la resección quirúrgica o el trasplante, dependiendo del estado del hígado. La mayoría de los pacientes presentan tipos de HCC no operables, ya sea por el tamaño y localización del tumor, o por el grado de disfunción hepática. En estos casos, los pacientes pueden someterse a un tratamiento preoperatorio dirigido a reducir la masa tumoral y mejorar la supervivencia. Aunque la resección hepática es el único tratamiento eficaz frente al HCC, la terapia locorregional destruye el tumor preservando al mismo tiempo el parénquima hepático restante, sirviendo como alternativa puente a la espera de un trasplante (Belghiti et al., 2008; Heckman et al., 2008; Pompili et al., 2008; Zimmerman et al., 2008).

Existen evidencias de que la quimioterapia sistémica incrementa el nivel de supervivencia en pacientes con HCC en estadios avanzados (Palmer et al., 2004). La doxorrubicina se ha utilizado como tratamiento estándar en estos casos, pese a su alto grado de toxicidad, con un nivel de respuesta de entre el 10-15%, pero sin beneficios en la tasa de supervivencia (Lai et al., 1990). Otros fármacos utilizados con resultados similares han sido la epirrubicina, el cisplatino, el 5-fluorouracilo o el etoposido, individualmente o en terapia combinada. Asimismo, se han utilizado agentes quimioterapéuticos de nueva generación, como la gemcitabina, el irinotecán y la doxorrubicina pegilada liposomal (Halm et al., 2000; O'Reilly et al., 2001), aunque con resultados desalentadores. Para el tratamiento de estadios avanzados de HCC se ha utilizado la quimioterapia combinada, pero no se ha obtenido un beneficio evidente sobre la tasa de supervivencia.

Por tanto, existen diferentes tratamientos dirigidos a reducir la masa tumoral y aumentar la supervivencia en pacientes con HCC, pero su éxito es muy bajo debido a que este tipo de tumor es muy refractario a la quimioterapia. Esta resistencia está relacionada en parte con la biología tumoral, las propiedades farmacocinéticas y la quimiorresistencia intrínseca o adquirida. En relación con la biología tumoral, el hígado es un órgano de defensa que responde a diferentes tipos de daños de una manera singular. Los hepatocitos están normalmente detenidos en la fase G_0 , pero pueden entrar en el ciclo celular y proliferar en respuesta a un estímulo adecuado, como el daño del tejido hepático (Epstein y Leung, 2007). Las células tumorales en el HCC muestran, en los estadios iniciales, una mayor capacidad apoptótica, pero en estadios avanzados el tumor muestra un fenotipo de resistencia a la apoptosis que se asocia con el desarrollo y la progresión del HCC (Fabregat et al., 2007). Por otro lado, una alteración común en el HCC es la aparición de mutaciones en el gen *TP53*, que se han relacionado con infecciones virales y con el efecto de determinadas sustancias químicas. Algunos fármacos neoplásicos actúan induciendo apoptosis a través de la vía de activación de p53, por lo que los tumores con mutaciones en

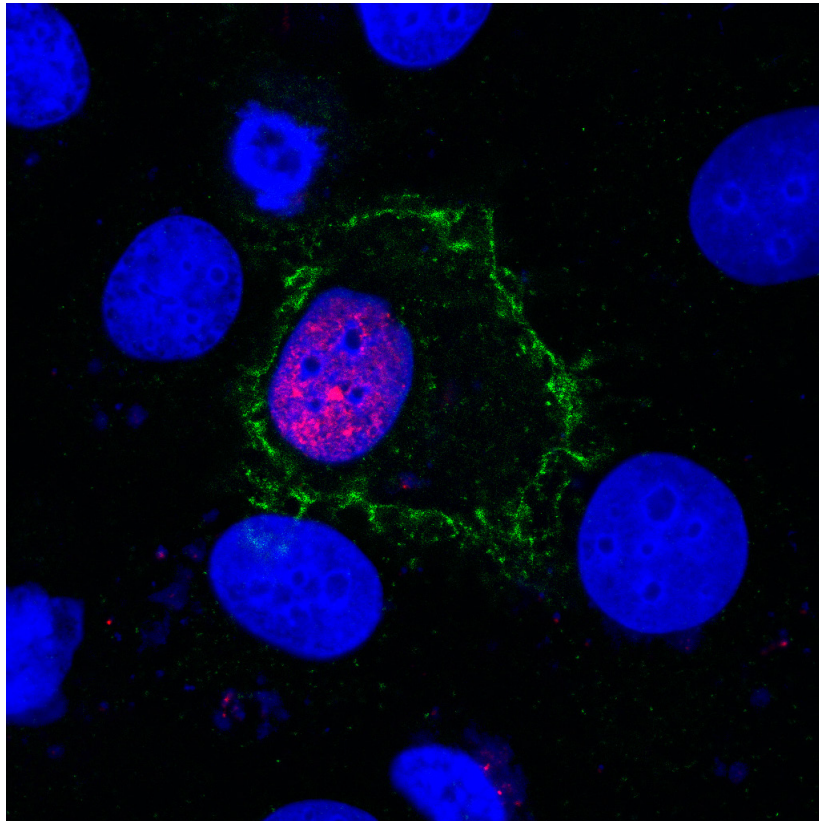
este gen son refractarios a dichos fármacos. Del mismo modo, la ADN topoisomerasa II α está sobreexpresada en líneas celulares de HCC, lo que explicaría la resistencia a la terapia con doxorrubicina, cuya acción se centra sobre esta enzima (Watanuki et al., 2002). En relación con las propiedades farmacocinéticas, el hígado juega un papel clave en el metabolismo de moléculas endógenas y exógenas por medio del sistema enzimático CYP450. Además, las células de HCC tienen mecanismos intrínsecos de resistencia que les confieren un marcado fenotipo MDR (Park et al., 1994) cuyas bases celulares y moleculares son muy diversas.

2.5.2- Resistencia a la quimioterapia en cáncer de colon

El cáncer del intestino grueso es el tercer tipo más frecuente después del de pulmón y el de mama, pero es el segundo en orden de mayor mortalidad tras el cáncer de pulmón (Ferlay et al., 2007). Esta alta mortalidad se debe en parte a su marcada capacidad para producir metástasis hepáticas (Robertson et al., 2008), que se detectan en el 25% de los pacientes en el momento del diagnóstico (Kavolius et al., 1996). La incidencia del cáncer de colon tiene una gran variabilidad geográfica, siendo más frecuente en los países desarrollados (Parkin et al., 2005). En cuanto al origen histológico, el ACC es el tipo más frecuente de cáncer (> 95%) (Kang et al., 2007), se da con mayor frecuencia entre los 60 y los 80 años de edad y tiene una localización predominante en el colon derecho.

En las primeras etapas de la enfermedad (0 y I), la quimioterapia no se utiliza ya que la extirpación quirúrgica del tumor es el método de elección. En el estadio II hay controversia sobre la utilidad de la quimioterapia como adyuvante, ya que no hay pruebas convincentes de que aumente la supervivencia en comparación con la cirugía sola, aunque probablemente se reduce el riesgo de recidiva. En cualquier caso, no se recomienda el uso general de la quimioterapia como tratamiento coadyuvante de la resección quirúrgica de los tumores en estadio II (Benson et al., 2004). Para la fase III del cáncer colorrectal, la quimioterapia basada en 5-fluorouracilo, cuando se utiliza como adyuvante a la cirugía, aumenta el tiempo de supervivencia a más de 3 años en un 78% de los pacientes (Andre et al., 2004). Sin embargo, la mayoría de tumores en estadio IV ya no responden al 5-fluorouracilo (Budd et al., 1987), por lo que en estos casos se utiliza como terapia farmacológica la capecitabina, el irinotecán, el oxaliplatino, el cetuximab, el bevacizumab y el panitumumab, o la terapia combinada con algunos de ellos (Andre et al., 2004; Cunningham et al., 2004; Cunningham et al., 2004; Hurwitz et al., 2004).

Aunque los fármacos disponibles proporcionan una tasa de éxito frente al cáncer colorrectal mucho más alta que frente a otros tumores gastrointestinales, la quimiorresistencia constituye una importante limitación en el tratamiento de estos pacientes. La falta de respuesta a la quimioterapia se ha asociado con aumentos en la actividad de varias enzimas implicadas en el metabolismo y biodisponibilidad de algunos fármacos (Johnston et al., 1995; Salonga et al., 2000; Schwartz et al., 1995). Por otro lado, en tumores colorrectales quimiorresistentes, se ha observado la sobreexpresión de algunos genes implicados en la replicación y en la reparación del ADN, y en la maduración y el tráfico de proteínas (Mariadason et al., 2003).



“Los protocolos son orientativos”

Anónimo

3. Material y Métodos

3.1- MATERIAL

3.1.1- Material Biológico

3.1.1.1- Muestras humanas

- Las muestras de tejidos humanos se obtuvieron en el Hospital Universitario de Salamanca y procedían de restos de piezas quirúrgicas o del excedente de biopsias realizadas por imperativos diagnósticos. Las placentas procedían de mujeres sanas a término, cuyo parto tuvo lugar vía vaginal o por cesárea, y se utilizaron con el consentimiento firmado de las madres. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud de Salamanca. Los datos de los pacientes se trataron con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99).
- Los “microarrays” de tejido fueron obtenidos del Biobanco del Hospital Clínico de Barcelona-IDIBAPS (Barcelona). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético del hospital.
- El ARN total de los hepatoblastomas humanos fue amablemente cedido por el Dr. Luis Álvarez, de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz (Madrid).

3.1.1.2- Líneas celulares

- La línea celular CHO-K1 (CCL-61), de ovario de hámster chino, las líneas celulares humanas Caco-2 (HTB-37), COLO 205 (CCL-222) y LS 174T (CL-188), de adenocarcinoma de colon, HepG2 (HB-8065), de hepatoblastoma, JAr (HTB-144) y Jeg-3 (HTB-36), de coriocarcinoma; K562 (CCL-243), de leucemia mieloide crónica, SK-Hep-1 (HTB-52), de carcinoma hepatocelular, la línea celular no tumoral HEK-293 (CLR-1573), de riñón embrionario, y la línea celular inmortalizada humana HK-2 (CRL-2190), epitelial del túbulo proximal del riñón, se obtuvieron de la “American Type Culture Collection” (ATCC; LGC Standards, Barcelona).
- Las líneas celulares humanas Alexander o PLC/PRF/5 (85061113), de hepatoma, BeWo (86082803), de coriocarcinoma, y COR-L23 (92031919), de carcinoma de pulmón de células grandes, fueron proporcionadas por la “European Collection of Cell Cultures” (ECACC; Health Protection Agency, Salisbury, Reino Unido).
- Las líneas celulares humanas EGI-1 (ACC-385) y TFK-1 (ACC-344), de colangiocarcinoma, se obtuvieron de la “German Collection of Microorganisms and Cell Cultures” (DSMZ, Braunschweig, Alemania).
- La línea celular humana HuH-7, de carcinoma hepatocelular, fue amablemente cedida por el Dr. Pedro Majano, de la Unidad de Biología Molecular del Hospital Universitario La Princesa (Madrid).

- La línea celular humana HuH-28, de colangiocarcinoma, fue amablemente cedida por el Dr. Juan Francisco Medina, del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra (Pamplona).
- La línea celular humana MUM2C, de melanoma, fue amablemente cedida por el Dr. Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque Escribano, del Grupo de Proteasas y Matriz Extracelular del Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) (Granada).
- Las líneas celulares humanas NHC-2, de colangiocitos sanos inmortalizados, CCA 10402 y CCA 10417, ambas de colangiocarcinoma, fueron amablemente cedidas por el Dr. Jesús Bañales, del Área de Hepatología del Hospital de Donostia (San Sebastián).
- Los hepatocitos humanos, aislados a partir de los márgenes sanos de resecciones de tumores hepáticos, fueron amablemente cedidos por el Dr. Jordi Muntané, del Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla (Sevilla).
- La sublínea celular LS 174T/R, parcialmente resistente al cisplatino, había sido obtenida previamente por nuestro grupo de investigación (Briz et al., 2003).

3.1.1.3- Bacterias

- Se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* proporcionada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.
- Las bacterias *E. coli* “One Shot Mach1 T1” y “One Shot ccdB Survival T1” competentes, de elevada eficacia de transformación, se compraron a Invitrogen (Barcelona).

3.1.2- Productos

Los productos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpo primario frente a FXR (ab56902).
- Abcam Biochemicals (Bristol, Reino Unido): forskolina.
- Air Liquide (Valladolid): CO₂ y N₂.
- AppliChem (Madrid): ácido morfolino propansulfónico (MOPS), agar, extracto de levaduras, formamida, leche descremada liofilizada y triptona.
- Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, EE.UU.): “Immunohistochemistry Accesory Kit”.

- Biomers.net (Donau, Alemania): algunos cebadores o “primers”.
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, marcadores de pesos moleculares de proteínas (“High range”, “Low range” y “Kaleidoscope”), membrana de nitrocelulosa, persulfato de amonio, TEMED y rojo ponceau.
- Chemicon International (Temecula, CA, EE.UU.): anticuerpo primario frente a α -actinina (MAB1682).
- Dako (Barcelona): medio de montaje para fluorescencia “Fluorescent Mounting Medium”.
- GE Healthcare (Barcelona): algunas enzimas de restricción, “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”, “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, “PlasmidPrep Mini Spin Kit” y reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemioLuminiscence”), que incluyen los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2.
- Isogen (De Meern, Holanda): algunos cebadores o “primers”.
- Life Technologies (Madrid): acetato de amonio, anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo marcados con Alexa® 594 o Alexa® 488, concentrado lipídico (“Chemically Defined Lipid Concentrate”), 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), enzima Accuprime® Pfx ADN polimerasa, estándares de ADN (25, 100 y 500 pb y 1 kb plus) y de ARN (0,24-9,5 kb y 0,5-10 kb), extracto de pituitaria bovina, inhibidor de tripsina de soja, kits comerciales “PicoGreen dsDNA Quantitation Kit” y “Ribo-Green RNA-Quantitation Kit” para la cuantificación de ADN y ARN, respectivamente, lipofectamina LTX y reactivo Plus, medios de cultivo Opti-MEM, DMEM F-12 con glutamax y F-12K, mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomina), mezclas enzimáticas “Gateway BP Clonase II”, “Gateway LR Clonase II”, “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit”, SYBR Green I (“SYBR Safe”), “SYBR Green I PCR Master Mix”, “Taqman® Universal PCR Master Mix”, los plásmidos pUC19 y pcDNA3.1/Hygro(+), proteinasa K, solución vitamínica (“Mem vitamin solution”), suero bovino fetal y suplemento de insulina, transferrina y selenio, tarjetas microfluídicas (TLDA) y los vectores pDONR207 y pcDNA6.2/V5-DEST para clonación Gateway.
- Lonza (Basilea, Suiza): aminoácidos no esenciales y el marcador de pesos moleculares de proteínas “ProSieve™ QuadColor™ protein marker”.
- Merck (Barcelona): acetato sódico anhidro, β -mercaptoetanol, etanol, formaldehído 37%, isopropanol, tartrato disódico y tris HCl.
- Menarini Diagnostics (Barcelona): portaobjetos Optiplus™.

- Panreac (Barcelona): dicromato potásico.
- Promega Corporation (Madison, WI, EE.UU.): algunas enzimas de restricción, kit comercial “CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” para determinar la viabilidad celular, kit para medir actividad de luciferasa “Bright-Glo Luciferase Assay System”, el plásmido pGL4.28[*Luc2CP*] y T4 ADN ligasa,
- Pronadisa (Hispalab, S.A., Madrid): agarosa normal, agarosa de alta resolución MS-8 y agarosa de bajo punto de fusión.
- Roche (Barcelona): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (Hepes), algunas enzimas de restricción, mitomicina C, proteinasa K y tripsina de páncreas porcino.
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.): anticuerpo primario frente a FXR (H-130).
- Sigma-Aldrich (Madrid): acetaminofeno, albúmina bovina (fracción V), sal sódica de los ácidos cólico (AC), glicocólico (AGC), taurocólico (ATC), desoxicólico (ADC), glicodesoxicólico (AGDC), taurodesoxicólico (ATDC), quenodesoxicólico (AQDC), glicoquenodesoxicólico (AGQDC), tauroquenodesoxicólico (ATQDC) y litocólico (ALC), ácido ursodesoxicólico (AUDC), ácido fórmico, azul de bromofenol, azul de Tripán, ácido etilendiamino tetraacético (AEDT), ampicilina, cis-diaminodichloroplatino II (cisplatino), colchicina, mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1.5 mM, E-64 1.64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 μM), colagenasa, dexametasona, dietilpirocarbonato (DEPC), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), doxorubicina, D-glucosa, igepal CA-630, Factor de Crecimiento Epitelial (Epidermal Growth Factor, EGF), yoduro de propidio, L-prolina, medios de cultivo “DEM-Ham-F12”, “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM), “Minimum Essential Medium Eagle” (MEM) y “William’s E”, mezcla de antibióticos y antimicótico (penicilina, estreptomina y anfotericina B), mezcla lipídica (“Lipid mixture 1 chemically defined”), mitoxantrona, paclitaxel, piruvato sódico, sulfato de gentamicina, T3 (3,3’5-triiodo-L-tironina), trizma base y xileno cianol.
- Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.): marcador de pesos moleculares de proteínas “PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder”.
- Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada): ácido nordesoxicólico (norADC).
- Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido): algunos cebadores o “primers”.
- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, bicarbonato sódico, bromuro de etidio, carbonato sódico, cloruro potásico, cloruro

sódico, dihidrógeno fosfato potásico, etanol absoluto, fosfato disódico, glicerol, hidróxido sódico, indicador universal de pH, medio de montaje Entellan®, metanol, reactivo de Folin Ciocalteu y Tween® 20.

El artesunato fue amablemente cedido por el Dr. Thomas Effert, del Departamento de Biología Farmacéutica del Instituto de Farmacia y Bioquímica Johannes Gutenberg de la Universidad de Mainz (Mainz, Alemania).

El ácido biliar (AB) fetal ácido allo-cólico (Allo-AC) fue sintetizado previamente en nuestro laboratorio por la Dra. M^a Encarnación Mendoza (Mendoza et al., 2003).

El inductor sintético de FXR GW4064 fue cedido amablemente por el Dr. Luis Álvarez, de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz (Madrid).

El tosilato de sorafenib fue amablemente cedido por la Dra. Silvia Jiménez del Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca).

Todos los demás reactivos utilizados fueron del grado requerido para cada caso.

3.1.3- Medios instrumentales

- Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid).
- Para la determinación de pH se utilizó un electrodo de marca Crison micro pH 2002 (Crison Instruments, Barcelona).
- El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Ro 10 Plus y Milli-Q (Millipore Ibérica, Madrid).
- Las centrifugaciones se realizaron en centrifugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hucoa-Erlöss, Madrid), Megafugue-1.0 R (Heraeus Spatach, Hanau, Alemania) y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman, Brea, CA, EE.UU.). También se utilizó una picofuga Stratagene (VWR International Eurolab, Barcelona).
- Para las medidas espectrofotométricas se empleó un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Grupo Taper, Madrid) y un lector de ELISA modelo ELx808 Absorbance Microplate reader (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.). Para la cuantificación fluorimétrica se utilizó un fluorímetro Hitachi F-4010 (Grupo Taper) y cubetas de cuarzo de la marca Hellma (Duerolab, Salamanca).
- Las filtraciones a vacío se realizaron con una bomba Millipore modelo XX5522050 (Millipore Ibérica). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Grupo Taper).

- Para la PCR analítica y para la transcripción reversa (RT) se utilizó un termociclador Mastercycler Pro marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un aparato ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems. Para las tarjetas microfluídicas se utilizó el modelo ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System de la misma compañía. El sistema se controló desde un ordenador Intel Core 2 (modelo DELL OPTIPLEX 755) utilizando el software DataAssist versión 2.0.
- La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplados a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad, Madrid).
- La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.
- Para la evaporación de pequeños volúmenes de solventes, se utilizó un “speed-vacuum” marca Savant modelo SPD121P, acoplado a una bomba de vacío modelo UVS400A (Hucoa-Erlöss).
- Las homogeneizaciones se realizaron con un homogeneizador Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna, Suiza) o un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona).
- La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II, utilizando para ello la misma fuente de alimentación. Todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.
- El manejo de células se realizó en una campana de flujo laminar vertical modelo Telstar AV 30/70 (Telstar Industrial, Barcelona). Las células se mantenían a 37°C en una estufa en ambiente de CO₂ modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher Scientific, y se observaban a través de un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, DueroLab). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N₂ líquido (Thermo Fisher Scientific).
- Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado LAUDA Ecoline Staredition RE 106 (Hucoa-Erlöss).
- Para el cultivo de las líneas celulares se utilizaron placas de cultivo y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid). La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0.2 µm (Millipore Ibérica).

- Para visualizar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, DueroLab) o un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica, Barcelona), perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca).
- Para el crecimiento de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Barcelona).
- También se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, HPLC-MS-MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con desgasificador de vacío (modelo G12354A); un inyector de 20 µl de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de poro, termostatzada a 35°C (Agilent Technologies). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065), utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite tanto el control del HPLC como del detector de masas.
- Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos y para la toma de medidas de quimioluminiscencia se utilizó un equipo de análisis de imagen LAS-4000 (TDI, Madrid). Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0.
- Las muestras se conservaron en un congelador -80°C marca Revco (Pacisa).
- Además se contó con pequeño equipamiento como agitadores magnéticos calefactores Selecta (DueroLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Wilson (Prosisa, Salamanca).

3.1.4. Soluciones comunes utilizadas

- Tampón MOPS 10x: MOPS 0.2 M, acetato sódico anhidro 80 mM, AEDT 10 mM, pH 7.0.
- Tampón TAE: trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, AEDT 1 mM, pH 8.
- Tampón TE 1x: Tris 10 mM, AEDT 1 mM, pH 8.0.
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 0.5 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.4.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- Métodos de clonación

Los diferentes receptores nucleares y el elemento de respuesta de FXR (IR-1), necesarios para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, han sido clonados mediante la combinación de técnicas basadas en RT-PCR de alta fidelidad, el uso de enzimas de restricción y la Tecnología Gateway, como se describe a continuación. Al final del epígrafe 3.2.1, se muestra de forma detallada la secuencia de pasos seguidos para la consecución de las diferentes clonaciones, en las Figuras MM3-5.

3.2.1.1- Clonación por recombinación Gateway

Fundamento

La Tecnología Gateway es un método de clonación altamente eficaz para clonar de manera direccional fragmentos de ADN (Hartley et al., 2000). Está basada en el sistema de recombinación del fago lambda y permite la transferencia de fragmentos de ADN entre diferentes vectores manteniendo la orientación y la fase de lectura con respecto a los tripletes. El método Gateway se basa en dos reacciones de recombinación sucesivas, denominadas BP y LR, que son versiones “in vitro” de las reacciones de integración y escisión del fago lambda. Es un método de clonación más rápido y eficaz que los procedimientos tradicionales que requieren reacciones de ligación o tratamiento con enzimas de restricción.

La reacción BP (Figura MM-1A) es aquella en la que un fragmento de ADN, flanqueado por sitios attB, reacciona con un vector donador (pDONR), con sitios attP, para dar lugar a un vector denominado “Entry”, con sitios attL, y un producto secundario con sitios attR. Los sitios att confieren direccionalidad y especificidad a la reacción (Hartley et al., 2000).

La reacción LR (Figura MM-1B) es aquella en la que un vector “Entry”, con el ADN de interés flanqueado por sitios attL, reacciona con un vector de destino, con sitios attR, para dar lugar a un vector útil para ser empleado en el sistema de expresión correspondiente (Hartley et al., 2000), y un producto secundario.

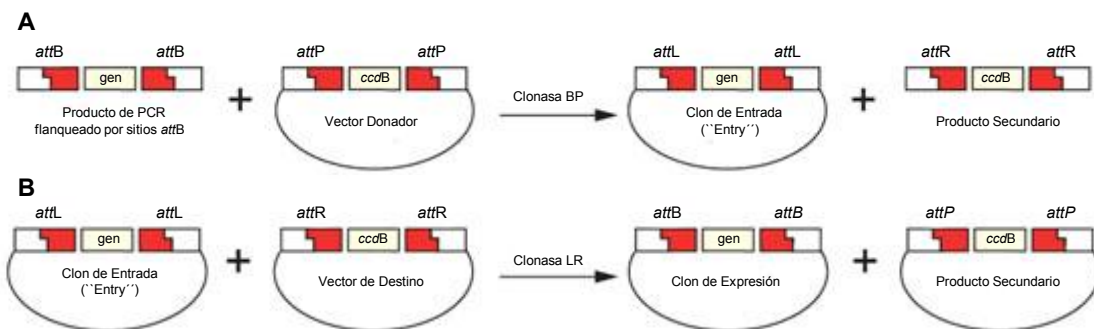


Figura MM-1. Esquema de las reacciones de recombinación BP (A) y LR (B).

El gen *ccdB*, que contienen algunos productos intermedios, impide el crecimiento de las bacterias que posean un vector donador o de destino no recombinado, o un producto secundario. El producto del gen *ccdB* interfiere con la girasa bacteriana, impidiendo la proliferación de las colonias que contienen estos vectores, que se desean eliminar del proceso de selección. La propagación y amplificación de los vectores que contienen el gen *ccdB* pueden llevarse a cabo en la cepa de bacterias One Shot *ccdB* Survival T1, resistente a la acción tóxica del producto de este gen.

Adición de extremos *attB* al ADNc de interés por PCR de alta fidelidad

Los oligonucleótidos utilizados para añadir los extremos *attB* a la ORF de los receptores nucleares FXR y RXR α , se diseñaron en base a las secuencias NM_005123 (FXR α 1), NM_001206993 (FXR α 2) y NM_002957 (RXR α), de la base de datos GenBank, obteniéndose como mejores resultados las secuencias mostradas en la Tabla MM-1.

Tabla MM-1. Cebadores utilizados para la clonación mediante la Tecnología Gateway.

Proteína	Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplión (pb)
FXR α 1	<i>NR1H4</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTGATGGGATCAAAAAT GAATCTCATTGAACATTCCC	GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTGCTGCACGT CCCAGATTTACAGAG	1476/1488
FXR α 2	<i>NR1H4</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTGATGGTAATGCAGTT TCAGGGTTAGAAAATC	GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTGCTGCACGT CCCAGATTTACAGAG	1506/1518
FXR α 1(-)	<i>NR1H4</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTGGATGGGATCAAAA TGAATCTCATTGAACATTCCC	GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTGCTACTGCA CGTCCCAGATTTACAGAG	1480
FXR α 1(+)	<i>NR1H4</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTGGATGGGATCAAAA TGAATCTCATTGAACATTCCC	GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTGCTACTGCA CGTCCCAGATTTACAGAG	1492
FXR α 2(-)	<i>NR1H4</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTGGATGGTAAATGCAGT TTCAGGGTTAGAAAATC	GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTGCTACTGCA CGTCCCAGATTTACAGAG	1510
FXR α 2(+)	<i>NR1H4</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTGGATGGTAAATGCAGT TTCAGGGTTAGAAAATC	GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTGCTACTGCA CGTCCCAGATTTACAGAG	1522
RXR α	<i>NR2B1</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTGGATGGACACCAAAC ATTTCCTGCCGCT	GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTGCTAAGTCA TTTGTGCGGCGCCT	1450

La PCR se llevó a cabo con la enzima AccuPrime Pfx ADN polimerasa de alta fidelidad. Los productos obtenidos tras la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa y las bandas de los tamaños adecuados se purificaron por extracción del ADN el gel de agarosa.

Incorporación del fragmento de PCR a un vector de tipo pGEM-T-Easy

Aunque la clonación Gateway no lo requiere, se introdujo un paso intermedio necesario para el caso particular de esta Tesis Doctoral. Los productos de PCR flanqueados por sitios *attB* se introdujeron en vectores de tipo pGEM-T-Easy, lo que nos permitió realizar la separación de la mezcla de isoformas FXR α 1(+)/FXR α 1(-) y FXR α 2(+)/FXR α 2(-) (Figura MM-4), mediante un método de mutagénesis dirigida por amplificación del plásmido

completo (Laible y Boonrod, 2009). La clonación del elemento de respuesta IR-1 en el plásmido pGL4.28[Luc2CP] se llevó a cabo mediante esta misma técnica. Los primers específicos para estas clonaciones se muestran en la Tabla MM-2.

Tabla MM-2. Cebadores utilizados para la separación de isoformas FXR(+/-) y para la clonación del elemento IR-1.

ORF	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')
FXR(-)	GGGAATGTTGGCTGAATG CTTGTTAACTG	ATCTCTTTGCATTTCCCTTAGTC GACTCTCT
FXR(+)	GGGAATGTTGGCTGAATG CATGTATACAGG	ATCTCTTTGCATTTCCCTTAGTC GACTCTCT
IR-1	AGGTCAATGACCTATCAAG ATCTGGCCTCGGCG	ATCCTCGAGGCTAGCGAGCT

El vector pGEM-T-Easy contiene una desoxitimidina en los extremos 5' de las cadenas de ADN. La PCR se realizó con una ADN polimerasa de alta fidelidad, que posee actividad 3'-5' endonucleasa, por lo que genera cadenas de ADN de extremos romos. Sin embargo, las ADN polimerasas que carecen de tal actividad endonucleasa, como la Taq ADN polimerasa, generan cadenas con extremos 3' extendidos. Por esta razón, antes de clonar el producto de PCR en el vector pGEM-T, se añadió una desoxiadenosina en los extremos 3' de las cadenas de ADN del inserto, utilizando la enzima Platinum Taq ADN polimerasa.

A continuación, se llevó a cabo la reacción de ligación catalizada por la enzima T4 DNA ligasa, usando diferentes relaciones molares, entre 1:1 y 5:1 (inserto:vector).

Se transformaron bacterias con el producto de reacción por choque térmico y los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina 100 µg/ml y por α-complementación mediante el test blanco/azul. Se crecieron algunas de las colonias en medio LB líquido suplementado con antibiótico, de las que se extrajo el ADN plasmídico. La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción.

Obtención del “Entry clone” mediante recombinación BP

Cada producto de PCR, flanqueado por sitios attB e incluido en un vector pGEM-T, se clonó en el vector donador pDONR207 mediante una reacción de recombinación con la enzima clonasa BP II.

Se transformaron bacterias con el producto de reacción por choque térmico. Se sembraron en placas de medio LB con agar, suplementado con gentamicina 20 µg/ml, el antibiótico de selección correspondiente al pDONR207. Se crecieron algunas de las colonias en medio LB líquido suplementado con antibiótico, de las que se extrajo el ADN plasmídico. La identidad de los clones seleccionados se confirmó con un estudio de restricción.

Obtención del “Expression clone” mediante recombinación LR

Los vectores de tipo “Entry” generados en el paso anterior se hicieron recombinar con el vector de destino pcDNA6.2/V5-DEST, que contiene la secuencia codificante del epítipo antigénico V5, para obtener vectores denominados “Expression clones”.

Se transformaron bacterias con el producto de reacción por choque térmico (apartado 3.2.1.3) y se siguió el mismo protocolo que se ha explicado en el apartado anterior, utilizando ampicilina 100 µg/ml como antibiótico de selección.

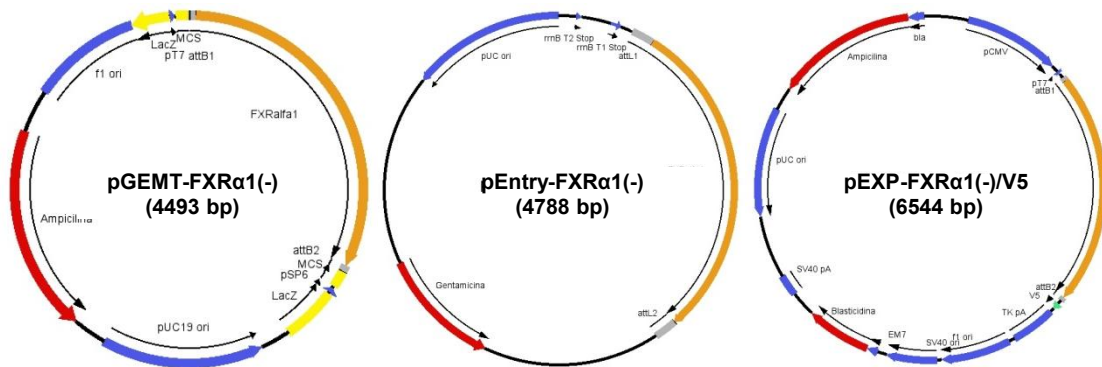


Figura MM-2. Imágenes representativas de los plásmidos utilizados para clonar las isoformas de FXR en esta Tesis Doctoral. Se muestran, de izquierda a derecha, los plásmidos pGEMT, pEntry (o clon de entrada) y pEXP (o clon de expresión) correspondientes a la isoforma FXRα1(-).

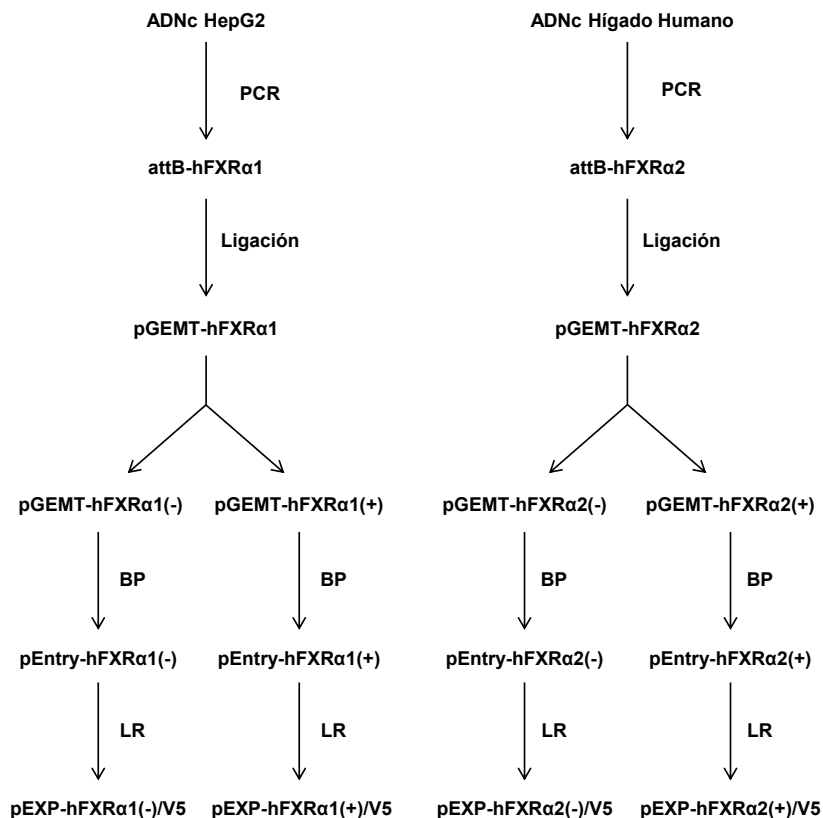


Figura MM-3. Esquema de los pasos seguidos para la clonación de las cuatro isoformas de FXR humano en fase con la secuencia codificante del epítipo antigénico V5. Entre paréntesis se indican los “primers” utilizados en las reacciones de amplificación por PCR.

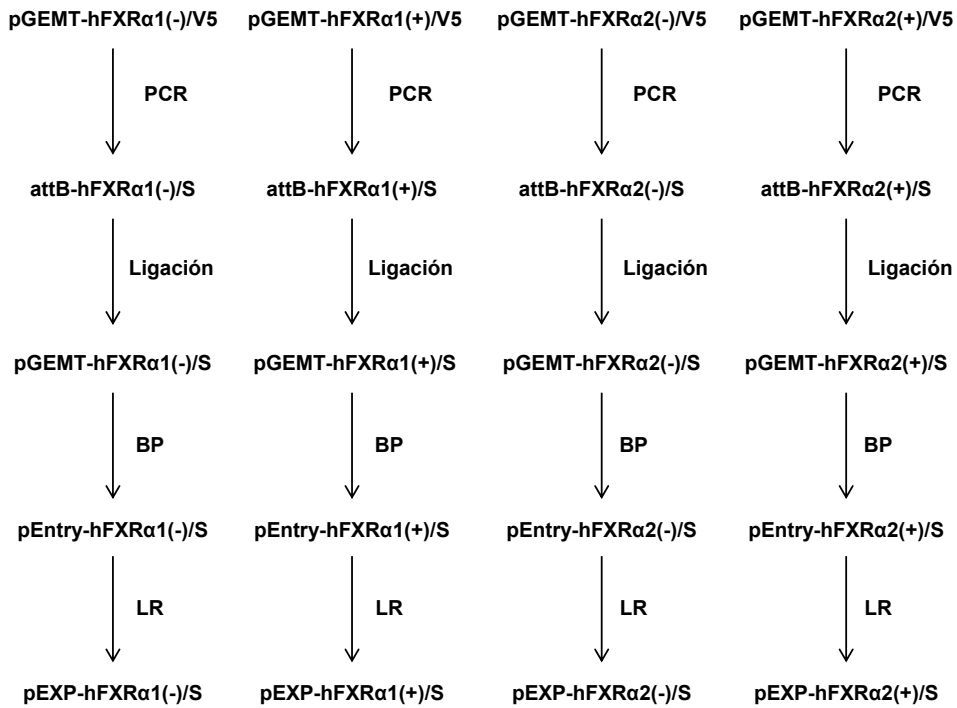


Figura MM-4. Esquema de los pasos seguidos para la clonación de las cuatro isoformas de FXR humano seguidas de un codón STOP (S). Entre paréntesis se indican los “primers” utilizados en las reacciones de amplificación por PCR.

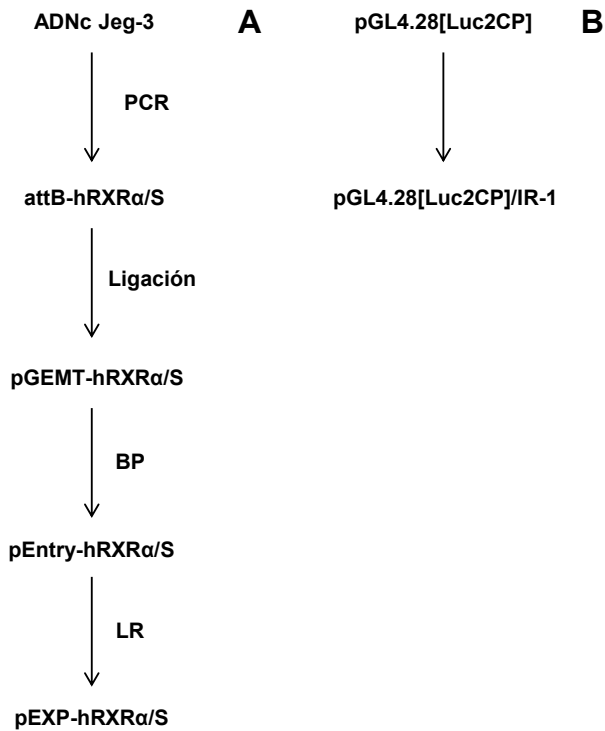


Figura MM-5. Esquema de los pasos seguidos para la clonación del receptor nuclear RXRα seguido de un codón STOP (S) (A) y de un elemento de respuesta IR-1 con secuencia consenso. Entre paréntesis se indican los “primers” utilizados en las reacciones de amplificación por PCR.

3.2.2- Cultivos celulares

3.2.2.1- Medios de cultivo

El medio de cultivo estéril para la línea celular CHO-K1 fue DMEM suplementado con: 50 mg/l de L-prolina, 3.7 g/l de bicarbonato sódico y 5.96 g/l Hepes.

El medio de cultivo estéril para las líneas celulares Alexander, Caco-2, HEK-293, HepG2, LS 174T y SK-Hep-1 fue MEM suplementado con: 110 mg/l de piruvato sódico y 2.2 g/l de bicarbonato sódico. El medio de cultivo para la línea celular Jeg-3 era el mismo suplementado con 293 mg/l de L-glutamina. La sublínea resistente al cisplatino LS 174T/R creció en presencia de una concentración de este fármaco de 10 μ M.

El medio de cultivo estéril para la línea celular HuH-7 fue DMEM suplementado con: 3.5 g/l de glucosa, 293 mg/l de L-glutamina, 2.2 g/l de bicarbonato sódico, 2.38 g/l de Hepes y 110 mg/l de piruvato sódico.

El medio de cultivo estéril para la línea celular BeWo fue F-12K suplementado con: 293 mg/l de L-glutamina y 2.2 g/l de bicarbonato sódico.

El medio de cultivo estéril para las líneas celulares HK-2 y JAr fue RPMI 1640 suplementado con: 293 mg/l de L-glutamina, 4.5 g/l de glucosa, 2.2 g/l de bicarbonato sódico, 2.38 g/l de Hepes y 110 mg/l de piruvato sódico.

El medio de cultivo para la línea celular MUM2C fue RPMI 1640 suplementado con: 117 mg/l de L-glutamina, 2 g/l de glucosa y 2 g/l de bicarbonato sódico.

A todos se les añadió 10% de suero bovino fetal inactivado. La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 min. También se añadió un 1% de una mezcla de antibióticos y antimicótico que contenía penicilina (100 U/ml), estreptomina (0.1 mg/ml) y anfotericina B (0.25 μ g/ml).

El medio de cultivo para las líneas celulares COLO 205, COR-L23, HuH-28, K562 y TFK1 fue RPMI1640 con GlutaMax.

El medio de cultivo para la línea celular EGI-1 fue DMEM, suplementado con: 2.2 g/l de bicarbonato sódico, 2.38 g/l de Hepes y un 1% de aminoácidos no esenciales.

El medio de cultivo para los hepatocitos humanos aislados de biopsias de pacientes fue una mezcla de DEM-Ham-F12 y William's E (1:1).

A estos medios se les añadió 10% de suero bovino fetal inactivado. También se añadió un 1% de una mezcla de antibióticos que contenía penicilina (100 U/ml) y estreptomina (0.1 mg/ml).

El medio de cultivo para las líneas celulares NHC-2, CCA 10402 y CCA 10417 fue DMEM F12 con GlutaMax suplementado con: 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de concentrado lipídico ("Chemically Defined Lipid Concentrate"), 1% de solución vitamínica MEM, 1% de mezcla lipídica ("Lipid Mixture 1 Chemically Defined"), 1% de un suplemento que contenía insulina, transferrina y selenio, 50 mg/l de inhibidor de tripsina de soja, 13.4 mg/l de extracto de pituitaria bovina, 0.393 mg/l de dexametasona, 3.4 mg/l de T3, 0.025 mg/l de EGF, 4 mg/l de forskolina, 5% de suero bovino fetal inactivado y 1% de una mezcla de antibióticos que contenía penicilina (100 U/ml) y estreptomina (0.1 mg/ml).

Tanto al recibir las células, como al recuperarlas del N₂ líquido en el que se almacenaban, la descongelación de los criotubos se hizo en condiciones de esterilidad en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 250 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se pasó a frascos Roux que se introdujeron en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO₂ en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa. Cuando se llegaba a confluencia del cultivo se realizaba una tripsinización (siguiendo las instrucciones del proveedor) para desprender las células de la placa de cultivo, y así, poder realizar los pases, sembrar las placas para los distintos tipos de experimentos o bien congelar alícuotas para su almacenamiento.

3.2.2.2- Cultivo de células para cuantificación absoluta del ARNm de FXR

Para la cuantificación absoluta de isoformas de FXR, las células se utilizaban en el segundo pase posterior a su descongelación. Se sembraban en placas de 6 cm de diámetro, a una densidad variable en función del tamaño y tasa de crecimiento de cada línea celular, y se dejaban crecer hasta una confluencia del 90-100%, cambiando el medio de cultivo cada 48 h. En el caso particular de las células Caco-2, los cultivos se mantuvieron en confluencia durante 21 días, tiempo tras el cual las células se encuentran diferenciadas (Campana et al., 2005; De Gottardi et al., 2004). Transcurridos los distintos tiempos de cultivo, las células se recogían y se procesaban para la extracción del ARN total, como se explica en el apartado 3.2.3.1.

3.2.2.3- Estudio del efecto de agonistas de FXR en células LS 174T y LS 174T/R

Las células LS 174T y LS 174T/R se sembraron en placas de 6 pocillos, a una densidad de 5.0×10^5 células/pocillo, para medidas de expresión de genes por RT-QPCR, y a 1.2×10^4 células/pocillo para los experimentos de viabilidad. Pasadas 24 h tras la siembra se añadían los compuestos indicados (ABs, compuestos tóxicos o GW4064), a la concentración deseada, disueltos en medio fresco. Por último, las células se incubaban a 37°C durante distintos tiempos en función de la finalidad del experimento (Figura MM-6 G): 24 h antes de recoger las células para la extracción de ARN total (apartado 3.2.3.1) o 72 h antes del procesamiento de las células para las medidas de viabilidad (apartado 3.2.7.3).

3.2.2.4- Estudio del efecto de agonistas de FXR en células HepG2 y HuH-7

Las células HepG2 y HuH-7 se sembraron en placas de 6 pocillos, a una densidad de 5.0×10^5 y 2.25×10^5 células/pocillo respectivamente, para medidas de expresión de genes por RT-QPCR, y a 1.0×10^5 y 4.5×10^4 células/pocillo respectivamente, para la determinación de ABs y proteínas. Pasadas 24 h tras la siembra se añadían los ABs a la concentración deseada, disueltos en medio fresco. Por último, las células se incubaban a 37°C durante 24 h (Figura MM-6 G) antes de recoger las células para la extracción de ARN total (apartado 3.2.3.1) y para la cuantificación de proteínas (apartado 3.2.7.4) y ABs (apartado 3.2.7.6).

3.2.2.5- Experimentos de transfección

La adquisición del transgén de interés por parte de una célula puede ser transitoria o estable. En el primer caso, el plásmido recombinante es extracromosómico y se pierde durante la división, mientras que en el segundo caso se integra en el genoma de la célula y se replica en cada división celular. En este trabajo, se utilizó la transfección transitoria de líneas celulares con “Lipofectamine™ LTX Reagent” y “Plus™ Reagent”.

En trabajos previos de nuestro grupo se han determinado las condiciones óptimas para realizar la transfección de las células utilizadas en esta Tesis Doctoral con el lípido catiónico Lipofectamina LTX, siendo la mezcla catiónica lipídica que conseguía mayor eficacia de transfección y menor toxicidad sobre las células la que contenía 4 μ l de Lipofectamina LTX y 1 μ l de Reactivo Plus por cada μ g de ADN.

Según el tipo de experimento se necesitó realizar transfección simple, doble, triple o cuádruple de líneas celulares de distinta procedencia, por lo que, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se introdujeron algunas modificaciones en el protocolo de transfección para ajustar la eficacia de transfección y la toxicidad (Tabla MM-3 y Figura MM-6).

Tabla MM-3. Cantidades de los reactivos requeridas para los distintos tipos de transfección.

Transfección	Placa (N° Pocillos)	ADN (ng)	ADN(ng) /Plásmido	OptiMEM (μ l)	R. Plus (μ l)	Lipofectamina (μ l)	Medio (μ l)
Simple	96	100	100	20	0.1	0.4	100
Simple	24	500	500	100	0.5	2	500
Simple	6	2500	2500	500	2.5	10	2000
Doble	96	100	50	20	0.1	0.4	100
Doble	6	2500	1250	500	2.5	10	2000
Triple	24	750	250	100	0.75	3	500
Triple	6	3750	1250	500	3.75	15	2000
Cuádruple	24	1000	250	100	1	4	500

La transfección se llevó a cabo en el momento adecuado para cada experimento, procurando que la confluencia del cultivo estuviera en torno al 60%, siguiendo el mismo

procedimiento. El ADN se diluía con medio OptiMEM a temperatura ambiente hasta un volumen determinado en función del tipo de placa (Tabla MM-3). A continuación se añadía la cantidad requerida de Reactivo Plus y se incubaba la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se añadía la Lipofectamina LTX y se incubaba la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo se sustituía el medio de cultivo de los pocillos por medio fresco completo y, pasados los 30 min, se añadía el volumen requerido de la mezcla catiónica lipídica final a cada uno de los pocillos. Las células se incubaban a 37°C en la estufa hasta el día siguiente, momento en el que se aspiraba el medio para retirar los complejos lípido-ADN y se añadía medio de cultivo fresco a los pocillos.

El protocolo experimental varió en función del tipo de estudio a realizar, según se recoge esquemáticamente en la Figura MM-6 y se explica detalladamente a continuación.

A. Evolución temporal de la expresión de los plásmidos transfectados

Las células Alexander se sembraron en placas de 6 pocillos con 2 ml de medio de cultivo a una densidad de 9.0×10^4 células/pocillo. Pasadas 48 h tras la siembra se procedía a realizar la transfección. Las células se recogían diariamente, desde el día en que se realizaba la transfección hasta 5 días después, y se procesaban para la extracción del ARN total como se explica en el apartado 3.2.3.1

B. Localización subcelular de isoformas de FXR por inmunofluorescencia

Las células se sembraron sobre cubreobjetos estériles dentro de pocillos de placas de 24 pocillos con 500 µl de medio de cultivo. La densidad de la siembra dependía de la línea celular siendo de 8.0×10^4 células/pocillo para las células HepG2, de 5.0×10^4 células/pocillo para las células Alexander, de 9.0×10^4 células/pocillo para las células LS 174T, de 4.0×10^4 células/pocillo para las células HEK-293, de 1.5×10^4 células/pocillo para las células MUM2C y de 4.5×10^4 células/pocillo para las células CHO-K1. Transcurridas 24 h desde la siembra se procedía a realizar la transfección y 48 h después, cuando la expresión transitoria de las proteínas que codificaban los plásmidos transfectados era máxima, los cubres se procesaban como se explica en el apartado 3.2.5.2.

C. Estudio de la actividad de las isoformas de FXR en células hepáticas e intestinales

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con 2 ml de medio de cultivo. La densidad de la siembra dependía de la línea celular, siendo de 9.0×10^4 células/pocillo para las células Alexander y de 2.0×10^5 células/pocillo para las células LS 174T. Pasadas 48 h tras la siembra se procedía a realizar la transfección y, 48 h después, se añadía a cada pocillo el compuesto deseado disuelto en 2 ml de medio fresco y se incubaban las placas durante 24 h, 48 h o 72 h, según el tipo de experimento. Las células se recogían a distintos tiempos, en función de la medida que se quisiera realizar, y se procesaban para la extracción del ARN total como se explica en el apartado 3.2.3.1. Si se quería medir la

expresión de los genes transfectados por RT-QPCR o WB (en cuyo caso las células se procesaban como se explica en el apartado 3.2.4.1), las células se recogían 48 h después de la transfección, justo antes de añadir los compuestos. Si se deseaba medir la expresión de otros genes, las células se recogían 24 h, 48 h o 72 h después de añadir los compuestos (Figura MM-6).

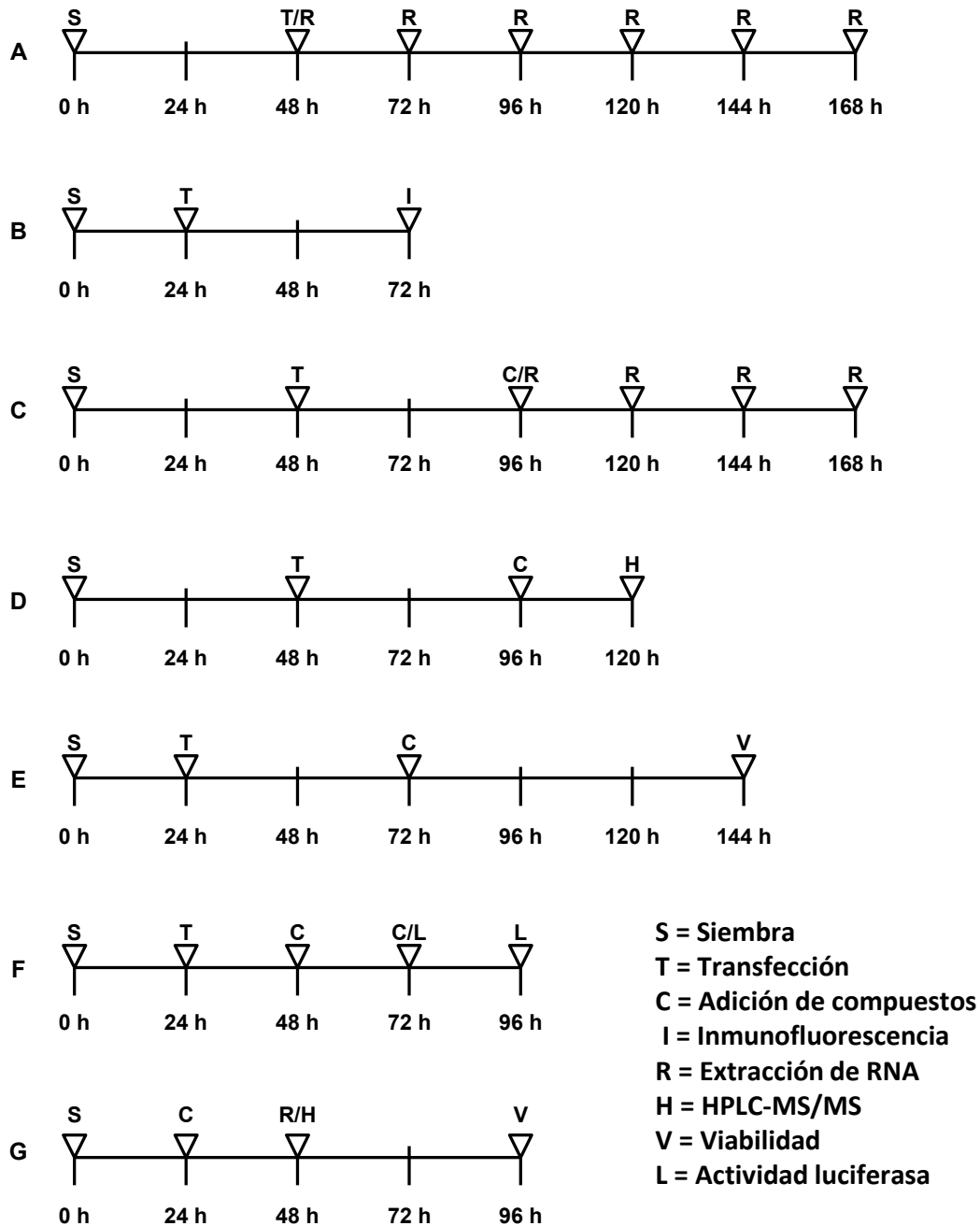


Figura MM-6. Esquema temporal de los experimentos con células transfectadas y con hepatocitos humanos y células sin transfectar. **A.** Estudio de la evolución de la expresión de los plásmidos transfectados. **B.** Estudio de la localización subcelular de isoformas de FXR por inmunofluorescencia. **C.** Estudio de la actividad de las isoformas de FXR en células hepáticas e intestinales. **D.** Experimentos para cuantificación de ABs por HPLC-MS/MS. **E.** Experimentos de viabilidad. **F.** Experimentos para medidas de actividad luciferasa. **G.** Experimentos en células LS174 T y LS 174T/R, HepG2, HuH-7 y hepatocitos humanos.

D. Experimentos para cuantificación de ácidos biliares por HPLC-MS/MS

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con 500 μ l de medio de cultivo. La densidad de la siembra dependía de la línea celular, siendo de 1.8×10^4 células/pocillo para las células Alexander y de 4.0×10^4 células/pocillo para las células LS 174T. Pasadas 48 h tras la siembra se procedía a realizar la transfección. Transcurridas 48 h desde la transfección se añadían los ABs disueltos en medio fresco y se incubaban las placas durante 24 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las células se recogían para la cuantificación de ABs y proteínas. En primer lugar se retiraba el medio y se lavaban los pocillos con PBS enfriado en hielo. Seguidamente se retiraba el PBS, se añadían 200 μ l de H₂O ultrapura enfriada en hielo, y se incubaban las placas, al menos 8 h, a 4°C. Pasado ese tiempo los pocillos se raspaban para despegar las células y su contenido se pasaba a un tubo eppendorf. A continuación el lisado celular se sonicaba durante 1 min a máxima potencia. Finalmente el contenido del eppendorf se dividía a partes iguales para la determinación de proteínas (apartado 3.2.7.4) y de ABs (apartado 3.2.7.6).

E. Experimentos de viabilidad en células transfectadas con FXR o BCRP

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con 100 μ l de medio de cultivo. La densidad de la siembra dependía de la línea celular siendo de 5.5×10^3 células/pocillo para las células Alexander y de 1.2×10^4 células/pocillo para las células LS 174T. Pasadas 24 h tras la siembra se procedía a realizar la transfección. Transcurridas 48 h desde la transfección se añadían los compuestos tóxicos y el agonista GW4064 disueltos en medio fresco y se incubaban las placas durante 72 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo las células se procesaban para las medidas de viabilidad como se explica en el apartado 3.2.7.3.

F. Experimentos de transfección para medidas de actividad luciferasa

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con 500 μ l de medio de cultivo. La densidad de la siembra dependía de la línea celular siendo de 1.8×10^4 células/pocillo para las células Alexander y de 6.0×10^4 células/pocillo para las células HepG2. Pasadas 48 h tras la siembra se procedía a realizar la transfección. Transcurridas 24 h (HepG2) o 48 h (Alexander) desde la transfección se añadían los compuestos disueltos en medio fresco y se incubaban las placas durante distintos tiempos a 37°C. Cuando se utilizaba cisplatino en el experimento, las células se incubaban 4 h, mientras que, cuando se utilizaban ABs, las células se incubaban 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación las células se procesaban para la medida de actividad luciferasa como se explica en el apartado 3.2.7.5.

3.2.2.6- Experimentos en hepatocitos humanos

Los hepatocitos humanos llegaban del Hospital Universitario Reina Sofía sembrados a una densidad adecuada para realizar los experimentos, en distintos tipos de placas: placas de 6 pocillos a una densidad de 7.5×10^5 células/pocillo para medidas de expresión

de genes por RT-QPCR, placas de 24 pocillos a una densidad de 1.5×10^5 células/pocillo para los experimentos de cuantificación de ABs o placas de 96 pocillos a una densidad de 1.2×10^4 células/pocillo para los experimentos de viabilidad. En todos los casos las células se incubaban 24 h después de la llegada a 37°C. Pasado ese tiempo se añadían los compuestos indicados (ABs, cisplatino o GW4064), a la concentración deseada, disueltos en medio fresco. Por último, las células se incubaban a 37°C durante distintos tiempos en función de la finalidad del experimento (Figura MM-6 G): 24 h antes de recoger las células para la extracción de ARN total (apartado 3.2.3.1) y para la cuantificación de proteínas (apartado 3.2.7.4) y ácidos biliares (apartado 3.2.7.6), o 72 h antes del procesamiento de las células para las medidas de viabilidad (apartado 3.2.7.3).

3.2.3- Análisis de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa

Para determinar los niveles de expresión de genes se utilizó una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986), la PCR cuantitativa a tiempo real. La PCR cuantitativa se realizó en el termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystem), utilizando como sistema de detección SYBR Green I (componente de la mezcla de reacción "SYBR Green PCR Master Mix") o, en el caso de la detección mediante de TLDAs, sondas Taqman®.

3.2.3.1- Extracción del ARN total

Para extraer el ARN total a partir de homogenados de tejido o de extractos celulares, se utilizó el kit comercial "illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit" (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido o 5.0×10^6 células, según el caso. El ARN total purificado se cuantificaba fluorimétricamente utilizando el método de RiboGreen (apartado 3.2.7.1).

La integridad del ARN extraído se comprobó mediante la visualización de las bandas del ARNr 18S y 28S, tras ser sometido a electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% (apartado 3.2.7.7). Se consideró que el ARN extraído no se había degradado si eran visibles, de forma nítida y localizada, las bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S.

3.2.3.2- Transcripción reversa (RT)

Para sintetizar el ADNc, que se usaría como molde en la PCR, se realizó una RT de 2 µg del ARN total extraído, utilizando el método comercial "SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit" (Invitrogen).

3.2.3.3- Tratamiento con la enzima de restricción *DpnI*

A la hora de determinar los niveles de expresión de proteínas que habíamos transfectado en líneas celulares, mediante RT-QPCR, nos encontramos con un problema. Al extraer el ARN total de las células transfectadas observamos que el kit "illustra RNAspin Mini

RNA Isolation Kit” aislaba el ARN mensajero sintetizado a partir del plásmido transfectado, pero también era capaz de aislar las copias del plásmido en cuestión que había dentro de las células, de forma que, al realizar la medida de PCR, estábamos cuantificando los niveles de ARN junto con los del plásmido, distorsionando por tanto la medida al alza.

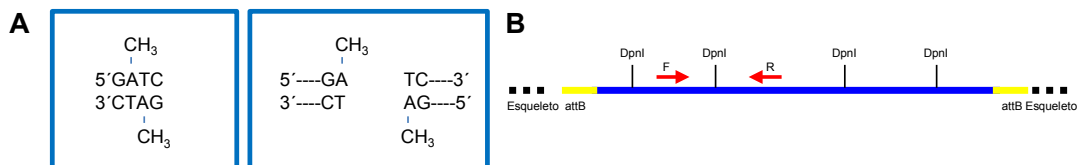


Figura MM-7. A. Secuencia reconocida por la enzima de restricción de *DpnI* y corte realizado por la misma. **B.** Esquema de la localización de los sitios de corte para *DpnI* y los “primers” utilizados en la RT-QPCR, en la ORF de RXR α clonada en el vector pEXP-RXR α -STOP.

Para eliminar este problema, al finalizar el proceso de retrotranscripción, las muestras se trataron con la enzima de restricción *DpnI*. Esta enzima, aislada del microorganismo *Diplococcus pneumoniae*, reconoce de forma específica secuencias de ADN GATC metiladas en la A, presentes de forma frecuente en el ADN plasmídico transfectado de procedencia bacteriana, pero no en el ADNc producido en la reacción de retrotranscripción. De esta forma, realizando la reacción de PCR con unos “primers” cuyo amplicón contenga un sitio de corte para *DpnI* (Figura MM-7) se consigue cuantificar únicamente el ARN mensajero transcrito a partir de los plásmidos transfectados, realizando una medida más exacta.

3.2.3.4- Diseño de cebadores

Los cebadores o “primers” específicos para el ADN codificante de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa “Primer Express” o mediante la aplicación “on-line” “Integrated DNA Technologies” (IDT). Los cebadores se diseñaron, en la medida de lo posible, a caballo entre dos exones codificantes utilizando como secuencia de referencia la secuencia del ARNm publicada en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) específica para cada gen.

Una vez diseñados, los cebadores fueron suministrados liofilizados por las casas comerciales Sigma-Genosys, Isogen o Biomers.net. Antes de su uso, se reconstituyeron en agua bidestilada y se valoraron por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

En la Tabla MM-4 se recogen las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la cuantificación relativa de la abundancia del ARNm de las diferentes proteínas estudiadas en este trabajo. El tamaño de los amplicones y los números de acceso de las secuencias diana para cada gen, publicadas en la base de datos GenBank, están detallados en la tabla.

Tabla MM-4. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-PCR cuantitativa.

Proteína	Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplificación (pb)	Número de acceso
BCL-2	<i>BCL-2</i>	GGAGGCTGGGATGCCTTTGT	AGGCATGTTGACTTCACTTGTTGGC	157	NM_000633
BCRP	<i>ABCG2</i>	CCCAGGCCCTATAGCTCAGATCATT	CACGGCTGAAACACTGCTGAAACA	83	NM_004827
BIRC5	<i>BIRC5</i>	CCAGATGACGACCCCATAGAGGAA	GCACCTTCTCCGCACTTCTCTCA	190	NM_001168
BSEP	<i>ABCB11</i>	GTGAAGGAATGGTGACCCGTGGA	TCCTTGCCAGCTTGGACTATGTCT	178	NM_003742
BTG1	<i>BTG1</i>	CAGGAGCTGCTGGCAGAACATT	AGCTCTGACTGCTCAGTCCAAT	149	NM_001731
CASP8	<i>CASP8</i>	TCTGCCTACAGGGTCAATGCTCTATC	TCCAGCAGGTTCAATGTCATCATCCA	128	NM_001080125
CCL14	<i>CCL14</i>	GTGCTGCTTACCTACACTACCTACAA	GGCCCTTTTGGTGATGAAGACAAT	113	NM_032962
CCL15	<i>CCL15</i>	AGGCCAGTTCAATAATGATGCAGAGA	GGGATGCTTTGTGAGATGTAGGAGGT	130	NM_032965
C/EBP β	<i>CEBPB</i>	GGCCGGTTTCGAAGTTGATGCAAT	AGCAACAAGCCCGTAGGAACATCT	134	NM_005194
cMYC	<i>MYC</i>	CAGCGACTCTGAGGAGGAACAA	ACTCTGACACTGTCCAACCTGACC	249	NM_002467
FAS	<i>FAS</i>	GCCCTGTCTCCAGGTGAAA	GGCTTTGTCTGTGTACTCTTCCC	103	NM_000043
FGF19	<i>FGF19</i>	GCGCACAGTTTGTGGAGATCA	AGTCTTCTCCGAGTACTGAAGCAG	134	NM_005117
FXR	<i>NR1H4</i>	ACAGAACAAGTGGCAGGTC	CTGAAGAAACCTTTACACCCCTC	368	NM_005123
GADD45A	<i>GADD45A</i>	GAGAGCAGAAGACCAGAAAGATGGATAA	ATCTGCAGAGCCACATCTCTGTC	193	NM_001924
GAPDH	<i>GAPDH</i>	TGAGCCCGCAGCCTCC	TACGACCAAATCCGTTGACTCC	138	NM_002046
IBABP	<i>FABP6</i>	GTTCAAGGCCACTGTGCAGAT	CTGCTTAGGCCAGTCTCTTGCT	155	DQ132786
KRT13	<i>KRT13</i>	AGCTCCGGGACAAGATCCTGA	CCAGCTCAATCTCACTTGTAGCCCTGAA	114	NM_153490
MDR3	<i>ABCB4</i>	CGAGGTTCCGAGGCTGAGATGGAT	TTGTGCTGATGCCAGTTCAAAG	100	NM_018850
MRP2	<i>ABCC2</i>	TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA	TTCAGATGCCCTGCCATTGGACCTA	171	NM_000392
MRP8	<i>ABCC11</i>	CGGTCTCCTTTATTCTCCACA	AGCCTCTTAAACTGGCTGATGAAGT	101	NM_032583
OATP1B1	<i>SLCO1B1</i>	TGCAATGGATTGAAGATGTTCTTGCCA	CAACCTTTTCCACTATCTCAGG	416	NM_006446
OATP1B3	<i>SLCO1B3</i>	GATTCAAGATGTTCTTGCCAGCCCT	CCATCAATTAACCAGCAAGAGAAGAGGA	136	NM_019844
OCT2	<i>SLC22A2</i>	CCCTTCAGCGCCTGAGACTT	TCACCTGCAAGGCCCATGT	177	NM_003058
OST α	<i>OSTα</i>	TTCCAGGTTCTCTCATCCTGAC	CAATTCACTACTTGAGACCTGGTTTT	122	NM_152672
OST β	<i>OSTβ</i>	TGGCAGCTGTGGTGGTCATT	TGGTGGCTGCATCGTTTCTT	83	NM_178859
p21	<i>CDKN1A</i>	GAGGAGGCGCCATGTCAGAA	ATTAGCGCATCACAGTCGCGG	124	NM_000389
p53	<i>TP53</i>	CCTGGATTGGCAGCCAGACT	AAATCATCCATTGCTTGGGACGGC	166	NM_000546
p62	<i>SQSTM1</i>	GTCTGAGGGCTTCTCGCACA	CCCCAACGTTCTTCCAGGAAATCACA	200	NM_003900
PRKDC	<i>PRKDC</i>	GCGGTGCTGGCATTACAGACAT	GGTGCATCTTCTGGCCATT	161	NM_006904
RAD51	<i>RAD51</i>	GCCATGATGGTAGAATCTAGGTATGCACT	CAAACCTCATCAGCAGTCCGAGAA	154	NM_002875
RAD51AP1	<i>RAD51AP1</i>	GCAGTGCCTTGTACAAAGATGGCTT	TGCACATTAGTGGTACTGTTGGAAGT	110	BC016330
RPL6	<i>RPL6</i>	CACAAAGAGGATGGCGGGTGA	TCTGGAATACATGGCAGATCGGGA	205	NM_001024662
RXR α	<i>NR2B1</i>	GACCCTGTACCAACATTTGCCA	GATGAGCAGCTCATTCAGCCT	144	NM_002957
SHP	<i>NR0B2</i>	GGCTTCAATGCTGTCTGGAGT	CTGGCACAACGGGGTTGAAGA	99	NM_021969
TFIIS	<i>TCEA1</i>	CCTGAGGCAAGAGAAGAAAGTACTTCCA	GCTGCAGCAAGCATCTCCCTA	152	NM_006756
TFIIS	<i>TCEA2</i>	TCGACTCCGAGGATCACCACATTT	CACGTGGTCATGGTCCGTCT	111	NM_003195
TFIIS	<i>TCEA3</i>	CCCTGAAGGCGGACGATGATTACA	CGGTAATCATGTCCGTGCTCTTGA	112	NM_003196
VEGFR	<i>KDR</i>	GCCTCTGTGGTTTGCCTAGT	TCCTCTGTCCCTGCAAGTAAT	116	NM_002253
XRCC5	<i>XRCC5</i>	GGAATAAGGCAGCTGTTGTGCTGTG	TCTCAGCAAACACTGTCGCTGTA	134	NM_021141
XRCC6	<i>XRCC6</i>	CCTGCGCCAAAGTGAGCAGTA	AGTCTCCACTTGTCTCAAGGTTCTCT	115	NM_001469

3.2.3.5- Realización de la PCR cuantitativa

Las condiciones de temperatura para la PCR fueron las mismas en todos los casos, excepto para la medida del número absoluto de copias de las distintas isoformas de FXR. Las muestras se incubaron primero 2 min a 50°C, seguidos de 10 min a 95°C, y por último, se sometieron a 40 ciclos de 15 seg a 95°C y de 1 min a 60°C.

Cuando diseñamos los “primers” para la cuantificación absoluta de isoformas de FXR nos encontramos con algunas dificultades, ya que debían localizarse en zonas muy específicas de la secuencia de FXR para cumplir su función, por lo que fue necesario incorporar un paso adicional para el correcto anillamiento de los “primers” entre los pasos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Éste consistía en 15 seg a temperatura variable en función de la pareja de “primers”. La temperatura óptima para cada pareja de “primers”, obtenida en los ensayos previos de puesta a punto, se muestra en la Tabla MM-5.

Tabla MM-5. Cebadores utilizados para la cuantificación absoluta de la expresión de las isoformas de FXR. Se muestra la temperatura (t^a) del ciclo de anillamiento óptima para cada pareja de primers.

Isoforma	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplicón (pb)	t ^a	Número de acceso
FXR	ACAGAACAAGTGGCAGGTC	CTGAAGAAACCTTTACACCCCTC	368	56°C	NM_005123
FXRα1	TTGAACATTCCTCCATTTACCTACCAC	CTGAAGAAACCTTTACACCCCTC	433	56°C	NM_005123
FXRα2	TATGAAGCCCGCGAAAGG	CTGAAGAAACCTTTACACCCCTC	393	56°C	NM_001206993
FXRα(-)	ACAGAACAAGTGGCAGGTC	TCAGTTAACAAGCATTACGCCA	512	65°C	NM_005123
FXRα(+)	ACAGAACAAGTGGCAGGTC	TGAATTTTCAGTTAACAAGCCTGTATACATA	530	56°C	NM_001206993

La abundancia del ADN problema se corrigió por la del de la GAPDH, determinado paralelamente en cada muestra. Las determinaciones se realizaron siempre por duplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el ADNc por agua bidestilada.

3.2.3.6- Cuantificación absoluta

Para la cuantificación absoluta se realizaron rectas de calibrado, utilizando diluciones seriadas a partir de una cantidad conocida de un fragmento ADNc de cada gen, obtenido por PCR a partir de los plásmidos en los que se clonó la secuencia de las 4 isoformas de FXR. Para ello, el tamaño de los productos de PCR se comprobó por electroforesis en gel de agarosa no desnaturante al 2,5% (apartado 3.2.7.7). La banda correspondiente al amplicón en cada caso se extrajo del gel y se purificó utilizando el kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, siguiendo las especificaciones del proveedor. Tras valorar por PicoGreen (apartado 3.2.7.2) la cantidad de ADN purificado, se calculó el número de copias/μl del amplicón utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de copias}/\mu\text{l} = ([\text{ADN}]/\text{Pm}) \times \text{N}$$

- [ADN]: concentración de ADN (ng/μl).
- Pm: peso molecular del amplicón calculado en función a su contenido en GC y AT.
- N: número de Avogadro (6.023×10^{23}).

Los resultados se expresaron como número de copias del gen de interés por cada 10^3 copias de la GAPDH.

3.2.3.7- Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se basa en el método de comparación de Ct. Se utiliza un control endógeno como elemento normalizador, de forma que, la relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno, nos dará un valor de Ct normalizado del gen diana. Este valor sirve para normalizar la cantidad de ADN añadido a la reacción y corregir variaciones en la cantidad de ARN de partida en la muestra. Para poder llevar a cabo este método y comparar los resultados, es necesario designar una muestra como calibrador, que es una muestra que sirve como base para comparar los resultados, es decir, a la que se le otorga el valor 1 de expresión. La cantidad de diana, normalizada frente al control endógeno, y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Para conseguir este valor es necesario realizar los siguientes cálculos:

- Calcular el Ct promedio de cada muestra para cada una de las dianas y del control endógeno (en cada placa se dispone de cada muestra por duplicado).
- Calcular ΔCt como Ct diana - Ct control endógeno.
- Calcular $\Delta\Delta Ct$ como ΔCt muestra - ΔCt calibrador/muestra control.

3.2.3.8- Tarjetas microfluídicas (TLDA)

Las tarjetas o placas microfluídicas ("Microfluidic Cards" o "Taqman Low Density Arrays", TLDA) son placas de 384 pocillos, comercializadas por Applied Biosystems en diversos formatos. Esta tecnología se basa en la PCR a tiempo real con las sondas Taqman de Applied Biosystems, pudiendo analizar una muestra por cada pocillo de la placa, es decir, 384 reacciones de PCR al mismo tiempo. Las ventajas que presenta son que se puede diseñar la placa a medida, en función de las necesidades que requiera el estudio que se pretenda realizar, y que el volumen de ADNc que se utiliza para cada reacción de PCR es mucho menor que en la PCR convencional en tubos. Es un método sensible, fiable, más barato que si se compran todas las sondas por separado y, sobre todo, muy rápido.

Las sondas Taqman vienen liofilizadas en cada uno de los pocillos y, en función del formato que se elija, se puede analizar la expresión de entre 12 y 384 genes diferentes. Por ejemplo, si se escoge el formato de 12, en la placa habrá 12 sondas y se podrán analizar 32 muestras por placa. En cambio, si se escoge el formato de 384, en la placa se tendrán 384 sondas diferentes y tan solo se podrá analizar una muestra por placa. En esta Tesis Doctoral se ha utilizado el formato 96 de las TLDAs, en el cual se escogieron 90 genes, 3 controles endógenos (ARNr 18S, GAPDH y β -actina) y 3 controles de las placas.

Repetición																										Puerto	
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A	1	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	B		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	C		
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	D		
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E	3	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	F		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	G		
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	H		
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I	5	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	J		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	K		
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	L		
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M	7	
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N		
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	O		
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		

Figura MM-8. Formato de las tarjetas microfluídicas utilizadas.

Como muestra la Figura MM-8, cada placa tiene 8 puertos por los que se cargan las muestras (en nuestro caso, cargamos 2 muestras por duplicado en cada placa). Para la reacción de PCR se mezclan cada uno de los ADNc obtenidos en la reacción de retrotranscripción con la mezcla “Taqman Master Mix”, y se cargan por cada uno de los 8 puertos de la placa. Una vez cargados todos los puertos, la placa se centrifuga 2 veces a 300 xg durante 1 minuto cada vez, para que toda la muestra se reparta entre los 48 pocillos que tiene cada puerto. Posteriormente se sella la placa y se lleva a cabo la reacción de PCR en el aparato AB Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

En estas tarjetas el análisis de los resultados únicamente se puede llevar a cabo mediante cuantificación relativa por comparación de Ct (apartado 3.2.3.7), utilizando los genes GAPDH y β -actina como controles endógenos. Para el análisis de expresión de los diferentes genes se utilizó la muestra control como calibrador.

3.2.4- Detección de proteínas por Western blot

3.2.4.1- Obtención de lisados celulares

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos tal y como se describe en el apartado 3.2.2. Cuando se llegó al punto del cultivo en el que las células debían ser recogidas, se despegaron de la placa mediante tripsinización y se incubaron con “buffer” RIPA suplementado con 1% (v/v) de un cóctel de inhibidores de proteasas. El lisado se

centrifugó durante 20 min a máxima velocidad a 4°C y el sobrenadante se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.2.4.2- Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Preparación de los geles

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles de poliacrilamida del 7.5% (p/v) en Tris-HCl utilizando el soporte del sistema “Mini-Protean II Cell”.

Preparación de las muestras

La concentración de proteínas de los lisados celulares se determinó por el método de Markwell (Markwell et al., 1978) (apartado 3.2.7.4). Posteriormente se desnaturalizaron durante 5 min en un baño de agua hirviendo.

Condiciones de la electroforesis y de la transferencia

La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de migración, a una corriente constante de 80 V para el gel concentrador, incrementándose a 100 V para el gel separador o de resolución.

La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó en una cubeta con tampón de transferencia, a una corriente de 250 mA durante 1 h y 30 min y en agitación constante.

Se utilizó “rojo ponceau” para comprobar que las proteínas se encontraban en la membrana tras la transferencia. Esta tinción también permite valorar la carga de proteínas en cada calle.

3.2.4.3- Inmunodetección

La membrana se sometió al siguiente procedimiento a temperatura ambiente: se realizaba el bloqueo durante 1 h con leche descremada al 5% (p/v) en PBS-T en agitación. Acto seguido se incubó durante 1 h con el anticuerpo primario correspondiente, también en agitación continua. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en leche descremada al 1% (p/v) en PBS-T (Tabla MM-6).

Tabla MM-6. Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por Western blot.

Antígeno	Nombre	Especie de origen	Dilución utilizada	Procedencia
FXR	ab56902	Ratón	1:500	Abcam
α -actinina	MAB1682	Ratón	1:1000	Chemicon International

Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-ratón marcado con peroxidasa. Para la detección se utilizó un método quimioluminiscente (ECL) y un equipo de análisis de imagen LAS-4000.

3.2.5- Detección de proteínas por inmunofluorescencia

3.2.5.1- Procesamiento de las muestras

Para el marcaje por inmunofluorescencia las células se sembraron en cubreobjetos estériles dentro de placas de cultivo de 24 pocillos y se mantuvieron en cultivo según se explica en el apartado 3.2.2.

3.2.5.2- Inmunodetección

Las muestras se fijaron con metanol frío durante 1 min y, tras 3 lavados rápidos con PBS, se realizó un bloqueo con suero bovino fetal al 5% en PBS durante 30 min.

La incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 5% de suero bovino fetal se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. La Tabla MM-7 muestra las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

Tabla MM-7. Anticuerpos primarios utilizados en la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

Antígeno	Nombre	Especie de origen	Dilución utilizada	Procedencia
FXR	H130	Conejo	1:200	Santa Cruz
V5	V5 mouse mAB	Ratón	1:500	Invitrogen

A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1 h en oscuridad, con el anticuerpo secundario apropiado en cada caso: anti-IgG de ratón o de conejo conjugados con Alexa 488® o Alexa 594® (dilución 1:1000) y con DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000).

3.2.6- Detección de proteínas por inmunohistoquímica

3.2.6.1- Obtención y preparación de las muestras

Los “microarrays” de tejido contenían 15 cortes de adenocarcinoma de colon y sus pareados de tejido sano de los márgenes de las piezas quirúrgicas, fijadas en formalina y embebidas en parafina. Las secciones fueron desparafinizadas en xileno y rehidratadas en una serie de soluciones etanólicas con graduación decreciente. Las muestras se incubaron con H₂O₂ 0.3% en metanol, durante 30 min a temperatura ambiente, para inhibir la actividad peroxidasa endógena. A continuación, se sometieron a calentamiento en medio de incubación a 96°C durante 20 min, para el desenmascaramiento de los antígenos.

3.2.6.2- Inmunodetección

El marcaje de las muestras se realizó con el kit comercial “Immunohistochemistry Accesory Kit”. Tras incubar las secciones con el reactivo de bloqueo durante 15 min, las secciones se incubaron durante 1 h con el anticuerpo policlonal de conejo H130 en dilución 1/100. A continuación, se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa durante 1 h. Tras otros 3 lavados con PBS, las muestras se incubaron con el substrato DAB durante 5 min. Finalmente, se tñieron con hematoxilina durante 1 min, se lavaron con agua destilada, se deshidrataron con una serie de soluciones etanólicas de graduación creciente y xileno, y se cubrieron con medio de montaje entellán.

3.2.7- Métodos analíticos

3.2.7.1- Valoración del ARN por el método del RiboGreen

El ARN total se valoró por fluorimetría utilizando el método comercial “RiboGreen RNA Quantitation Kit”. La técnica se basa en la unión específica de un fluorógeno (RiboGreen) al ARN, el cual emite fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de ARN presente en la muestra.

3.2.7.2- Valoración del ADN por el método del PicoGreen

Para cuantificar la cantidad de ADN de doble cadena se utilizó el método comercial “Pico-Green DNA-Quantitation Kit”, basado también en la unión de un grupo fluorógeno al ADN presente en la muestra.

3.2.7.3- Determinación de la viabilidad celular mediante el test de formazán

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. El formazán, soluble en medios acuosos, se forma a partir de sales de tetrazolio por la acción de deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas (Marshall et al., 1995). En este estudio se utilizó el kit comercial “CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” que contiene metasulfato de fenazina (PMS) y sal de tetrazolio (MTS).

3.2.7.4- Determinación de proteínas totales

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry (Lowry et al., 1951) realizada por Markwell (Markwell et al., 1978), basado en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas.

3.2.7.5- Determinación de la actividad luciferasa

Para generar luz, la luciferasa de luciérnaga requiere luciferina, ATP, Mg^{2+} y oxígeno molecular. El sistema "Bright-Glo" permite analizar la actividad luciferasa de luciérnaga de forma rápida y sencilla con una producción de luz mucho mayor que otros reactivos, por lo que se eligió para analizar la actividad de la luciferasa de luciérnaga inestable (Luc2CP) utilizada en estos estudios.

Una vez terminado el protocolo experimental descrito en el apartado 3.2.2, las placas se sacaban de la estufa y se incubaban durante 10 min para equilibrar la temperatura a la del ambiente. A continuación, se aspiraba el medio de cultivo de los pocillos y se añadían 50 μ l de medio de cultivo sin suero ni antibiótico y 50 μ l de la solución "Bright-Glo" que contenía una solución detergente y los sustratos necesarios para la luciferasa. Tras incubar la placa durante 2 min a temperatura ambiente, para permitir una completa lisis celular, el contenido de los pocillos se transfería a una placa de 96 pocillos de plástico negro opaco, para que la luz emitida por unos pocillos no interfiriera la lectura de los otros.

La luz se medía en un equipo de análisis de imagen LAS-4000. La captura de imágenes se llevó a cabo con la cámara refrigerada del equipo, sin filtros y con una apertura del diafragma del objetivo de f0.8. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0. Los resultados se expresaron como porcentaje de luz en los pocillos en las diferentes condiciones experimentales respecto a los controles.

3.2.7.6- Análisis de ácidos biliares por HPLC-MS/MS

El método utilizado fue una modificación del descrito por Ye y colaboradores (Ye et al., 2007).

Para la separación cromatográfica se empleó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m, termostatzada a 35°C. Se utilizó un método de elución en gradiente usando como fase móvil una mezcla de metanol y agua, conteniendo ambos 5 mM de acetato amónico y 0.01% de ácido fórmico, pH 4.6. Se comenzó a trabajar con 80:20 de metanol/agua y se fue incrementando la concentración de metanol en la mezcla hasta el 97%, de manera lineal durante 9 min, para retornar a la proporción inicial en 1 min y mantenerla durante los últimos 5 min del análisis. El flujo de trabajo fue de 0.5 ml/min.

La determinación de los ABs en el triple cuadrupolo se llevó a cabo utilizando ionización negativa, para obtener los aniones moleculares de cada una de las especies moleculares analizadas. Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas (N_2) 350°C, flujo del gas 8 ml/min, presión del nebulizador 10 psi, voltaje 2.500 V. Se empleó el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica de cada uno de los iones precursores (ión molecular - H^+) a los respectivos iones producto resultantes. En el caso de los ABs tauroconjugados se monitorizó el ión producto 80.2 m/z, correspondiente al

grupo SO_3^- de la taurina; para los glicoconjugados se siguió el ión 74 m/z, correspondiente a la glicina desprendida en su fragmentación. Desafortunadamente, en el caso de los ABs libres no fue posible fragmentar el ión molecular obteniendo iones hijos característicos, como ya habían observado otros autores (Ye et al., 2007). Por ello, se siguió la transición de ión molecular a ión molecular, por ejemplo, de 391.3 m/z a 391.3 m/z en el caso del AQDC.

Se construyeron rectas patrón para cada una de las especies moleculares de ABs mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de cada AB entre 0.1 y 25 μM . En el caso de las muestras, tras llevar a cabo el procesamiento explicado en el apartado 3.2.2.5, se mezclaron 100 μl del lisado celular con 50 μl de norADC 3 μM y se centrifugaron durante 2 min a 20.000 xg antes de su inyección en el cromatógrafo. El volumen de inyección fue de 2 μl .

Se corrigió la concentración de cada AB, calculada a partir de su recta patrón, por la recuperación obtenida para el estándar interno norADC, que se detectó siguiendo la transición específica de 377 m/z a 331.3 m/z.

3.2.7.7- Analisis de ARN y ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

Geles de agarosa desnaturalizantes

Para la preparación del gel se utilizó agarosa al 1% (p/v) con tampón MOPS 10x (10% v/v) y el formaldehído al 37% (18% v/v). La electroforesis se llevó a cabo en presencia de tampón MOPS 1x. Las muestras y el marcador de tamaños moleculares de ARN (0,5-10 kb) se mezclaron con un volumen de solución de carga desnaturalizante (formamida 95% (p/v), azul de bromofenol 0.025% (p/v), xileno cianol 0.025% (p/v), AEDT 18 mM y SDS 0.025% (p/v)) que contenía bromuro de etidio al 0.008% y se calentaron a 75°C durante 10 min.

Geles de agarosa no desnaturalizantes

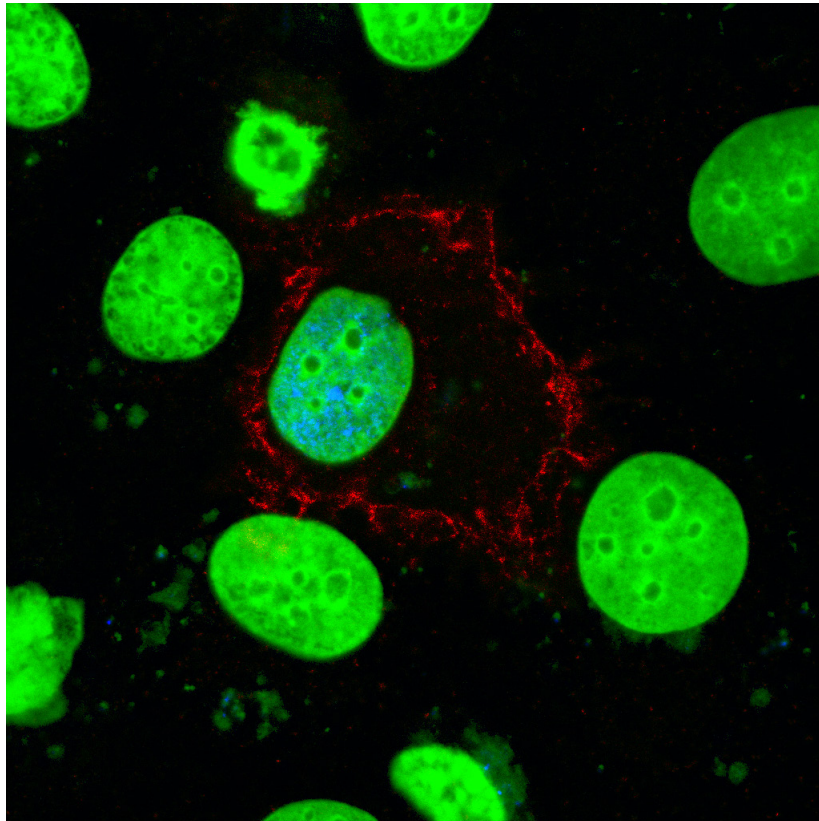
Para la preparación del gel se utilizó agarosa disuelta en TAE 1x al 1 o 2.5% (p/v), en función de los tamaños moleculares de las muestras a analizar. Se añadía reactivo SYBR Green I hasta conseguir una concentración 1/10.000 (v/v). El gel se colocaba en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con 0.1 volúmenes de solución de carga (sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0.25 % (p/v) y xileno cianol 0.25 % (p/v)) antes de depositarlas en el gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se emplearon los estándares de 25 pb, 100 pb, 500 pb o 1 kb plus, según los casos. El gel se visualizaba en el equipo de análisis de imagen LAS-4000.

3.2.8- Análisis estadístico

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM).

Para calcular la significación estadística de la comparación entre dos medias se utilizó el test de la t de Student o el test de t de Student de valores apareados, según el caso. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

El análisis estadístico se realizó en un ordenador Macintosh G5 (Apple Computer, Inc., Cupertino, EE.UU.).



“Nunca te das cuenta de lo que ya has hecho; sólo puedes ver lo que te queda por hacer.”

Marie Curie

4. Resultados y Discusión

4.1- CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES E IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LAS ISOFORMAS DE FXR

El descubrimiento de que los ácidos biliares (ABs) llegan al núcleo de las células hepáticas, donde se localizan en regiones de elevada tasa de transcripción (Monte et al., 2008), y de que son capaces de interactuar con diferentes receptores de membrana y nucleares, ha llevado al reconocimiento de que estos esteroides no son meramente unos detergentes necesarios en el proceso digestivo de las grasas de la dieta, sino que contribuyen como moléculas de señalización en el control del metabolismo lipídico y glucídico (Claudel et al., 2005), y de otros procesos de diversa índole (apartado 2.4).

El receptor más importante de estas moléculas es el receptor nuclear FXR, que se expresa principalmente a nivel enterohepático, pero también en otros tejidos (Huber et al., 2002). Al ser activado, FXR pone en marcha numerosos mecanismos implicados en la regulación de genes que intervienen en el transporte y metabolismo del colesterol y los ABs. Además, cada vez se descubren más funciones en las que este receptor está implicado y que resultan sorprendentes, como su papel en los vasos sanguíneos en aspectos relacionados con el desarrollo de arterioesclerosis (Mencarelli et al., 2009) o su implicación en la liberación de insulina por las células beta de los islotes pancreáticos (Renga et al., 2010). Esto hace que el conocimiento de la biología de este receptor nuclear sea muy importante, puesto que es necesario para el desarrollo de nuevas terapias que podrían ser útiles en el tratamiento de diversas patologías relacionadas con el metabolismo lipídico y glucídico, como la colestasis, la arterioesclerosis o incluso la diabetes mellitus.

La existencia de distintas isoformas de este receptor nuclear no es un evento reciente en términos evolutivos, como demuestra la aparición de dos isoformas, con extremos N-terminales diferentes, en *Oryzias latipes* (Howarth et al., 2010), un pez teleosteo. Del mismo modo, se ha descrito la presencia de varias isoformas de FXR en cerdo (Gray et al., 2010), hámster, rata, ratón (Zhang et al., 2003) y humanos (Huber et al., 2002). En humanos, la expresión del gen *NR1H4* puede dar lugar a cuatro isoformas diferentes de FXR que parecen tener cierta especificidad de tejido (Huber et al., 2002). Hasta ahora las isoformas de FXR se han clasificado utilizando una nomenclatura variable y confusa. En un intento de unificarla y darle un sentido estructural, en este trabajo se denominarán FXR α 1(+), FXR α 1(-), FXR α 2(+) y FXR α 2(-). La principal diferencia reside en el origen de transcripción del ARNm, que puede iniciarse en el exón 1, dando lugar a las isoformas FXR α 1, o en el exón 3, dando lugar a las isoformas FXR α 2, lo que se traduce en secuencias proteicas con extremos N-terminales diferentes (Figura RD-1). La otra diferencia es la presencia (+) o ausencia (-), por procesos de “splicing” alternativo, de un inserto de 12 pares de bases al final del exón 5 (cuya secuencia proteica es MYTG), que da lugar a las variantes FXR α (+) y FXR α (-).

A pesar de haber sido descritas en diferentes organismos y de mostrar diferencias de expresión en función del tejido, se conoce muy poco del posible papel funcional de las distintas isoformas de FXR en los procesos regulados por este receptor nuclear, así como

de si condicionan en alguna medida la localización subcelular del mismo, que se presume nuclear.

El primer objetivo de este trabajo fue, por tanto, profundizar en el estudio de diferentes aspectos del papel fisiológico de las distintas isoformas de FXR, como su expresión en tejidos extrahepáticos, su localización subcelular y su funcionalidad, así como el papel de las diferentes especies moleculares de ABs como ligandos de este receptor nuclear.

4.1.1- Cuantificación absoluta de la expresión de FXR y sus isoformas

Entre los trabajos publicados hasta el momento, sólo el de Huber y colaboradores muestra medidas de expresión de isoformas de FXR en varios tejidos humanos (Huber et al., 2002). Sin embargo, en dicho trabajo se presentan datos de expresión relativa de isoformas FXR α 1 y FXR α 2 con respecto a hígado, lo que no da una idea de la expresión total de este receptor nuclear, ni de la relación entre isoformas, en los diferentes tejidos. Además, tampoco se dan valores de expresión de las isoformas FXR α (+) y FXR α (-). Por todo ello, el primer paso de nuestro trabajo fue poner a punto un método que nos permitiera cuantificar de forma absoluta la expresión total de FXR y sus isoformas en distintos tejidos humanos. Del mismo modo, decidimos analizar su expresión en líneas celulares humanas derivadas de diferentes tejidos, ya que, aunque se ha descrito la expresión de FXR en ciertas líneas celulares como HepG2 o HuH-7 (Fujino et al., 2012), no se conoce el tipo de isoformas que expresan.

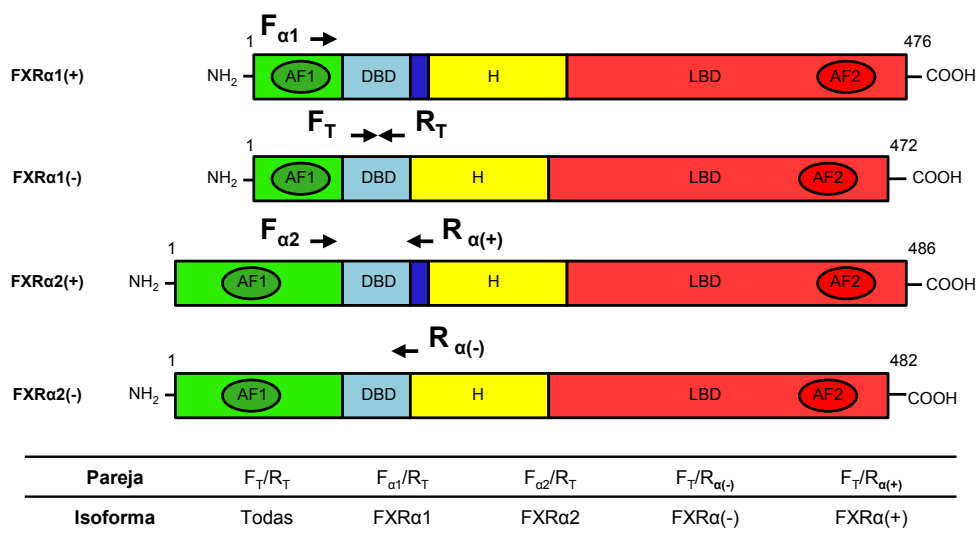


Figura RDI-1. Esquema de la localización aproximada de los “primers” utilizados para la cuantificación absoluta de la expresión de las isoformas de FXR. Se muestran las combinaciones de los mismos que se utilizaron para la medida de las distintas isoformas.

En la Figura RD-1 se muestra la localización aproximada de los “primers” utilizados para la cuantificación absoluta, en un esquema representativo de las 4 isoformas de FXR con sus respectivos dominios. Se puede observar como los “primers” específicos para medir las isoformas FXR α 1 y FXR α 2 se colocaron en la región del ARN que codifica para los dominios N-terminales característicos de cada isoforma (F α 1 y F α 2), y los “primers” utili-

zados para medir las isoformas FXR α (+) y FXR α (-) se colocaron en la región del ARN que codifica para el inserto de 4 aminoácidos MYTG (R α (+)), en las isoformas FXR α (+), o en la misma zona que carece del inserto (R α (-)), en las isoformas FXR α (-). Además, se utilizaron dos “primers”, un “forward” (F \uparrow) y un “reverse” (R \uparrow) en zonas comunes a las 4 isoformas. De esta forma, combinando los distintos “primers” se utilizaron parejas que nos permitieron determinar la expresión de todas las isoformas (Figura RD-1).

En la Figura RD-2 se muestran los niveles totales de FXR en número de copias por cada 1000 copias de GAPDH (A) y la proporción de las isoformas FXR α 1/FXR α 2 (B) y FXR α (+)/FXR α (-) (C) en porcentaje, en las muestras analizadas utilizando estas parejas de “primers”. Las proporciones de isoformas sólo se analizaron en muestras que expresaban niveles totales superiores a 5 copias.

Los resultados muestran unos niveles de expresión totales, así como un patrón de expresión de isoformas distinto en función del tejido y la línea celular. Los niveles de FXR en hígado sano eran de 4270 copias por cada 1000 copias de GAPDH. El patrón de isoformas FXR α 1/FXR α 2 muestra una clara predominancia de las primeras (80%/20%) en este tejido, mientras que las isoformas FXR α (+)/FXR α (-) están en proporción aproximada del 50%/50%. Aunque no se disponía de hepatocitos recién aislados, sí que se pudo analizar la expresión de FXR y sus isoformas en hepatocitos humanos cultivados varios días después de su obtención a partir de las biopsias. La expresión total en estas células variaba con los días de cultivo, como se mostrará más adelante, pero la relación de ambos tipos de isoformas no se modificaba con respecto al hígado sano. En lo referente a las líneas celulares derivadas de tumores hepáticos tales como hepatocarcinoma (HCC), hepatoma o hepatoblastoma (HB), encontramos que las líneas celulares HuH-7 y HepG2 expresaban niveles totales de FXR similares a los de hígado (5728 y 3837 copias, respectivamente), mientras que las líneas SK-Hep-1 y Alexander presentaban niveles prácticamente nulos de este receptor nuclear (\approx 1 copia). Curiosamente, las líneas celulares HuH-7 y HepG2 mostraban una predominancia absoluta de isoformas FXR α 1 (99% y 100%, respectivamente), mientras que conservaban la relación 50/50 del tejido sano en cuanto a las isoformas FXR α (+)/FXR α (-).

El análisis de las líneas celulares derivadas de colangiocarcinoma (CC) reveló datos interesantes (Figura RD-2). Todas expresaban niveles totales de FXR claramente inferiores a los de hígado sano, al igual que la línea celular NHC2, derivada de colangiocitos humanos sanos. Además, todas ellas mostraban una proporción de isoformas FXR α (+)/FXR α (-) cercana al 50/50. Sin embargo, la relación de isoformas FXR α 1/FXR α 2 variaba en función de la procedencia del colangiocarcinoma del que derivaba la línea celular, de forma que las líneas derivadas de colangiocarcinoma intrahepático, CCA 10402 y HuH-28, tenían predominancia de isoformas FXR α 1, al igual que el hígado y los colangiocitos sanos (NHC2), mientras que las líneas derivadas de colangiocarcinoma extrahepático, EGI-1 y TFK-1, presentaban predominancia de isoformas FXR α 2. Curiosamente, la línea celular CAA 10417, de procedencia intrahepática, mostraba una relación de isoformas FXR α 1/FXR α 2 cercana al 50/50.

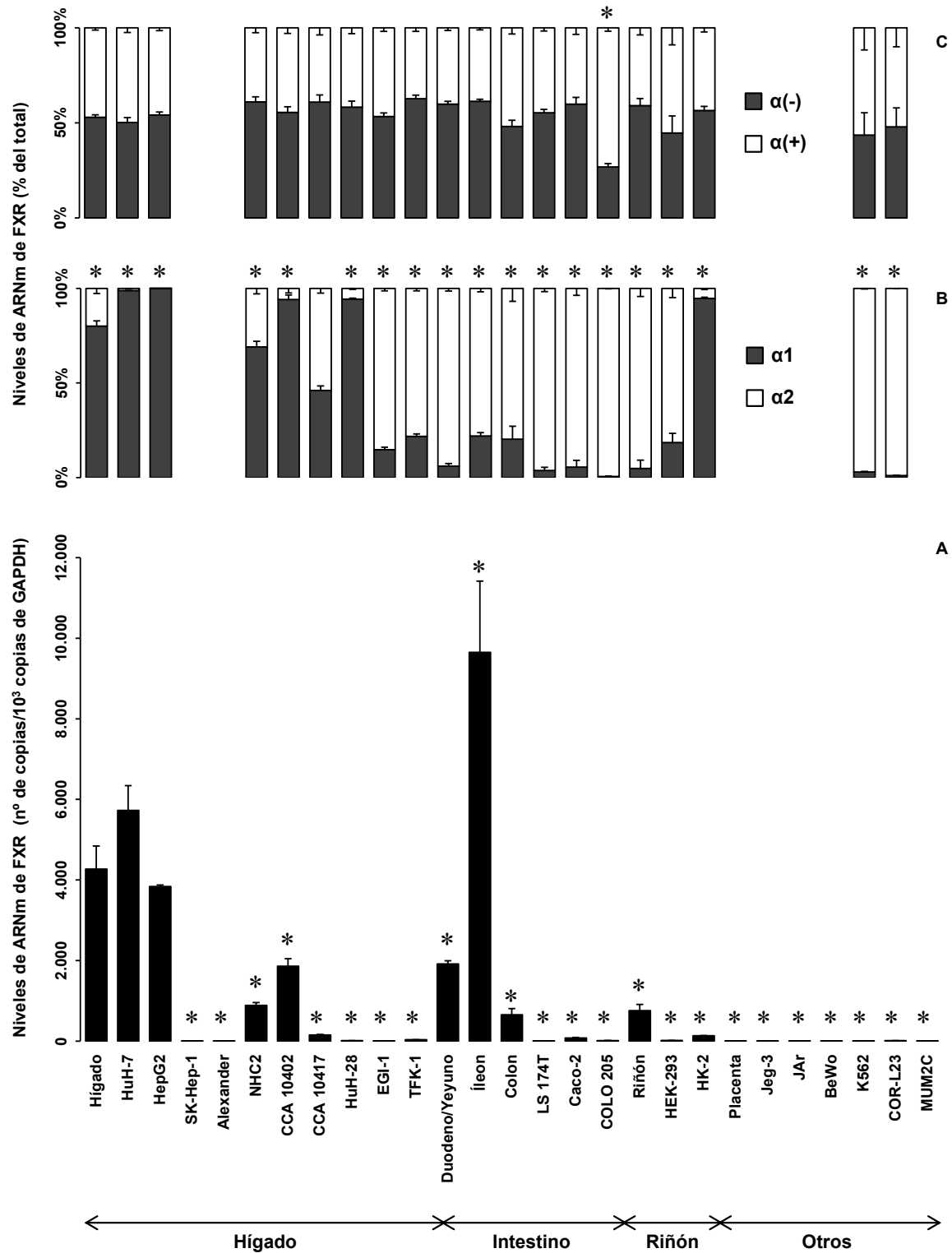


Figura RD-2. Cuantificación absoluta de los niveles totales de ARNm de FXR (A) y de las proporciones de sus isoformas (B y C) en muestras de tejidos y líneas celulares relacionadas con el metabolismo de los ácidos biliares (hígado, intestino y riñón) o no (otros). Los valores se expresan como media ± EEM de al menos 3 muestras (biopsias) o 3 cultivos. *, p<0.05, comparando con los niveles de hígado (A) o comparando los niveles de isoformas FXRα1/2 (B) o FXRα(+/-) (C) entre sí.

La expresión total de FXR en las muestras intestinales se modificaba en función de su procedencia (Figura RD-2). En los primeros tramos del intestino delgado, duodeno y ye-

yuno, la expresión era aproximadamente la mitad que en hígado sano (1917 copias), pero en el íleon la expresión aumentaba hasta niveles muy superiores a los de hígado (9653 copias), para después volver a disminuir en intestino grueso a niveles inferiores incluso a los de duodeno y yeyuno, como son las 655 copias correspondientes al colon. En cuanto a las líneas celulares intestinales analizadas (LS 174T, Caco-2 y COLO 205), todas ellas expresaban niveles muy bajos de FXR, siendo las 79 copias de las células Caco-2 el valor más alto encontrado. Cuando se analizó la proporción de isoformas en estas muestras, se observó una clara predominancia de isoformas FXR α 2, tanto en líneas celulares como en los tejidos, y una tendencia a la proporción 50/50 de isoformas FXR α (+)/FXR α (-), excepto en la línea COLO 205, en la que se observó un desplazamiento hacia las formas con inserto FXR α (+).

Las muestras de riñón mostraron bastante similitud con las de colon en la expresión de este receptor nuclear. Los niveles totales eran similares (758 copias) y se observó una predominancia de isoformas FXR α 2 y, de nuevo, cantidades equivalentes de isoformas FXR α (+)/FXR α (-). Sin embargo, en las dos líneas derivadas de tejido renal se obtuvieron resultados inesperados, puesto que, aunque se mantenía la proporción próxima al 50/50 de isoformas FXR α (+)/FXR α (-), las células HEK-293 mostraban una clara predominancia de isoformas FXR α 2, mientras que en las HK-2 había una mayor proporción de isoformas FXR α 1. En cuanto a los niveles totales, las dos líneas celulares presentaban una expresión de FXR mucho menor que el tejido de partida, con 16 copias para las células HEK-293 y 133 copias para las HK-2.

Además de los ya mencionados, decidimos analizar la expresión de FXR en otro órgano implicado en el transporte de ABs, como es la placenta. El hígado fetal es capaz de sintetizar y conjugar ABs primarios a partir del colesterol (Nakagawa y Setchell, 1990), pero los procesos de excreción del hígado y riñón fetales son bastante inmaduros, por lo que es la placenta la encargada de deshacerse de estos compuestos (Macias et al., 2009). Sin embargo, tanto en las muestras de placenta humana (2 copias), como en las tres líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano analizadas (Jeg-3, JAr y BeWo), se encontraron niveles casi indetectables de FXR.

Por último, analizamos también tres líneas celulares derivadas de tejidos que, en principio, no están relacionadas con el metabolismo y/o transporte de ABs. Tanto las células K562, derivadas de leucemia mieloide crónica, como las COR-L23, derivadas de carcinoma de pulmón, mostraron niveles muy bajos de FXR (7 y 13 copias, respectivamente), mientras que las MUM2C, derivadas de melanoma, presentaban niveles indetectables de este receptor nuclear. En lo referente a las isoformas, tanto las K562 como las COR-L23 mostraron una dominancia casi completa de las isoformas FXR α 2 (97% y 99%, respectivamente) y una proporción cercana al 50/50 de isoformas FXR α (+)/FXR α (-).

El estudio llevado a cabo aporta algunos datos interesantes con respecto a la expresión de FXR. En primer lugar, el hígado, el órgano encargado de la síntesis y conjugación de los ABs, de su secreción a la bilis y de su destoxicación en situaciones patológicas, no

es el órgano con la mayor expresión de este receptor nuclear, sino que ésta es mayor en el intestino delgado, concretamente en íleon. Si tenemos en cuenta las funciones de FXR, este dato no resulta tan sorprendente, puesto que en este tramo del intestino es donde se produce la reabsorción de la mayoría de los ABs que recirculan por el sistema enterohepático. Además, se ha demostrado claramente el papel predominante del íleon en la regulación de la síntesis de los ABs a través de la ruta FGF-19/FGFR4 (Inagaki et al., 2005). Aunque por detrás del íleon, el hígado expresa niveles muy elevados de este receptor nuclear, por encima del resto de tejidos analizados. En este sentido, el riñón, el órgano encargado de eliminar productos de destoxicación de ABs procedentes de reacciones llevadas a cabo por enzimas como la CYP3A4 o la SULT2A1, expresa niveles mucho menores que los de hígado, aunque probablemente suficientes para regular de forma eficiente la expresión de los transportadores implicados en la excreción de los ABs a la orina en situaciones patológicas. Curiosamente, la placenta, un órgano que a priori parecería un buen candidato para expresar FXR, puesto que se encarga de regular el transporte transplacentario de ABs entre la madre y el feto (Macias et al., 2009), presenta niveles despreciables de este receptor nuclear, por lo que deben ser otros receptores los encargados de regular el paso de los ABs del feto a la madre para su posterior eliminación. Entre ellos, el principal candidato es TGR5, también activado por ABs (Kawamata et al., 2003) y cuya expresión en placenta ha sido previamente descrita por nuestro grupo en un trabajo que formó parte del Trabajo de Grado de la Licenciada Elisa Lozano Esteban (Lozano, 2000). En cuanto a las líneas celulares, parece que la procedencia no determina necesariamente los niveles de expresión de FXR, ya que, por ejemplo, células como las HuH-7 y las SK-Hep1, ambas derivadas de carcinoma hepatocelular, muestran una expresión superior a la del hígado sano (HuH-7) o prácticamente nula (SK-Hep-1). Del mismo modo, las diferentes líneas derivadas de colangiocarcinoma analizadas mostraron niveles muy variables de este receptor nuclear. Por último, no resultó sorprendente encontrar niveles detectables, aunque muy bajos, de FXR en las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide crónica (K562) y adenocarcinoma de pulmón (COR-L23), puesto que se ha descrito la presencia de este receptor nuclear en células del sistema inmune (Renga et al., 2009; Schote et al., 2007), así como en células endoteliales de pulmón (Zhang et al., 2012).

En cuanto a las proporciones de las isoformas de FXR, se observó una expresión claramente tejido-dependiente de las isoformas FXR α 1 y FXR α 2. Según nuestros resultados, las células que integran el hígado (hepatocitos y colangiocitos intrahepáticos) expresan la isoforma FXR α 1 en mayor proporción, mientras que las células del resto de tejidos analizados (diferentes partes de intestino delgado y grueso, riñón, así como líneas celulares derivadas de éstos y otros tejidos) expresan en mayor medida la isoforma FXR α 2. Nuestro estudio podría completarse con el análisis de otros tejidos en los que se ha detectado también FXR, como las glándulas adrenales que, según se ha publicado, expresan en su mayoría isoformas FXR α 1 (Huber et al., 2002; Lee et al., 2006), u otras partes del tracto gastrointestinal, ya que parece que las líneas de cáncer gástrico en las que se ha detectado FXR expresan principalmente la isoforma FXR α 2 (Lian et al., 2011). Además, podría hacerse un análisis más exhaustivo de las células integrantes de cada órgano, ya que en nuestro caso

las líneas derivadas de colangiocitos expresan distintas isoformas dependiendo de que su localización sea intrahepática o extrahepática. Del mismo modo, la línea celular HK-2, derivada de células epiteliales del túbulo proximal del riñón, expresa principalmente la isoforma FXR α 1, mientras que las biopsias de riñón expresan en mayor medida la isoforma FXR α 2, por lo que puede ocurrir que distintos tipos celulares del mismo órgano expresen distintas isoformas de FXR y que al analizar la expresión en una biopsia aparezca como predominante la isoforma expresada por el tipo celular más abundante en la muestra.

En cualquier caso, la existencia de un patrón de isoformas FXR α 1/FXR α 2 tejido-dependiente parece lógica, puesto que su expresión está controlada por dos promotores distintos, localizados aguas arriba de los exones de inicio de cada isoforma. Actualmente hay muy pocos datos publicados acerca de la regulación de estos promotores. Se sabe, por ejemplo, que el factor de transcripción HNF1 α es capaz de regular la expresión de FXR por medio de la unión a sitios específicos localizados en el promotor localizado aguas arriba del exón 1 (Lou et al., 2007), correspondiente a la isoforma FXR α 1, la expresada por la línea celular HepG2, en la que se realizó ese trabajo. También se sabe que el interferón es capaz de inhibir la expresión de FXR en macrófagos por medio de la activación de STAT1 (Renga et al., 2009), que posee un sitio de unión en el intrón localizado entre los exones 2 y 3, por lo que podría actuar como un elemento regulador localizado aguas abajo del promotor de la isoforma FXR α 1 o aguas arriba del de la isoforma FXR α 2.

Por el contrario, todos los tejidos y líneas celulares analizadas mostraron la misma distribución de isoformas FXR α (+)/FXR α (-), con cantidades próximas al 50% de cada una, excepto las células COLO-205, en las que la relación se desvió hacia un predominio de las isoformas FXR α (+). Por tanto, parece que la expresión de las isoformas con o sin inserto es independiente de tejido.

Al investigar más a fondo la secuencia del gen de FXR encontramos una posible explicación a este hecho. Los dos tipos de intrones más habituales presentes en los ARNm transcritos a partir del ADN genómico de eucariotas son los de tipo GU-AG y AU-AC (o GT-AG y AT-AC en el ADN). El intrón localizado entre los exones 5 y 6 del gen *NR1H4*, cuyo corte y empalme alternativo da lugar a la presencia o ausencia del inserto de 12 nucleótidos (que a su vez codifica para los aminoácidos MYTG) es del tipo GT-AG (Figura RD-3). Además, justo después de la secuencia del inserto (subrayada en la Figura RD-3) existe una secuencia GT alternativa, de forma que la utilización de una u otra secuencia GT en el extremo 5', del intrón con la misma secuencia AG en el extremo 3', daría lugar a la presencia o ausencia del inserto en el ARNm maduro. Por tanto, podríamos pensar que la aparición del inserto es un mecanismo meramente aleatorio y que el espliceosoma, el complejo macromolecular encargado de eliminar los intrones de los ARN inmaduros, es capaz de utilizar las dos secuencias GT sin ningún tipo de discriminación, de forma que al final se obtiene la misma cantidad de FXR con o sin inserto, o lo que es lo mismo, una proporción del 50% de isoformas FXR α (+)/FXR α (-).

```

GTTTCTTCAGGAGAAGCATTACCAAAAACGCTGTGTACAAGTG
TAAAAACGGGGGCAACTGTGTGATGGATATGTACATGCGAAG
AAAGTGTCAAGAGTGTGCGACTAAGGAAATGCAAAGAGATGGG
AATGTTGGCTGAAT GTATGTATACAGGTATTC...TTTTAGGCTT
GTTAACTGAAATTCAGTGTAAATCTAAGCGACTGAGAAAAAAT
GTGAAGCAGCATGCAGATCAGACCGTGAATGAAGACAGTGAA
GGTCGTGACTTGCGACAAGTGACCTCGACAACAAAGTCATGC
AGG

```

Figura RD-3. Esquema de las secuencias de los exones 5 (en azul) y 6 (en verde) del gen *NR1H4* y el intrón localizado entre ellos. La secuencia del inserto de 12 nucleótidos se muestra subrayada y los sitios de corte y empalme GT-AG se muestran en negrita y cursiva. Los puntos suspensivos indican el resto de la secuencia del intrón localizada entre los sitios de corte y empalme, que no se muestra.

El hecho de que existan isoformas con extremos N-terminales diferentes en animales menos evolucionados, como los peces teleósteos (Howarth et al., 2010), pero no isoformas con inserto, las cuales sólo se han detectado hasta el momento en distintas especies de mamíferos (Gray et al., 2010; Huber et al., 2002; Zhang et al., 2003), abre la posibilidad de que en algún momento de la evolución se crease el segundo sitio GT de corte y empalme mediante una mutación y esto diese lugar a la aparición de las isoformas con o sin inserto. Aunque esta hipótesis fuera cierta, no sabemos si la mutación dio lugar a la aparición del inserto en las isoformas, o a su desaparición en una forma de FXR que ya tuviera la secuencia MYTG previamente a la mutación. En cualquier caso, se necesitaría un análisis más a fondo del ADN genómico de las especies intermedias, desde el punto de vista evolutivo, para confirmar esta hipótesis. Del mismo modo, no se puede descartar la existencia de algún mecanismo de regulación desconocido hasta el momento que mantenga el balance de isoformas FXR α (+)/FXR α (-) de una forma equilibrada en todos los tejidos.

4.1.2- Activación de FXR por ácidos biliares en hepatocitos humanos en cultivo primario

En estudios previos de nuestro grupo habíamos encontrado que la composición del conjunto o "pool" de ABs se modifica, tanto en humanos como en modelos experimentales, en situaciones como la regeneración hepática (Starkel et al., 2009) o la hepatocarcinogénesis (El-Mir et al., 2001). Estos cambios implicaban sobre todo modificaciones en la proporción relativa de las diferentes especies moleculares de estos compuestos, así como la aparición de ciertos ABs muy poco frecuentes en el adulto sano. Teniendo esto en cuenta, una de las características de FXR que nos interesaba especialmente investigar es su capacidad de respuesta a las diferentes especies moleculares de ABs. Existen varios trabajos publicados con respecto a este tema, entre los que se incluyen los que identificaron a FXR como el receptor de estos compuestos (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang et al., 1999a). En dichos estudios se concluía que el ligando natural más potente de FXR en la especie humana es el AQDC en su forma libre o no conjugada. Estos autores encontraron una menor actividad agonista de los ABs conjugados con taurina o glicina, que atribuyeron a la menor capacidad de estas moléculas más hidrofílicas para penetrar en células que no

expresan transportadores específicos (Wang et al., 1999a) y no a diferencias en la afinidad por el dominio de unión a ligando (LBD) de FXR, que era similar para ABs libres y conjugados (Makishima et al., 1999). Sin embargo, un trabajo publicado recientemente aporta datos contradictorios a este respecto, ya que postula que la desconjugación de los ABs por las bacterias intestinales incrementa la activación del FXR expresado en el íleon de ratón (Kuribayashi et al., 2012). Por tanto, decidimos investigar en primer lugar si efectivamente existen diferencias de activación de FXR por parte de los ABs libres y conjugados en células hepáticas e intestinales humanas.

Empezamos el estudio utilizando hepatocitos humanos en cultivo primario obtenidos de los márgenes sanos de resecciones hepáticas, ya que son células que, en principio, poseen toda la maquinaria necesaria para el correcto funcionamiento de FXR y sus vías de señalización, y por tanto, constituyen el modelo celular más aproximado a lo que ocurre “in vivo”. Cuando estas células se mantenían en cultivo, la expresión de FXR disminuía de forma espontánea durante los primeros 3-4 días posteriores a su extracción del hígado (Figura RD-4). Después, los niveles de expresión se mantenían en torno al 40-50% de los del hígado sano al menos hasta 12 días después de la siembra (Figura RD-4), por lo que decidimos realizar los experimentos dentro del periodo de estabilidad de expresión de FXR, es decir, 5-12 días después de la extracción y siembra de los hepatocitos.

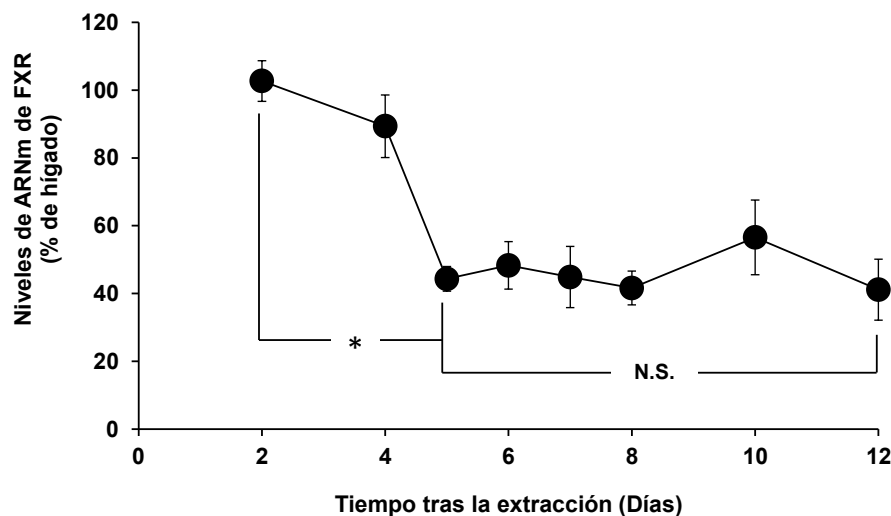


Figura RD-4. Evolución temporal de los niveles relativos de ARNm de FXR en hepatocitos humanos en cultivo primario, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$. N.S., no significativo (> 0.05).

Incubamos los hepatocitos durante 24 h con 100 μ M de un AB libre (AQDC) y sus conjugados con glicina (AGQDC) y taurina (ATQDC), y determinamos mediante RT-QPCR los niveles de expresión de 5 dianas de FXR (Figura RD-5A), 4 de ellas bien conocidas (BSEP, SHP, OST α y OST β) y otra de reciente descubrimiento (TFIIS, gen *TCEA2*), pero que ha demostrado ser muy sensible a la activación por este receptor nuclear (Cuesta et al., 2012). Los 3 ABs fueron capaces de activar las 5 dianas, aunque los efectos del AQDC fueron diferentes a los de sus formas conjugadas en función de la diana. Así, no se obser-

varon diferencias en la activación de BSEP y SHP entre los 3 ABs, mientras que en el caso de OST α , OST β y TCEA2, los ABs conjugados activaron su expresión aproximadamente la mitad que el AB libre (Figura RD-5A).

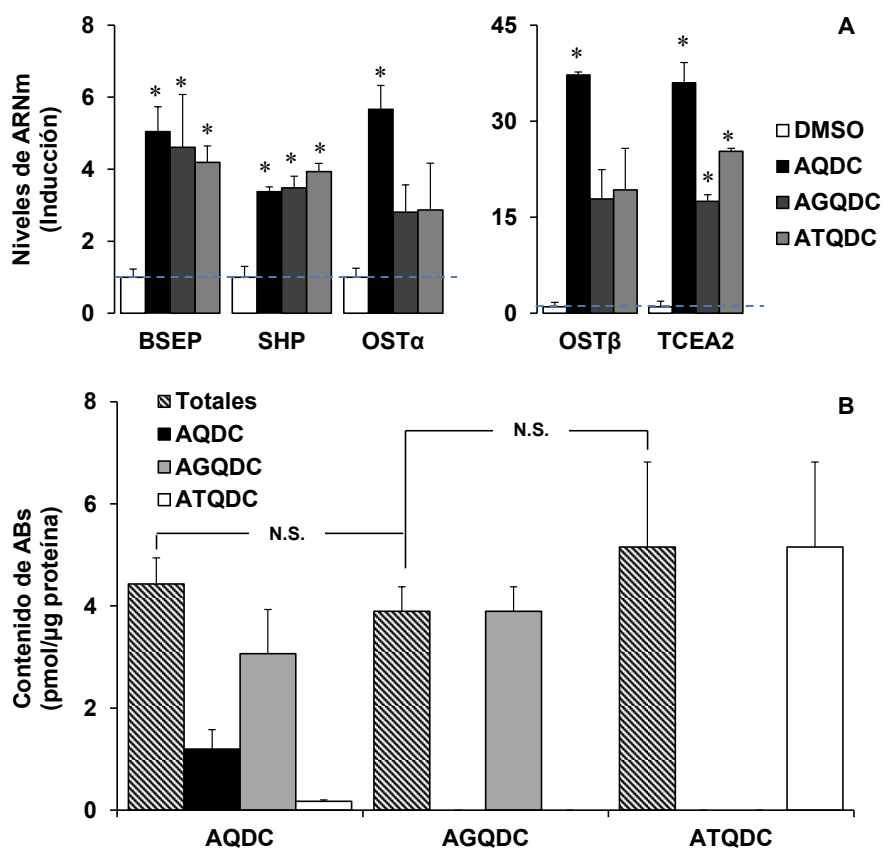


Figura RD-5. A. Niveles relativos de ARNm de BSEP, SHP, OST α , OST β y TCEA2 en hepatocitos humanos en cultivo primario tratados o no (DMSO) con 100 μ M de AQDC, AGQDC o ATQDC durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de expresión de las células control. *, p<0.05, comparando con las células control (DMSO). **B.** Contenido de ácidos biliares (ABs) en estas células, determinado por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, p<0.05, comparando el contenido total con el de las células tratadas con AQDC. N.S., no significativo (>0.05).

En los mismos experimentos determinamos también por HPLC-MS/MS la cantidad de cada AB captada por los hepatocitos durante el periodo de incubación, ya que en los trabajos publicados se achacaban las diferencias de actividad a diferencias en la captación. En la Figura RD-5B se observa como los hepatocitos contenían cantidades totales de ABs similares en las 3 condiciones experimentales, en torno a 4-5 pmol/ μ g de proteína. Además, las células tratadas con el vehículo (DMSO), que no se muestran en la Figura RD-5B, no presentaron niveles detectables de ABs, lo que indica que si estas células son capaces de sintetizar ABs en estas condiciones no los retienen en cantidades apreciables. También comprobamos que el medio de cultivo utilizado tampoco contenía estos compuestos a niveles cuantificables. Sin embargo, el uso de hepatocitos añadía un obstáculo a nuestro objetivo, ya que este tipo celular es capaz de conjugarse eficazmente los ABs libres que se añaden al medio de cultivo, de forma que cuando se añadía AQDC al medio, los hepatocitos transformaban aproximadamente el 70% en AGQDC, el 4% en ATQDC y a las

24 h solamente el 26% quedaba en forma libre (Figura RD-5B). Por el contrario, los ABs conjugados no eran modificados y cuando las células se incubaban con AGQDC o ATQDC, en el análisis se encontraba sólo la misma especie de AB (Figura RD-5B). El principal problema a la hora de interpretar nuestros resultados sobre la activación de FXR es que no sabíamos la rapidez con la que tenía lugar el proceso de conjugación del AQDC, es decir, si este AB era capaz de activar FXR antes de ser conjugado o eran ya el AGQDC y el ATQDC formados los responsables de la activación del receptor nuclear en las células tratadas con AQDC, puesto que estaban en mayor proporción en estas condiciones.

Por tanto, aunque parecía existir una activación de mayor magnitud por parte del AB libre que de los conjugados para algunos genes diana, no sabíamos si esta diferencia se potenciaría si el AQDC no fuese modificado, es decir, en ausencia del proceso de conjugación.

4.1.3- Activación de FXR por ácidos biliares en líneas celulares hepáticas humanas

Para resolver la cuestión planteada y discernir si existen o no diferencias de actividad entre los ABs libres y los conjugados, decidimos utilizar líneas celulares tumorales humanas, que son incapaces de llevar a cabo el proceso de conjugación debido a la baja expresión de las enzimas conjugantes de ABs (BACS y BAAT) en este tipo de células. En el caso de las líneas celulares hepáticas dividimos el estudio entre las líneas celulares que expresaban FXR (HuH-7 y HepG2) y las que no lo expresaban (Alexander), en las cuales introduciríamos este receptor nuclear mediante transfección.

4.1.3.1- Líneas celulares con expresión endógena de FXR (HepG2 y HuH-7)

Puesto que era lo más sencillo decidimos empezar por las líneas celulares que expresaban FXR de forma endógena, realizando experimentos similares a los llevados a cabo en los hepatocitos. No obstante, en estudios preliminares de captación observamos que la línea celular HepG2 no captaba los ABs libres y conjugados con la misma eficacia, como hacían los hepatocitos, sino que captaban mejor el AQDC, probablemente porque en estas células las proteínas transportadoras de captación de ABs (NTCP y OATPs) están menos expresadas que en los hepatocitos sanos, y el AQDC es capaz de atravesar mejor la membrana por difusión simple que sus formas conjugadas por ser menos hidrofílico. Por ello, decidimos tratar estas células con una mayor concentración de ABs conjugados que libres para tratar de igualar los contenidos intracelulares de todos ellos y poder comparar así su eficacia en la activación de FXR. Expusimos los cultivos a 50 μM de AQDC y 100 μM de AGQDC y ATQDC, durante 24 h y recogimos muestras para determinar la activación de la expresión de las dianas de FXR y el contenido celular en ABs.

Las medidas de RT-QPCR mostraron que el grado de activación de las dianas era en general menor que en los hepatocitos (Figura RD-6), sobre todo en las células HepG2, e incluso en algunos casos, por ejemplo para BSEP (Figura RD-6A), no se observó activación.

Probablemente esto es debido a que el contenido de ABs en estas células era también menor que en hepatocitos, estando en torno a 1.5-3.0 pmol/μg de proteína (Figura RD-6C).

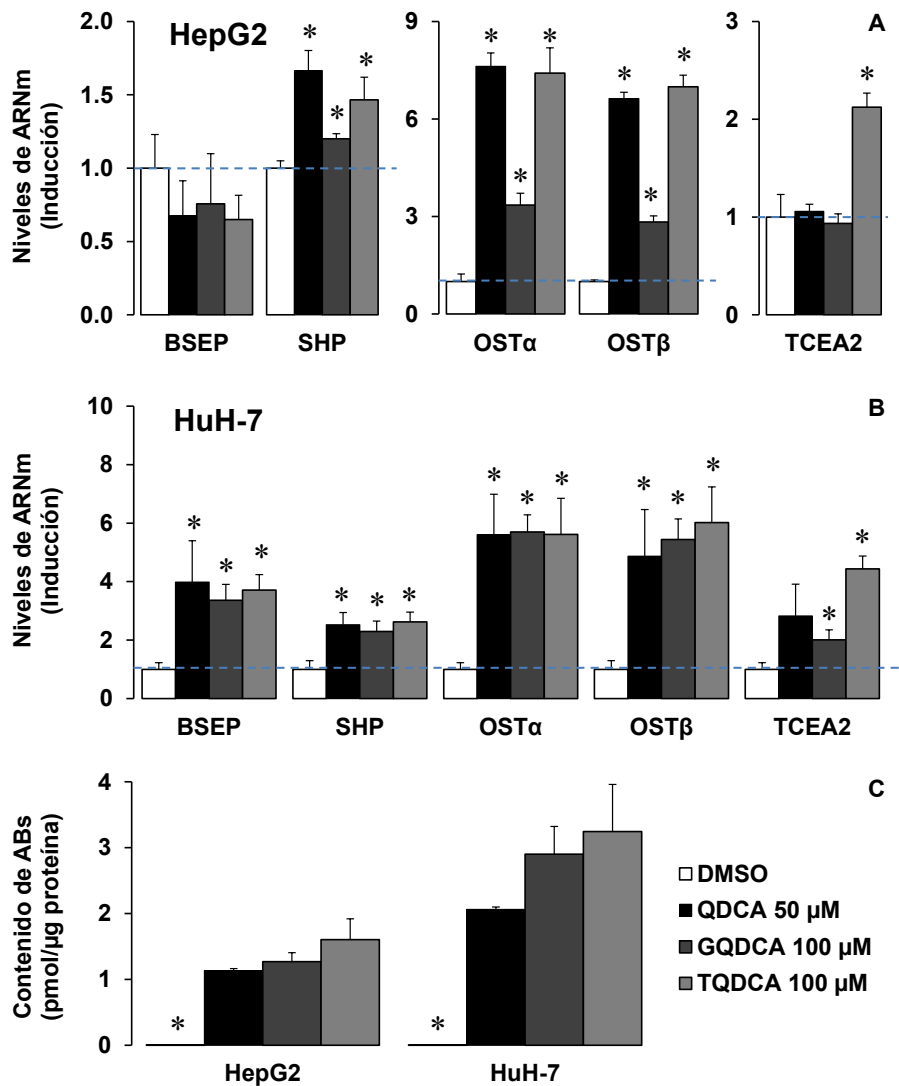


Figura RD-6. A-B. Niveles relativos de ARNm de BSEP, SHP, OSTα, OSTβ y TCEA2 en células HepG2 (A) y HuH-7 (B) tratadas o no (DMSO) con 50 μM de AQDC, 100 μM de AGQDC o 100 μM ATQDC durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de expresión de las células control. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y son media ± EEM de, al menos, 3 cultivos. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de expresión de las células control. *, p<0.05, comparando con las células control (DMSO). **C.** Contenido de ácidos biliares (ABs) en estas células, determinado por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado determinados por HPLC-MS/MS. *, p<0.05, comparando con las células tratadas con AQDC.

Además, se encontraron diferencias entre las dos líneas celulares en cuanto a la actividad de las distintas especies de ABs. Por una parte, en las células HepG2 se observó que para algunas dianas (SHP, OSTα y OSTβ) el AQDC y el ATQDC eran capaces de activar FXR con la misma eficacia, mientras que el grado de activación del AGQDC era significativamente mucho menor (Figura RD-6A). En el caso de BSEP ninguno de los ABs fue capaz de inducir la expresión de esta diana, pero desconocemos el porqué, ya que la activación de BSEP por FXR en células HepG2 ha sido descrita previamente (Martinez-Fernandez et al., 2009), aunque en respuesta a GW4064, un ligando sintético más potente que el AQDC.

Otro dato curioso encontrado en estas células fue la activación de la expresión del gen *TCEA2* (aunque mucho menor que en hepatocitos), exclusivamente por ATQDC, mientras que el AQDC y el AGQDC no tuvieron ningún efecto sobre la expresión de este gen.

En el caso de las células HuH-7 todas las dianas de FXR analizadas fueron inducidas por los 3 ABs entre 2 y 6 veces (Figura RD-6B), es decir, en comparación con los hepatocitos, el grado de activación fue similar en el caso de BSEP, SHP y OST α , y muy inferior para OST β y *TCEA2*. Mientras que para el resto de dianas los 3 ABs tuvieron la misma eficacia de activación, en el caso del gen *TCEA2* se observó de nuevo una mayor respuesta a ATQDC, como en las células HepG2.

Al analizar el contenido de ABs de estas células confirmamos que, efectivamente, ambas líneas celulares eran incapaces de conjugar el AQDC, por lo que en la Figura RD-6C se representa el contenido total de ABs para cada condición, que coincide con la especie de AB que se administró a las células en cada caso. El análisis por HPLC-MS/MS, demostró también que, al igual que en los hepatocitos, ni en las células tratadas con DMSO ni en el medio de cultivo se aprecian cantidades detectables de estos compuestos. Además, en la Figura RD-6C se puede observar como la captación de los 3 ABs es similar en las células HepG2, mientras que en las células HuH-7 el contenido en AQDC es ligeramente inferior que el de las especies conjugadas.

Por tanto, la diferente potencia de activación de FXR encontrada para AGQDC y ATQDC en células HepG2, y especialmente la marcada inducción del gen *TCEA2* por parte del ATQDC, no pueden atribuirse a diferencias en el contenido intracelular de ambos ABs conjugados.

4.1.3.2- Líneas celulares que carecen de expresión endógena de FXR (Alexander)

Para completar este estudio decidimos utilizar también una línea celular que careciese de expresión de FXR, para poder introducirlo a nuestra voluntad mediante transfección. Las dos líneas celulares hepáticas sin expresión de FXR de las que disponíamos eran las células SK-Hep-1 y las Alexander (Figura RD-2A). Ambas líneas presentan características similares, pero las células SK-Hep-1 mostraron una elevada sensibilidad a la toxicidad producida por el proceso de transfección en experimentos previos, por lo que elegimos las Alexander para llevar a cabo los siguientes estudios.

Puesta a punto del modelo experimental de transfección de FXR

Para analizar las propiedades de activación de FXR por los ABs clonamos las 4 isoformas de FXR humano en plásmidos con los que pudiéramos transfectar células en cultivo (apartado 3.2.1). Se clonaron las isoformas en dos vectores, uno que expresaba FXR en fase con el epítipo antigénico V5, que nos permitiría visualizar la localización subcelular de FXR mediante inmunofluorescencia, y otro que expresaba FXR seguido de su codón STOP, es decir, sin modificación alguna, para estudiar la actividad del receptor nuclear.

El primer paso fue poner a punto el modelo de transfección para elegir los momentos clave en los que analizar las propiedades de FXR. Decidimos utilizar el vector que contenía la isoforma FXR α 1(-), puesto que la isoforma FXR α 1 es la más abundante en hígado (Figura RD-2B) y, según la bibliografía, las isoformas FXR α (-) son más activas que las FXR α (+) por carecer del inserto (Zhang et al., 2003). De todos modos, el esqueleto en el que se clonó la ORF de las diferentes isoformas era exactamente el mismo y el promotor que dirigía su expresión (CMV) también, por lo que asumimos que la eficacia de transfección y expresión de los plásmidos que contenían las 4 isoformas serían muy similares, y esta aproximación nos valdría para futuros experimentos en los que transfectáramos las restantes isoformas.

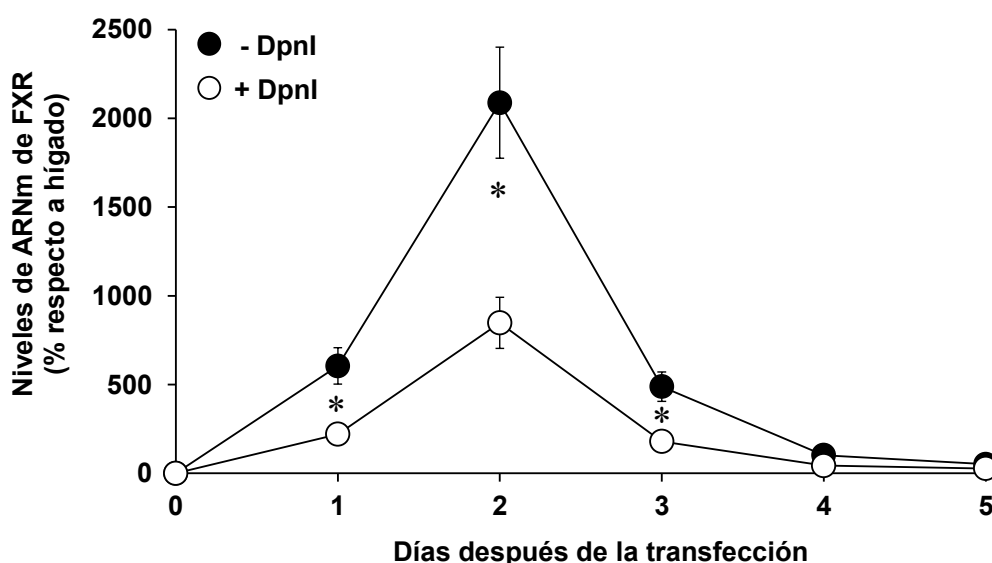


Figura RD-7. Evolución temporal de los niveles relativos de ARNm de FXR en células Alexander de hepatoma humano transfectadas con un plásmido que contenía la ORF de FXR α 1(-), determinados por RT-QPCR. El ADN plasmídico remanente en las células transfectadas se eliminó mediante tratamiento del ADNc con la enzima de restricción *DpnI*. Los valores se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células tratadas con *DpnI*.

Como se observa en la Figura RD-7, la expresión de FXR aumentaba progresivamente hasta alcanzar un máximo 2 días después de la transfección, momento a partir del que la cantidad de ARNm comenzaba a disminuir para alcanzar niveles similares a los de las células sin transfectar a los 5 días de la transfección.

En un proyecto paralelo de nuestro grupo de investigación se observó que cuando se analiza por RT-QPCR la expresión de un gen transfectado, además del ARNm transcrito, también se cuantifican las copias del plásmido transfectado que permanecen dentro de las células y que se purifican junto con el ARNm con los kits comerciales. Por tanto, decidimos poner a punto un método mediante el que eliminar el plásmido remanente en las células y realizar así una medida más realista de la expresión de los genes transfectados. Para ello, tratamos el material procedente de la reacción de retrotranscripción (previamente a la realización de la QPCR) con la enzima de restricción *DpnI*, que corta en secuencias de ADN que se encuentran metiladas (Figura MM-7), características del ADN plasmídico, pero no

del ADN sintetizado por la retrotranscriptasa a partir del ARNm purificado. De esta forma podíamos cuantificar únicamente la expresión del ARNm producido a través del plásmido transfectado y que, a su vez, daría lugar a la proteína final, como se observa en la Figura RD-7.

Independientemente del tratamiento con la enzima *DpnI*, el perfil de expresión era el mismo, por lo que decidimos que el mejor momento para añadir compuestos agonistas de FXR en futuros experimentos serían 48 h después de la transfección, que era cuando la expresión de este receptor nuclear era máxima.

Actividad agonista de ácidos biliares libres y conjugados

Antes de analizar el efecto que tenía la conjugación de los ABs sobre la actividad de FXR, quisimos mejorar al máximo las condiciones de trabajo en este nuevo modelo celular. Para ello, decidimos introducir también mediante transfección una proteína de captación de ABs, OATP1B1, cuya ORF había sido clonada previamente en nuestro laboratorio, para potenciar la entrada de estos compuestos al interior celular. La introducción de esta proteína no interferiría en el desarrollo temporal del modelo experimental que se comentó anteriormente, ya que en estudios previos que formaron parte de mi Trabajo de Grado (Vaquero, 2007), se observó que el tiempo necesario para que la OATP1B1 se expresase en la membrana plasmática de las células es de 48 h tras su transfección, el mismo tiempo al que habíamos decidido añadir los ABs al medio de cultivo. Además, debido a la baja expresión de RXR α (de aquí en adelante RXR) en las células Alexander (\approx 4% de hígado, Figura RD-8), decidimos transfectarlo también para asegurarnos de que FXR estaba en las mejores condiciones posibles para llevar a cabo la activación de su vía de señalización.

Cuando analizamos la expresión de las proteínas transfectadas a las 48 h de la transfección observamos que el modelo estaba a punto. Por una parte, tanto OATP1B1 como FXR presentaban una localización subcelular correcta (Figura RD-8A), la primera claramente localizada en la membrana plasmática y el segundo restringido al núcleo, como demuestra su colocalización con el marcador nuclear DAPI. Además, se observó que la mayoría de células transfectadas expresaban conjuntamente ambas proteínas. Por otra parte, la determinación de los niveles de expresión por RT-QPCR (Figura RD-8B), mostró que las 3 proteínas transfectadas alcanzaban niveles muy elevados, siendo de aproximadamente 300% de los encontrados en hígado sano para OATP1B1, 700% para FXR y 500% para RXR.

El plásmido en el que se clonó la ORF de la proteína OATP1B1 codificaba también para el epítipo V5 en fase con el transportador, lo que como acabamos de señalar nos permitió determinar su localización mediante la imagen de inmunofluorescencia que se muestra en la Figura RD-8A. Sin embargo, la introducción de este tipo de epítipo puede, en ocasiones, afectar a la actividad de la proteína. Por lo tanto, a pesar de que la OATP1B1 parecía estar insertada correctamente en la membrana plasmática de las células Alexander, realizamos un experimento previo para comprobar si era capaz de llevar a cabo el

transporte de los ABs objeto de estudio. Para ello transfectamos células Alexander con FXR/RXR junto con OATP1B1 o un vector vacío, y las incubamos con una concentración de 50 μM de AQDC, AGQDC o ATQDC. Como se observa en la Figura RD-9, en los 3 casos la presencia de OATP1B1 provocó un incremento del contenido intracelular del AB. Además, hay que tener en cuenta que la mayor cantidad de ABs encontrada en los cultivos en los que se transfectó el transportador en realidad corresponde sólo al AB que entra en las células transfectadas con OATP1B1, de forma que la cantidad real dentro de las células transfectadas debe ser mucho mayor que la determinada al analizar la población general, aunque desconocemos la magnitud exacta.

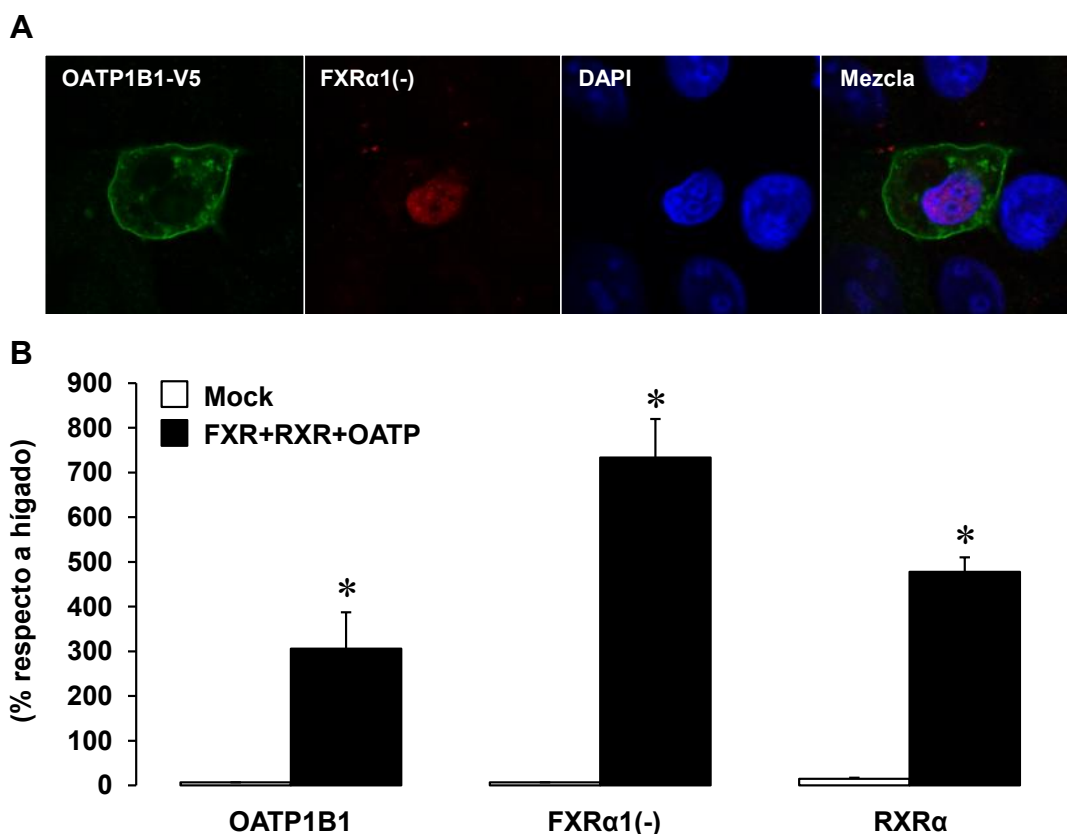


Figura RD-8. A. Imágenes representativas, obtenidas mediante microscopía confocal, de la inmunolocalización de OATP1B1 (fluorescencia verde) y FXR (fluorescencia roja) en células Alexander 48 h después de ser transfectadas con FXR α 1(-), RXR α y OATP1B1 seguido del epítipo antigénico V5 (OATP1B1-V5). Los núcleos, de color azul, se tiñeron con DAPI. **B.** Niveles relativos de ARNm de OATP1B1, FXR y RXR α en células Alexander 48 h tras la transfección con un vector vacío (Mock) o con FXR α 1(-), RXR α y OATP1B1, determinados por RT-QPCR. El ADN plasmídico remanente se eliminó de las muestras mediante tratamiento del ADNc con la enzima de restricción *DpnI*. Los valores se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células transfectadas con el vector vacío (Mock).

Una vez comprobada la validez del modelo pasamos a investigar en él las posibles diferencias de activación de FXR entre los ABs libres y conjugados. Como se muestra en la Figura RD-9, las células Alexander, al igual que las HepG2 y las HuH-7, captan mejor el AB libre que sus conjugados, por lo que en este caso también decidimos incubar las células durante 24 h con 50 μM de AQDC y 100 μM de AGQDC y ATQDC.

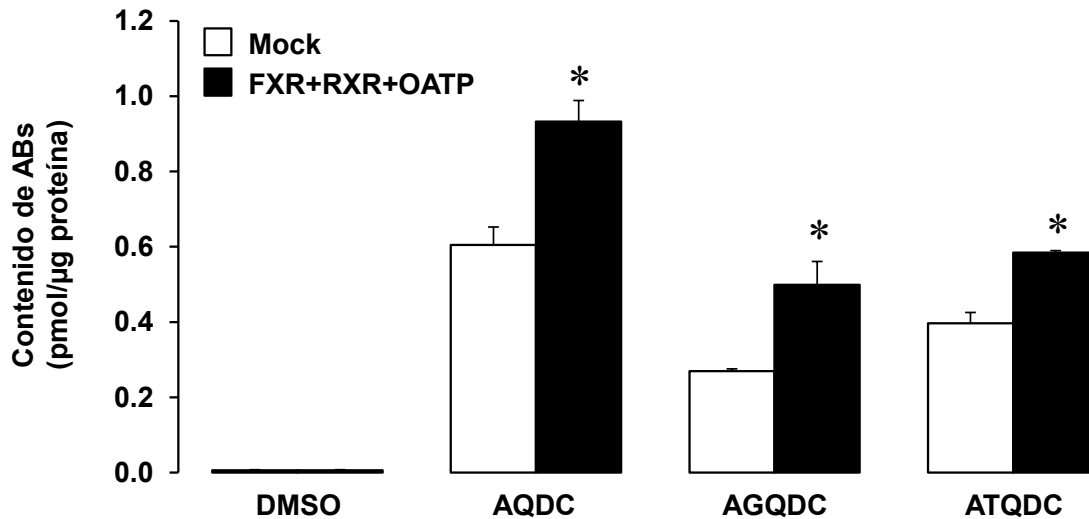


Figura RD-9. Contenido de ácidos biliares (ABs) en células Alexander transfectadas con un vector vacío (Mock, barras blancas) o con OATP1B1 junto con FXR α 1(-) y RXR α (barras negras), y tratadas con 50 μ M de AQDC, AGQDC o ATQDC o con el vehículo (DMSO) durante 24 h, determinado por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, $p < 0.05$, comparando con las células transfectadas con el vector vacío (Mock).

Sorprendentemente en este modelo celular solamente el AQDC fue capaz de activar la expresión de los genes estudiados, mientras que las formas conjugadas no mostraron ninguna actividad sobre la expresión de SHP, OST β y *TCEA2*, y solamente en el caso de BSEP mostraron un ligero efecto, aunque mucho menor que el del AB libre (Figura RD-10A). En general, los niveles de activación fueron similares a los encontrados en células HepG2 y Huh-7, aunque con una excepción, BSEP. La expresión de esta diana se indujo en respuesta a la incubación con AQDC unas 35 veces con respecto a las células control, mientras que en los hepatocitos y en la línea celular HuH-7 su inducción fue mucho menor, e incluso en las células HepG2 inexistente. Otro dato que se debe comentar, es la ausencia de OST α en la Figura RD-10A. Esta diana no se indujo en ninguno de los casos en estos experimentos, lo que podría indicar falta de actividad de estos 3 ABs sobre este gen en concreto. Sin embargo, en otros experimentos que se expondrán más adelante se añadió GW4064 al medio y este ligando, mucho más potente que el AQDC (Willson et al., 2001), tampoco fue capaz de inducir la expresión de OST α , por lo que suponemos que en las células Alexander debe faltar algún factor necesario para su activación por FXR o quizá los elementos de respuesta de este receptor nuclear están mutados o alterados de alguna otra forma que impide su unión.

Cuando analizamos el contenido en ABs de las células Alexander, observamos en primer lugar que estas células también carecen de la capacidad de conjugarse. Además, el contenido en AQDC fue similar al del ATQDC y ligeramente superior que el del AGQDC (Figura RD-10B). Este menor contenido en la forma conjugada con glicina no parece suficiente para explicar la falta de efecto de este AB sobre las dianas de FXR, especialmente sobre BSEP, cuya sensibilidad a la activación por AQDC fue muy elevada.

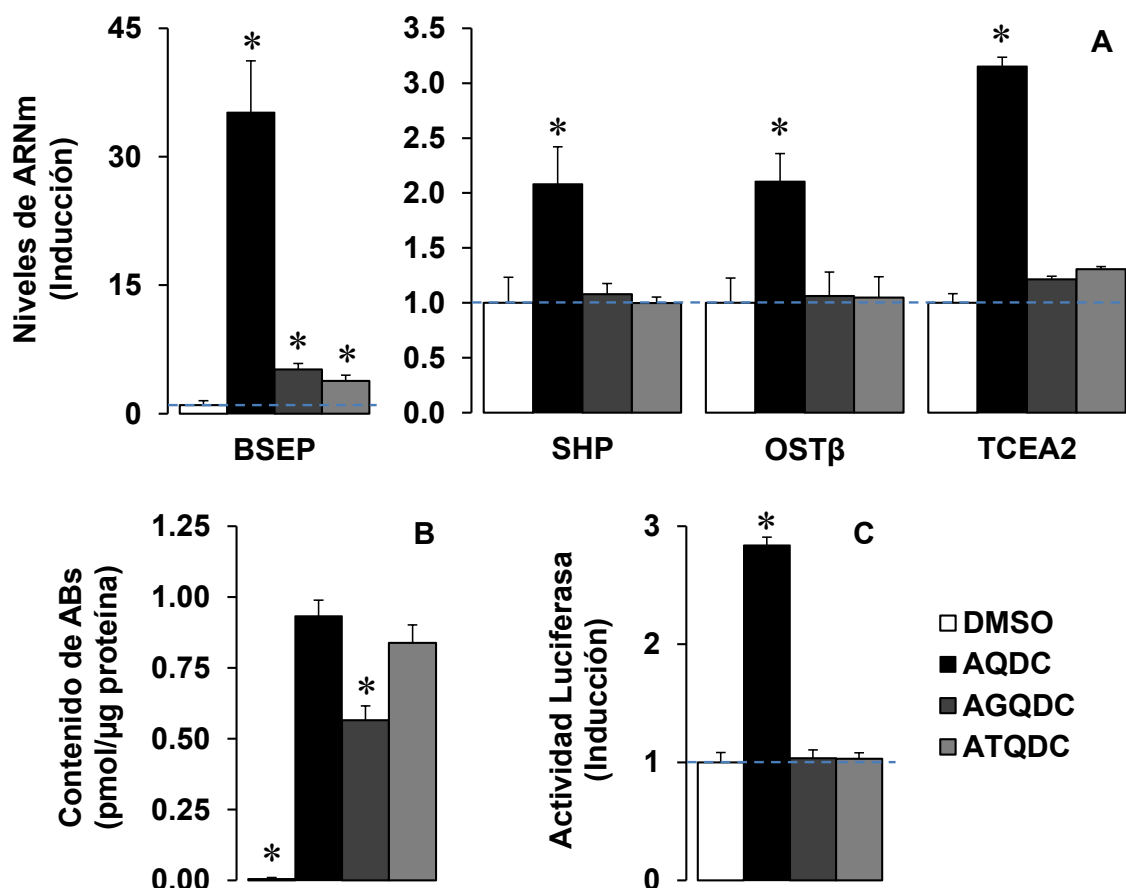


Figura RD-10. A. Niveles relativos de ARNm de BSEP, SHP, OSTβ y TCEA2 en células Alexander transfectadas con OATP1B1 junto con FXRα1(-) y RXRα, y tratadas o no (DMSO) con 50 μM de AQDC, 100 μM de AGQDC o 100 μM ATQDC, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y son media ± EEM de, al menos, 3 cultivos. *, p<0.05, comparando con las células control (DMSO). **B.** Contenido de ácidos biliares (ABs) en estas células, determinado por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, p<0.05, comparando con las células tratadas con AQDC. **C.** Inducción de un elemento IR-1 de respuesta a FXR en células Alexander transfectadas con OATP1B1, FXRα1(-), RXRα y un plásmido que contenía la ORF de la luciferasa de luciérnaga inestable (Luc2CP) precedida por un promotor mínimo (minPr) y un elemento de respuesta IR-1, y tratadas o no (DMSO) con 50 μM de AQDC, 100 μM de AGQDC o 100 μM ATQDC. La actividad luciferasa se expresó como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y los valores son media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, p<0.05, comparando con las células control (DMSO). Las líneas discontinuas indican los niveles basales de expresión de las células control.

La falta de respuesta de OSTα a los ligandos de FXR nos hizo pensar que quizá los elementos de respuesta de algunas dianas de este receptor nuclear estaban alterados en estas células impidiendo así su activación en respuesta a sus agonistas. Por ello decidimos llevar a cabo experimentos de activación de luciferasa como gen reportero, introduciendo mediante transfección un elemento de respuesta de este receptor nuclear. Para ello, clonamos mediante mutagénesis dirigida un elemento IR-1 de respuesta a FXR, con una secuencia consenso (Chong et al., 2010), en el plásmido pGL4.28[Luc2CP] (Figura MM-2), dirigiendo la expresión de una forma inestable de luciferasa de luciérnaga, denominada Luc2CP. Este vector contiene una secuencia, denominada minPr (de “Minimal Promoter”), que presenta un elemento típico de los promotores, denominado caja TATA. Esta secuen-

cia permite la clonación, de forma individual, de elementos de respuesta que dirijan la expresión del gen reportero, es decir, sin necesidad de clonar el promotor entero. Además, su baja actividad basal permite medir de forma más sensible la respuesta de los elementos clonados. Finalmente, transfectamos las células Alexander con OATP1B1, FXR, RXR y el plásmido pGL4.28[Luc2CP]/IR-1, y las incubamos con los 3 ABs o el vehículo. Los resultados fueron similares a los obtenidos para los genes endógenos de las células Alexander, es decir, sólo el AB libre fue capaz de inducir la expresión de la luciferasa, mientras que las especies conjugadas no tuvieron ningún efecto (Figura RD-10C).

Según estos resultados parece evidente que existe una clara diferencia en la eficacia de los ABs libres y conjugados en cuanto a la activación de FXR. Sin embargo, en los experimentos descritos hasta este momento solamente habíamos probado el AQDC y sus conjugados, por lo que decidimos ampliar el estudio y utilizar una batería de ABs más extensa en este modelo celular. En los siguientes experimentos tratamos las células Alexander transfectadas con los ABs libres AQDC, ADC y AC, y las formas conjugadas con glicina y taurina de los mismos. Además, incluimos en el estudio las formas libres de otros dos ABs, el AUDC, que según la literatura no es capaz de activar FXR (Campana et al., 2005) y se utiliza en el tratamiento de diversas patologías hepáticas (Poupon, 2012; Rudic et al., 2012), en las que este receptor nuclear juega un papel importante (apartado 2.4.1), y el ALC, cuya actividad sobre FXR se ha investigado con resultados contradictorios (Makishima et al., 1999; Yu et al., 2002). También añadimos al estudio el ácido allo-cólico (Allo-AC), un AB fetal plano que reaparece en situaciones particulares en el adulto, como la regeneración hepática y la tumorigénesis (El-Mir et al., 2001; Starkel et al., 2009), dos procesos en los que FXR tiene un papel importante. Puesto que las diferencias en el contenido intracelular encontradas en los experimentos previos no parecían suficientes para explicar las diferencias de actividad de los ABs libres y conjugados, en este caso decidimos utilizar una dosis única de 50 μ M para todos los ABs, que nos permitiera comparar su actividad en las mismas condiciones. En estos experimentos utilizamos como control positivo una concentración 1 μ M del ligando sintético GW4064. Tras incubar las células Alexander transfectadas con OATP1B1, FXR y RXR, durante 24 h, con las cantidades señaladas de cada agonista, determinamos la expresión de las 3 dianas más conocidas de FXR que respondían en esta línea celular, BSEP, SHP y OST β .

El efecto observado previamente para las formas conjugadas del AQDC se confirmó para las del ADC y el AC, ya que ninguna de ellas fue capaz de inducir ninguna de las 3 dianas (Figura RD-11). En el caso del AC, ni siquiera la especie libre presentó actividad, mientras que el ADC sí incrementó la expresión de todas las dianas, aunque en menor medida que el AQDC. El ALC también fue capaz de activar las dianas, al igual que el Allo-AC, con una potencia similar a la del ADC. Como era de esperar, el GW4064 indujo la expresión de las 3 dianas con una potencia significativamente mayor que la del AB más potente, el AQDC.

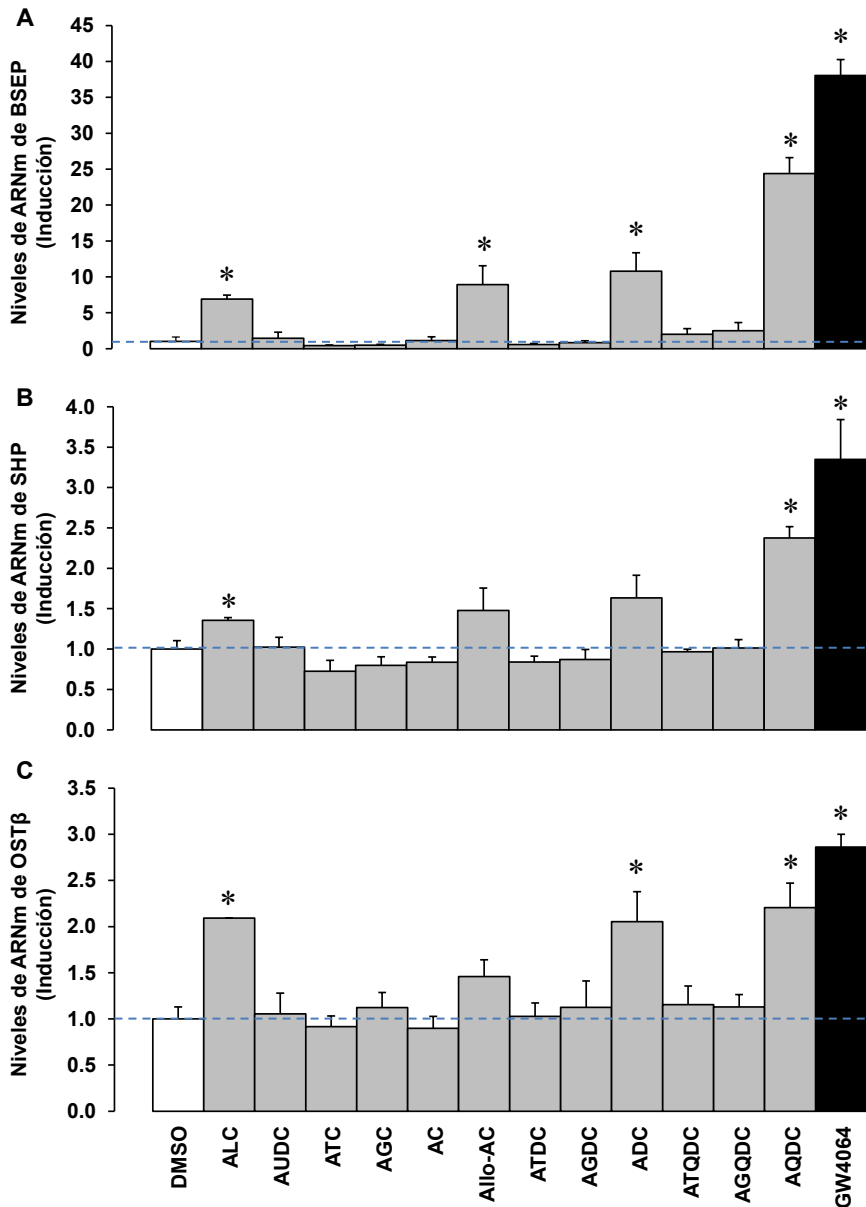


Figure RD-11. Niveles relativos de ARNm de BSEP (A), SHP (B) y OSTβ (C) en células Alexander transfectadas con OATP1B1 junto con FXRα1(-) y RXRα, y tratadas o no (DMSO, barras blancas) con 1 μM de GW4064 (barras negras) o 50 μM de distintas especies moleculares de ácidos biliares (barras grises) durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y son media ± EEM de, al menos, 3 cultivos. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de expresión de las células control. *, p<0.05, comparando con las células control (DMSO).

Parte de nuestros resultados se pueden explicar con los datos publicados en la literatura. Según el estudio de Mi y colaboradores, el bolsillo de unión a ligando (LBP) situado en el LBD utiliza las propiedades anfipáticas de los ABs en el mecanismo de reconocimiento de estas moléculas (Mi et al., 2003). Como se comentó en el apartado 2.2.4, los ABs poseen una estructura tridimensional con una cara convexa, común para los ABs primarios y secundarios, y una cara cóncava, en la que los grupos hidroxilo se sitúan en las posiciones 3α, 7α y 12α. Las diferentes potencias de activación de los ABs encontradas en nuestros experimentos se deben, probablemente, a diferencias de afinidad por el LDB de FXR, que dependen del patrón de grupos hidroxilo de cada ABs. La secuencia aminoacídica del LBP

no contiene ningún residuo polar capaz de acomodar el grupo hidroxilo de la posición 12 α presente en el AC y el ADC, por lo que su actividad es menor en comparación con el AQDC, que carece de este grupo funcional. Además, el oxígeno de la cadena lateral de una tirosina localizada en este dominio establece enlaces de hidrógeno con el hidroxilo de la posición 7 α , por lo que la falta de este grupo en el ALC explicaría la menor actividad de este AB.

Por otra parte se ha demostrado que la forma humana de FXR tiene dos residuos que le confieren una alta especificidad por el AQDC en detrimento del AC, residuos de los que carecen las formas murinas de este receptor nuclear, de forma que si se introducen estos residuos en la forma de ratón, ésta muestra una afinidad por el AQDC similar a la humana (Cui et al., 2002). Esto explicaría la completa falta de actividad del AC en nuestros experimentos, en los que utilizamos la isoforma humana.

Otro resultado muy interesante fue el obtenido para el Allo-AC. Este AB no posee la estructura tridimensional característica de los ABs, que según Mi y colaboradores es crítica para el reconocimiento de los ABs por parte del LBP, sino que presenta una estructura plana, debido a que el H del C5 está en posición α y los anillos A y B están en el mismo plano. Debido a su particular estructura esperaríamos que este AB no fuera capaz de activar FXR, al contrario de lo que ocurrió. Sin embargo, en la bibliografía existen datos de otras moléculas, principalmente sintéticas, con estructuras distintas a los ABs que son capaces de activar a este receptor nuclear, como la fexamina por ejemplo (Downes et al., 2003). De hecho, recientemente hemos encontrado que otros esteroides planos, los glucocorticoides, son capaces de activar a FXR en un modelo celular similar al utilizado en esta Tesis Doctoral (Rosales et al., 2013). Por otro lado, en el trabajo de Downes y colaboradores se describe como diferentes ligandos son capaces de activar conjuntos distintos de genes diana de FXR en hepatocitos humanos (Downes et al., 2003). Por tanto, es posible que la aparición del Allo-AC en el adulto en momentos tan específicos como la tumorigénesis y la regeneración hepática, conlleve la activación de un grupo particular de genes diana de FXR que explique el papel de este receptor nuclear en estos procesos.

Por otra parte, nuestros datos van en contra de algunos resultados publicados en lo referente a las propiedades de activación de FXR de los ABs libres y conjugados. Los datos estructurales recogidos hasta el momento indican que la forma en que los ABs encajan en el LBD de FXR deja el residuo de glicina o taurina hacia fuera del LBP, de forma que estos residuos no estorbarían en la afinidad de los mismos por FXR (Mi et al., 2003). De hecho, en los primeros estudios llevados a cabo para analizar la afinidad de los ABs por FXR se observó que esta era similar para los ABs libres y conjugados (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999). Sin embargo, estos estudios, en los que se utilizó la técnica FRET (de "Fluorescence Resonance Energy Transfer"), se llevaron a cabo únicamente con el LBD de FXR y no con la proteína entera, al igual que los cristales obtenidos en los estudios publicados hasta el momento son únicamente del LBD de FXR unido a ligandos distintos del AQDC, como el 6 α -ECDCA (Mi et al., 2003) o la fexamina (Downes et al., 2003). Por ello, no podemos saber a ciencia cierta si la inclusión de los grupos glicina y taurina en las formas conjugadas de los ABs produce alguna alteración de la estructura tridimensional de

la proteína completa, y en el caso de que esa alteración se produzca, si ésta modificaría de alguna manera las propiedades de FXR para activar el complejo de transcripción. Además, recientemente se ha publicado un trabajo, realizado en ratones a los que se les eliminaba la flora intestinal para inhibir así el proceso de desconjugación de ABs llevado a cabo por las bacterias intestinales (Kuribayashi et al., 2012), cuyos resultados apoyan los nuestros, puesto que se observó que al suprimir la desconjugación se reducía la actividad de FXR en el íleon.

Sin embargo, el hecho de que existan diferencias tan evidentes en función del modelo celular utilizado nos hace pensar que el proceso de desdiferenciación inherente al proceso carcinogénico puede estar alterando algún factor que los ABs conjugados, pero no los libres, necesitan para llevar a cabo su función sobre FXR. Esto explicaría porque los hepatocitos humanos, que una vez puestos en cultivo comienzan un proceso de desdiferenciación, muestran diferencias de activación en algunos genes como $OST\alpha$, $OST\beta$ y $TCEA2$, pero no en otros como BSEP y SHP (Figura RD-5). Del mismo modo, las líneas celulares hepáticas más diferenciadas como las HuH-7 y HepG2 (Ishiyama et al., 2003) muestran menos diferencias en la respuesta a ABs libres y conjugados que las Alexander, consideradas menos diferenciadas que las anteriores (Ishiyama et al., 2003), en las que se observa el extremo opuesto a las HuH-7 (Figuras RD-6/10), es decir, que sólo el AB libre es capaz de activar la expresión de las dianas de FXR.

Activación de las isoformas de FXR por ligandos endógenos y sintéticos

En el anterior bloque de experimentos utilizamos hepatocitos humanos y dos líneas celulares que tenían expresión endógena de FXR para dilucidar el papel de la conjugación de ABs sobre la activación de FXR. En estas líneas celulares existe una mezcla de varias isoformas (Figura RD-2), mientras que en las células Alexander, donde observamos la diferencia más clara entre los ABs libres y conjugados, se transfectó únicamente la isoforma $FXR\alpha1(-)$. Por tanto, no sabemos si la presencia de una o varias isoformas de FXR al mismo tiempo puede influir en los resultados obtenidos. Del mismo modo, no sabemos si la activación de FXR por sus agonistas o la inducción por parte de éste de sus dianas, se ven afectadas por las diferencias estructurales existentes entre las isoformas. Debido a esto, decidimos investigar más a fondo algunas de las propiedades de las isoformas de este receptor nuclear.

La primera característica que quisimos analizar fue la localización subcelular de las isoformas de FXR. La translocación nuclear de FXR puede ser modulada por la fosforilación mediada por PKC zeta ($PKC\zeta$), la cual depende de la actividad de la flipasa de la membrana canalicular FIC1 (Frankenberg et al., 2008). En la Figura RD-8A observamos que la isoforma $FXR\alpha1(-)$ tenía, efectivamente, una localización nuclear en las células Alexander, pero desconocíamos si el resto de las isoformas de FXR eran capaces de translocarse al núcleo con la misma eficacia, y si lo hacían en todas las líneas celulares. Además, el análisis de expresión mostrado en la Figura RD-2 evidenció claras diferencias en la expresión de las distintas isoformas de FXR en los diferentes tejidos analizados, por lo que decidimos

comprobar también si la localización nuclear de FXR dependía del territorio donde fuera expresado. Para ello transfectamos líneas celulares de distinto origen con los plásmidos que codificaban para las 4 isoformas de FXR seguidas del epítipo V5, y analizamos la expresión y localización subcelular del receptor nuclear a las 48 h de realizar la transfección. Utilizamos líneas celulares derivadas de los órganos donde se observó la mayor expresión de FXR, HepG2 y Alexander derivadas de hepatoblastoma y hepatoma, respectivamente, LS 174T, de adenocarcinoma de colon (ACC), y HEK-293 de riñón embrionario. Además, decidimos utilizar dos líneas celulares adicionales, las MUM2C, de melanoma humano, en las que no hay expresión de FXR y no tienen relación con el metabolismo de ABs, y las CHO-K1, de ovario de hámster chino, otra especie completamente distinta.

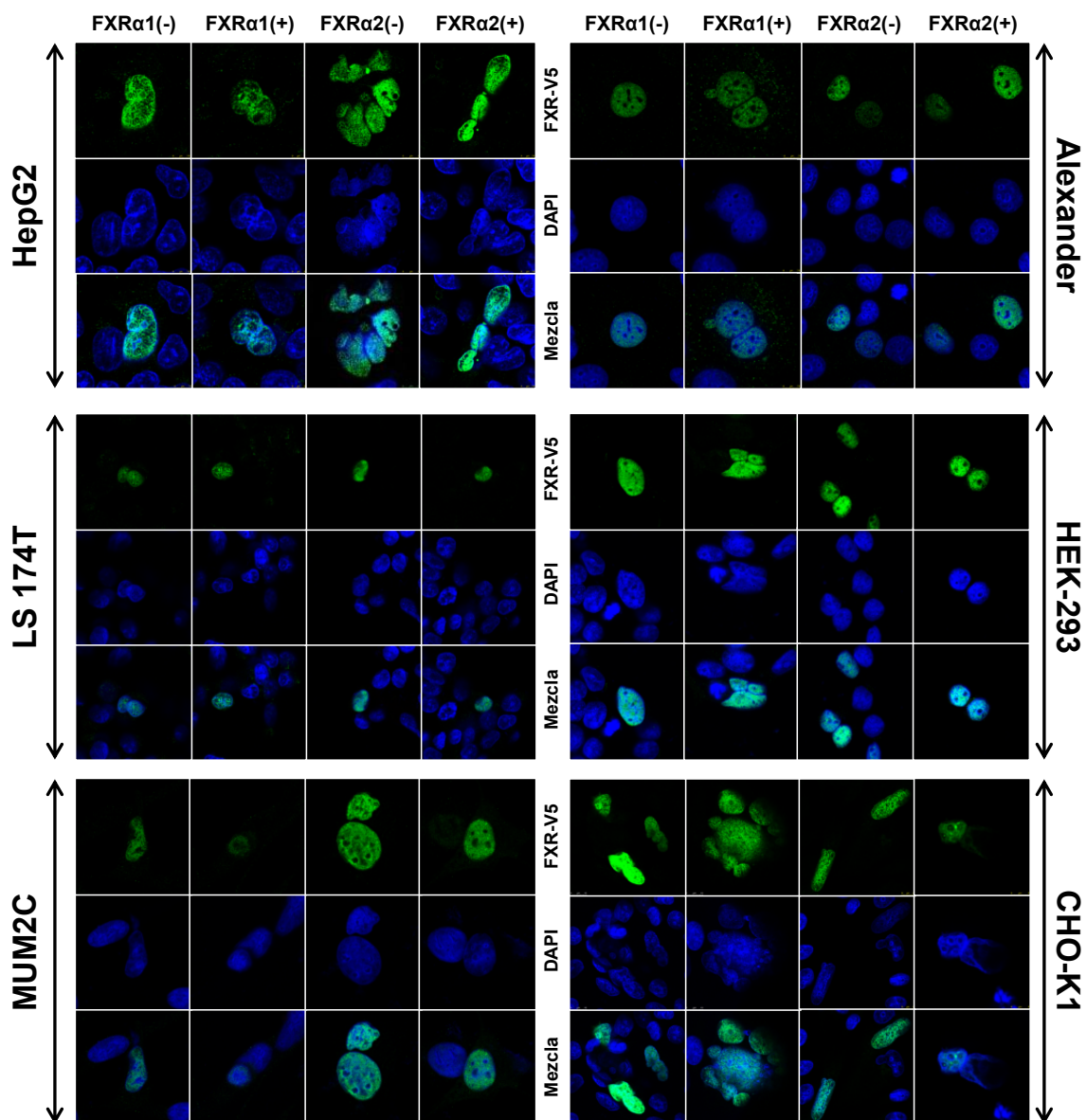


Figura RD-12. Imágenes representativas, obtenidas mediante microscopia confocal, de la inmunolocalización de FXR (fluorescencia verde) en líneas celulares humanas de origen hepático (HepG2 y Alexander), intestinal (LS 174T), renal (HEK-293) y melanoma (MUM2C) y en la línea de ovario de hamster (CHO-K1), transfectadas con una de las 4 isoformas de FXR seguida del epítipo antigénico V5. Los núcleos, de color azul, se tiñeron con DAPI.

En la Figura RD-12 se muestran las imágenes de microscopia confocal en las que se puede observar que las 4 isoformas de FXR presentaban una clara localización nuclear en todas las líneas celulares transfectadas, puesto que la fluorescencia verde que marcaba FXR colocalizaba perfectamente con la fluorescencia azul del DAPI, que tiñe los núcleos.

El residuo fosforilado por la PKC ζ que determina la localización nuclear de FXR es la treonina 438 (Frankenberg et al., 2008), localizada en el dominio AF2 del receptor nuclear, que es igual para todas las isoformas (Figura I-6), por lo que en principio el resultado era el esperado. Sin embargo, el hecho de que las 4 isoformas también se translocasen al núcleo en las células MUM2C y CHO-K1, indica que este mecanismo es independiente del tejido donde se expresa FXR y que no es exclusivo de la especie humana. De todas formas, no se puede descartar la existencia de mecanismos adicionales que determinen la localización nuclear de FXR.

Por tanto, en condiciones normales, FXR se encuentra localizado en el núcleo, al cual deben acceder sus agonistas para activarlo, y en determinadas patologías en las que la función de FIC1 o la PKC ζ se encuentre alterada esta localización puede modificarse, así como la actividad de FXR (Alvarez et al., 2004).

A continuación pasamos a analizar las propiedades de las distintas isoformas de FXR en lo que respecta a su activación por ligandos y la inducción de la expresión de sus genes diana. Puesto que la expresión endógena de FXR de las células HuH-7 y HepG2 podría complicar mucho el análisis de los resultados, decidimos realizar los experimentos en la línea celular Alexander, que al no expresar FXR nos permitiría transfectar las 4 isoformas y comparar su actividad sin interferencias. En este caso decidimos transfectar FXR junto con RXR, pero no con OATP1B1, para intentar disminuir la competencia de los distintos plásmidos por los mecanismos de transcripción y traducción, ya que todos compartían el mismo esqueleto y promotor, y que la expresión de las 4 isoformas fuera lo más parecida posible en todas las condiciones. Además, en estos experimentos incluimos una condición en la que se transfectaron las células con un vector vacío, para descartar posibles efectos de los agonistas utilizados independientes de FXR.

Para comprobar que la expresión de las 4 isoformas era similar en el momento de añadir los compuestos agonistas, también recogimos muestras a las 48 h de la transfección, para analizar la expresión de FXR y RXR. Como se observa en la Figura RD-13, nuestra hipótesis de que los diferentes plásmidos se transfectarían y expresarían de forma similar resultó correcta, ya que los niveles de FXR eran similares y en torno al 700% de hígado en todos los casos. Del mismo modo, los niveles de RXR fueron similares en las células transfectadas y aumentaron hasta casi el 500% de hígado. Los niveles de ambos receptores nucleares no se modificaron en las células transfectadas con el vector vacío, siendo nulos para FXR y en torno al 4% con respecto a hígado para RXR. La expresión de las 4 isoformas también era similar a nivel de proteína, como muestra el análisis de Western blot de la Figura RD-13A.

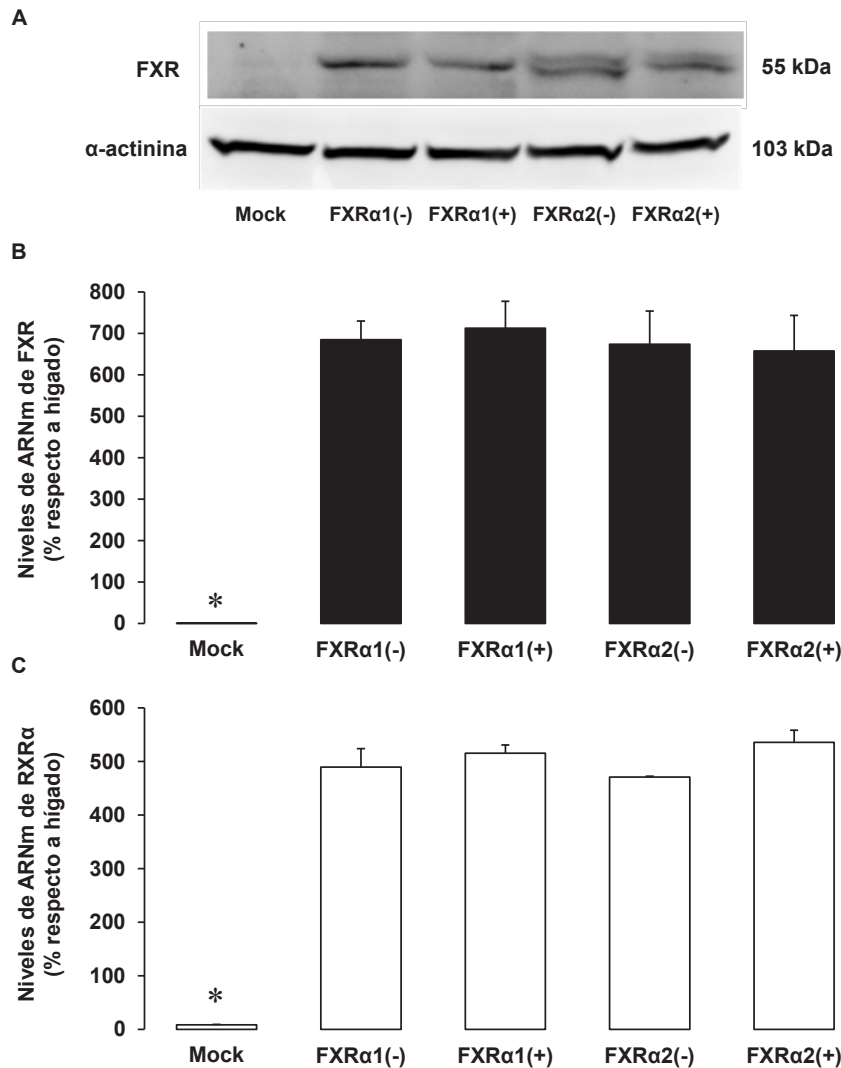


Figura RD-13. A. Imagen representativa de la detección por Western blot de FXR en muestras de lisados de células Alexander 48 h tras la transfección con un vector vacío (Mock) o cotransfectadas con las construcciones que contenían la ORF de una de las 4 isoformas de FXR junto con RXR α . Se utilizó α -actinina como control de carga. **B-C.** Niveles relativos de ARNm de FXR (B) y RXR α (C) en estas células, determinados por RT-QPCR. El ADN plasmídico remanente se eliminó de las muestras mediante tratamiento del ADNc con la enzima de restricción *DpnI*. Los valores se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células transfectadas con la isoforma FXR α 1(-).

Una vez comprobado que las condiciones experimentales eran las óptimas para comparar la actividad de las isoformas, decidimos estudiar como respondían a la activación por un agonista específico y potente de FXR como es el GW4064. Para ello, tratamos las células con 1 μ M de GW4064 o el vehículo (DMSO), durante 24 h, y analizamos la expresión de las 3 dianas más conocidas como en los anteriores experimentos, BSEP, SHP y OST β .

El tratamiento con DMSO no provocó cambios en la expresión de los genes analizados en ninguna de las condiciones de transfección. Del mismo modo, el tratamiento con GW4064 no modificó la expresión de los genes en las células transfectadas con el vector vacío. Como era de esperar, el tratamiento con el inductor de FXR fue capaz de inducir, de

forma significativa, la expresión de los 3 genes en las células transfectadas con las 4 isoformas. Sin embargo, se observaron 3 patrones de activación, uno diferente para cada diana.

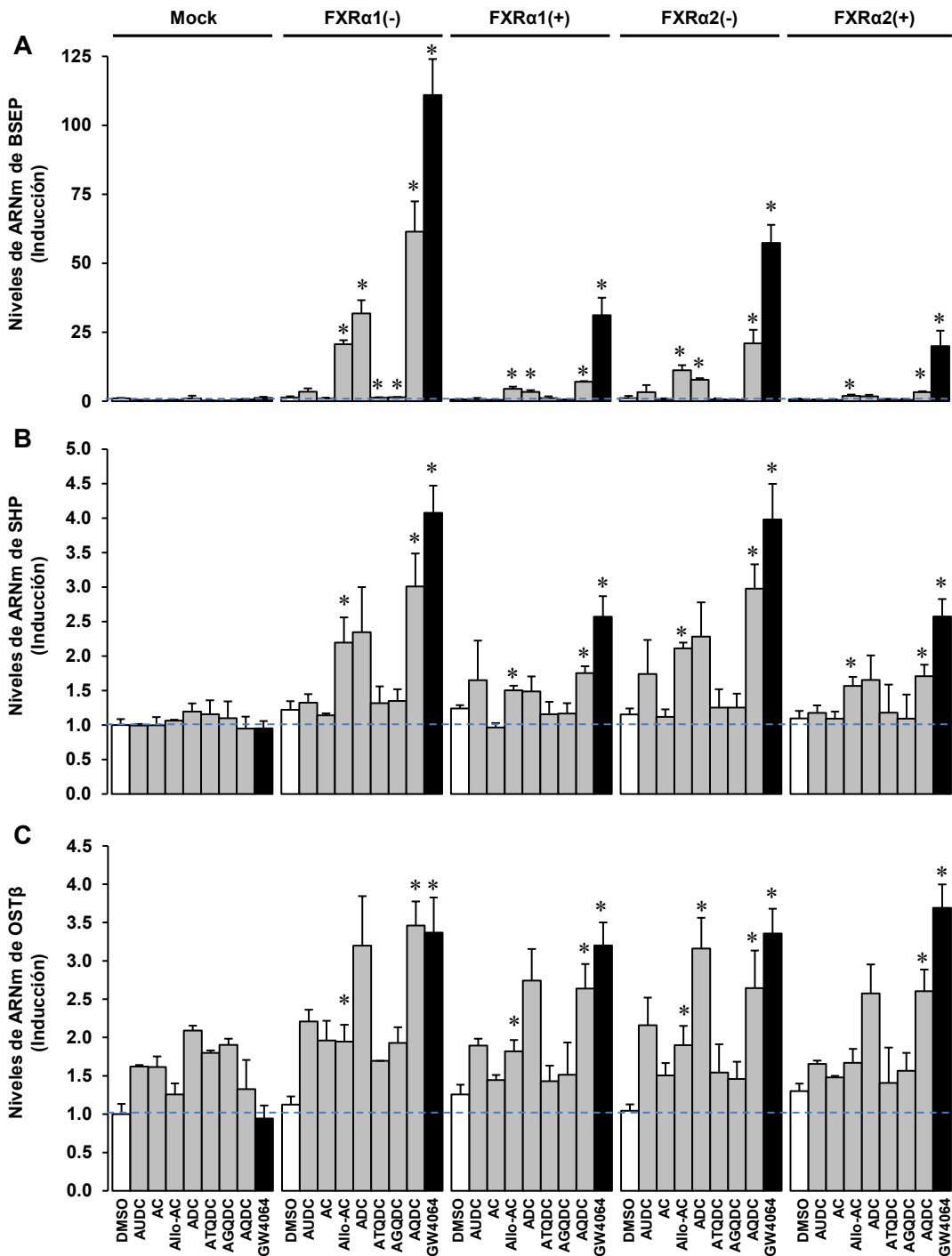


Figura RD-14. Niveles relativos de ARNm de BSEP (A), SHP (B) y OSTβ (C) en células Alexander transfectadas con un vector vacío (Mock) o cotransfectadas con una de las 4 isoformas de FXR junto con RXRα, y tratadas o no (DMSO, barras blancas) con 1 μM de GW4064 (barras negras) o 50 μM de distintas especies moleculares de ácidos biliares (barras grises) durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (Mock + DMSO) y son media ± EEM de, al menos, 3 cultivos. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de expresión de las células control. *, p<0.05, comparando con las células transfectadas con el vector vacío y tratadas con el mismo compuesto.

En el análisis del primer gen, BSEP (Figura RD-14A), se observó un patrón en el que la isoforma FXR α 1(-) fue la más potente, seguida de las isoformas FXR α 2(-), FXR α 1(+) y FXR α 2(+), cada una con menor potencia que las anteriores:

$$\text{FXR}\alpha 1(-) > \text{FXR}\alpha 2(-) > \text{FXR}\alpha 1(+) > \text{FXR}\alpha 2(+)$$

El patrón de activación de SHP (Figura RD-14B) fue diferente. Las isoformas sin inserto, FXR α 1(-) y FXR α 2(-), activaron la expresión del gen diana por igual, pero fueron más potentes que las isoformas con inserto, FXR α 1(+) y FXR α 2(+) que, a su vez, estimularon SHP por igual:

$$\text{FXR}\alpha 1(-) = \text{FXR}\alpha 2(-) > \text{FXR}\alpha 1(+) = \text{FXR}\alpha 2(+)$$

En el caso de OST β se observó un nuevo patrón de activación distinto a los dos anteriores (Figura RD-14C), en el que todas las isoformas del receptor nuclear fueron capaces de estimular la expresión de esta diana con la misma potencia:

$$\text{FXR}\alpha 1(-) = \text{FXR}\alpha 2(-) = \text{FXR}\alpha 1(+) = \text{FXR}\alpha 2(+)$$

Cuando comparamos el grado de inducción de los tres genes entre sí vimos que, al igual que ocurría en los experimentos de la Figura RD-10 para el AQDC, BSEP era mucho más sensible a la activación de FXR por GW4064 que SHP y OST β .

El mecanismo por el cual las distintas isoformas activan los genes diana de FXR con diferente potencia no se conoce todavía. Tradicionalmente las diferencias se han achacado a variaciones en las propiedades de unión al ADN de las 4 isoformas u otros factores, como la capacidad para interactuar con las proteínas coactivadoras del complejo de transcripción. En trabajos previos de otros grupos, realizados con las isoformas de FXR de ratón (Zhang et al., 2003), se asoció la incapacidad para inducir algunos genes diana de las isoformas FXR α (+), a que el inserto de cuatro aminoácidos dificultaba la interacción del receptor nuclear con los elementos de respuesta localizados en la región promotora de dichos genes. Esto parece lógico si pensamos que este inserto está localizado justo entre la región horquilla (H) y el dominio de unión al ADN (DBD) (Figura RD-1). Aunque esta hipótesis no se puede descartar, el hecho de que las 4 isoformas fueran capaces de activar por igual la expresión de OST β en nuestros experimentos, indica que las diferencias para unirse al ADN entre las isoformas con o sin inserto también pueden depender de las secuencias de unión a FXR localizadas en las regiones promotoras de las diferentes dianas de este receptor nuclear. Además, deben existir mecanismos adicionales que expliquen las diferencias de activación de BSEP por las isoformas FXR α 1 y FXR α 2, que a priori, deberían tener la misma capacidad para unirse al ADN. En este caso, las diferencias probablemente se deban a la existencia de cofactores del complejo de transcripción capaces de interactuar con diferente afinidad con el dominio N-terminal de cada isoforma.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de comparar las propiedades de las isoformas es la especie, tanto respecto a FXR, como al modelo celular en el que se transfectan. Por

ejemplo, en los experimentos que Zhang y colaboradores realizaron utilizando las isoformas de ratón y el promotor humano de SHP en células CV-1 derivadas de riñón de mono verde africano, no se observaron cambios de actividad luciferasa entre las células transfectadas con las diferentes isoformas (Zhang et al., 2003). En este mismo trabajo, tampoco observaron un patrón de activación claro entre las distintas isoformas de ratón cuando utilizaron el promotor de Bsep de ratón. Además, cuando repitieron los experimentos con el promotor mBsep en células HepG2, las pequeñas diferencias observadas en las células CV-1 entre las isoformas se redujeron al mínimo, probablemente debido al cambio de modelo y a que las HepG2 expresan FXR humano de forma endógena, el cual afectaría a la activación final del promotor. Por tanto, es importante utilizar un modelo en el que la forma de FXR endógena no afecte al resultado final, así como que la línea celular y el receptor nuclear provengan de la misma especie, para minimizar las diferencias artefactuales.

Tras comprobar el correcto funcionamiento del modelo celular con un agonista potente y muy específico, quisimos estudiar el comportamiento de las isoformas frente a los agonistas naturales de FXR, los ABs. Realizamos experimentos similares a los anteriores tratando las células durante 24 h con 50 μ M de varias especies de ABs. Debido a la complejidad de estos experimentos, decidimos eliminar del estudio las formas conjugadas de los ADC y AC, que no tuvieron ningún efecto en los experimentos realizados previamente, y el ALC por su elevada toxicidad.

Si consideramos los datos de cada isoforma por separado, se observa que la activación de las dianas por los ABs ensayados en estos experimentos es similar a la que exhibieron en los mostrados en la Figura RD-11, es decir, el AQDC fue el más potente (aunque por debajo del GW4064), seguido del ADC y el Allo-AC, que mostraron una potencia similar, mientras que el AC, el AUDC y las formas conjugadas del AQDC no tuvieron ningún efecto sobre la expresión de las dianas (Figura RD-14). Si es cierto, que el grado de activación de cada uno de los ABs (y el GW4064) fue ligeramente más elevado que en los experimentos de la Figura RD-11, aunque esto probablemente se deba a que al transfectar un plásmido menos que aquellos, los mecanismos de traducción de la célula fueron más eficientes y los niveles proteicos de FXR y RXR serían superiores a los de los experimentos en los que se transfectó también OATP1B1.

Al comparar la actividad de las 4 isoformas entre si se observan exactamente los mismos patrones de activación para todos los ABs que fueron capaces de inducir la expresión de las dianas (AQDC, ADC y Allo-AC) (Figura RD-14).

Esto queda aún más patente si realizamos una nueva representación de los datos y comparamos la actividad de las isoformas para cada uno de los ligandos que fueron capaces de activar a FXR (GW4064, AQDC, ADC y Allo-AC) con respecto a la isoforma FXR α 1(-) (Figura RD-15), que fue siempre igual o más potente que las demás. Se observa también mejor que los patrones de activación por parte de las isoformas son diana-dependientes.

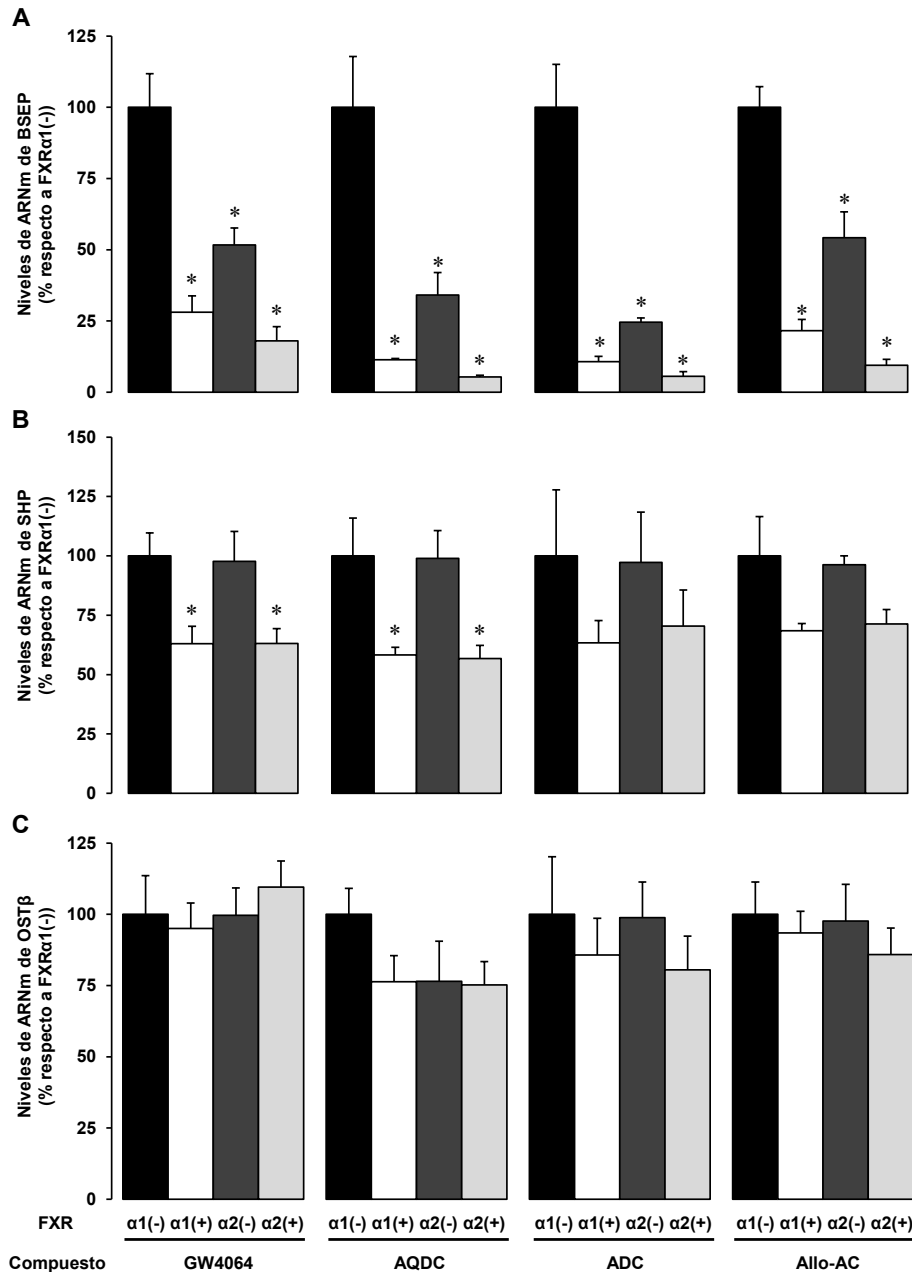


Figure RD-15. Niveles relativos de ARNm de BSEP (A), SHP (B) y OSTβ (C) en células Alexander cotransfectadas con una de las 4 isoformas de FXR junto con RXRα, y tratadas con 1 μM de GW4064 o 50 μM de AQDC, ADC o Allo-AC durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como porcentaje de expresión respecto a las células transfectadas con FXRα1(-) y son media ± EEM de, al menos, 3 cultivos. *, p<0.05, comparando con las células transfectadas con la isoforma FXRα1(-) y tratadas con el mismo compuesto.

En base a nuestros resultados, parece que la capacidad de los distintos ligandos para activar FXR es independiente de la isoforma y es la capacidad de estas para unirse al ADN y al resto de factores del complejo de transcripción la que determina las diferencias de activación entre las diferentes isoformas de FXR. Esto determina también que los resultados obtenidos previamente para FXRα1(-) se confirmen y los ABs conjugados carezcan, en este modelo celular, de capacidad para activar a cualquiera de las isoformas de este receptor nuclear.

4.1.4- Activación de FXR por ácidos biliares en líneas celulares intestinales humanas

4.1.4.1- Activación de las isoformas de FXR por ligandos endógenos y sintéticos

El hecho de que en células hepáticas la isoforma FXR α 1(-), que es la que se expresa mayoritariamente en hígado (Figura RD-2), fuese siempre igual o más eficaz que las demás, nos hizo preguntarnos si al comparar la actividad de las isoformas en una línea celular intestinal encontraríamos que FXR α 2, la isoforma característica de este tejido, era la más potente. Para comprobarlo, decidimos realizar experimentos en la línea celular Caco-2 de ACC, que ha sido ampliamente utilizada para el estudio de la función de FXR.

En experimentos previos habíamos observado que la eficacia de transfección de las líneas celulares intestinales disponibles en nuestro laboratorio era más baja que la de las células Alexander, por lo que decidimos transfectar solamente los plásmidos que contenían la ORF de las 4 isoformas de FXR o el vector vacío, ya que estas células expresaban niveles basales más altos de RXR (Figura RD-16), que podrían ser suficientes para que FXR llevase a cabo su función. Además, para simplificar los experimentos, incubamos las células con el agonista sintético y con el AB más potente en los experimentos previos, el AQDC.

Al igual que en los experimentos realizados en las células Alexander, se comprobó que la expresión de las 4 isoformas de FXR en las células Caco-2 transfectadas era similar en todas las condiciones experimentales (Figura RD16-A). Además, esta expresión fue muy superior a la encontrada en las células Alexander transfectadas, en torno a 1400% de hígado, probablemente porque sólo transfectamos el plásmido que contenía FXR.

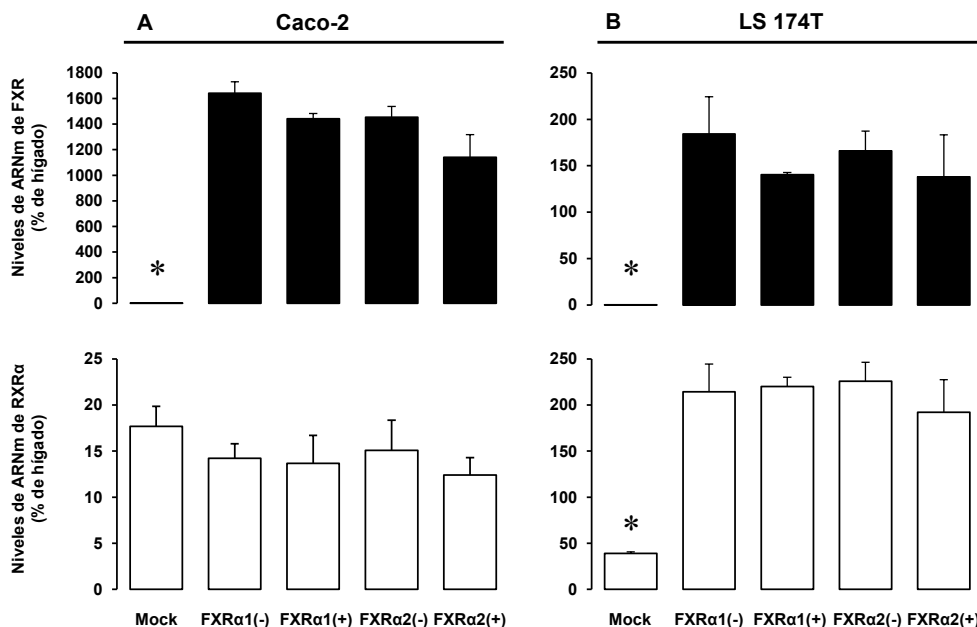


Figura RD-16. Niveles relativos de ARNm de FXR (barras negras) y RXR α (barras blancas) en células de adenocarcinoma de colon 48 h tras la transfección con un vector vacío (Mock) o con una de las 4 isoformas de FXR solamente (Caco-2, A) o junto con RXR α (LS 174T, B), determinados por RT-QPCR. El ADN plasmídico remanente se eliminó de las muestras mediante tratamiento del ADNc con la enzima de restricción *DpnI*. Los valores se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células transfectadas con la isoforma FXR α 1(-).

A continuación llevamos a cabo los experimentos, en los que incubamos las células con 50 μM de AQDC o 1 μM GW4064 durante 24 h, y determinamos, mediante RT-QPCR la expresión de 3 dianas conocidas de este receptor nuclear. En este caso, decidimos medir dos dianas específicas de intestino, como son FGF19 e IBABP, y una común con hígado, SHP, que nos permitiría comparar nuestros resultados con los obtenidos en células Alexander.

A diferencia de lo que esperábamos encontrar, la isoforma FXR α 1(-) volvió a ser igual o más potente que las demás en la inducción de las dianas (Figura RD-17A). Además, las isoformas con inserto (FXR α 1(+) y FXR α 2(+)), que en las células Alexander habían mostrado actividad (Figura RD-14), no tuvieron efecto en la inducción de la expresión de las dianas de FXR en las células intestinales.

Al igual que ocurría en las células Alexander, el GW4064 fue mucho más potente que el AQDC en la activación de FXR. De hecho, para dos de las dianas estudiadas, FGF19 y SHP, sólo el GW4064 fue capaz de inducir su expresión, mientras que para IBABP, que demostró ser mucho más sensible a la activación por FXR, ambos ligandos tuvieron efecto (Figura RD-17A). Como era de esperar, ninguno de los ligandos tuvo efecto en las células transfectadas con el vector vacío.

Otro dato confirmado por los experimentos realizados en esta línea celular es la existencia de patrones de activación, que variaban en función de la diana, por parte de las isoformas de FXR. En este caso observamos dos patrones. Un patrón compartido por FGF19 y IBABP, similar al de BSEP en las células Alexander, en el que la isoforma FXR α 1(-) era claramente más potente que la isoforma FXR α 2(-), y otro para SHP, similar también al encontrado en células Alexander para esta misma diana, en el que ambas isoformas activaban su expresión por igual.

Varios de los resultados obtenidos en las células Caco-2 nos sorprendieron, como la falta de actividad de las isoformas con inserto o la poca potencia mostrada por el AQDC, así como el hecho de que en una línea celular que deriva de un tejido que expresa en su mayoría isoformas FXR α 2 (Figura RD-2), sea la isoforma FXR α 1(-), característica del tejido hepático, la que muestre una mayor actividad. Por todo ello, decidimos confirmar los resultados en otra línea celular intestinal, la LS 174T.

Transfectamos las células LS 174T con el vector vacío o con una de las 4 isoformas de FXR junto con RXR, y las tratamos los dos agonistas a las mismas concentraciones y durante el mismo tiempo. En este caso decidimos transfectar también RXR para asegurarnos de que los efectos que viéramos no fueran artefactuales debido a que los niveles internos de este receptor nuclear fueran insuficientes para que FXR desempeñara su función. Como siempre, lo primero fue comprobar los niveles de los receptores nucleares a las 48 h de transfección. Al igual que en los demás experimentos, los niveles de FXR y RXR fueron similares en las 4 condiciones experimentales, y superiores a los de las células transfectadas con el vector vacío (Figura RD-16B). En este caso, los niveles de FXR fueron más bajos que en las células Caco-2, aunque superiores a los de hígado sano, y por tanto, muy superiores a los de colon, la parte del intestino del que derivan estas células.

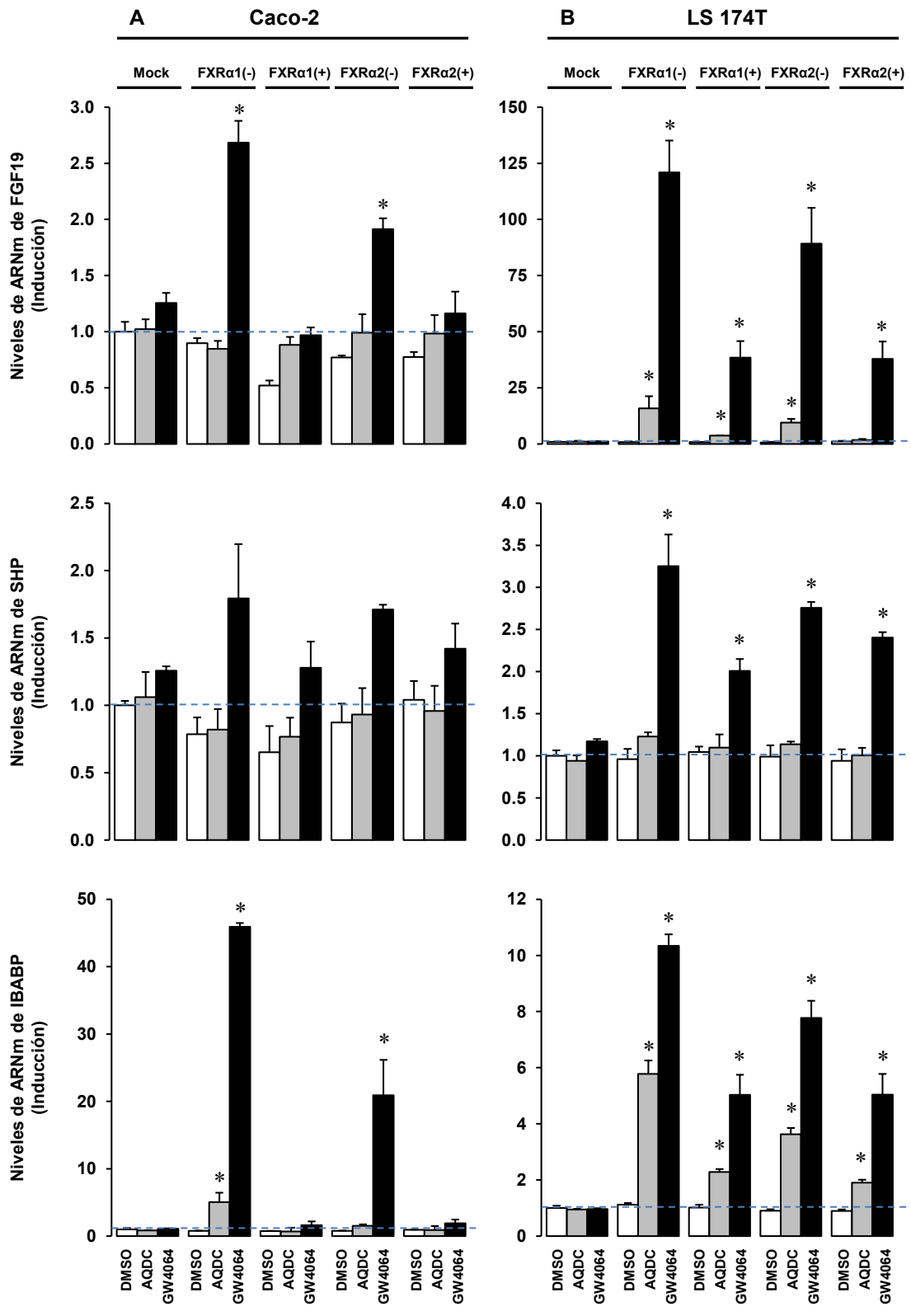


Figura RD-17. Niveles relativos de ARNm de FGF19, SHP e IBABP en células de adenocarcinoma de colon transfectadas con un vector vacío (Mock) o con una de las 4 isoformas de FXR solamente (Caco-2, A) o junto con RXR α (LS 174T, B), y tratadas o no (DMSO, barras blancas) con 1 μ M de GW4064 (barras negras) o 50 μ M de AQDC (barras grises) durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (Mock + DMSO) y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de expresión de las células control. *, $p < 0.05$, comparando con las células transfectadas con el vector vacío y tratadas con el mismo compuesto.

Al observar los efectos del AQDC y el GW4064 sobre la expresión de las 3 dianas comprobamos que los hallazgos de células Caco-2 se repetían en su mayoría en células LS 174T (Figura RD-17B). Por una parte, la isoforma FXR α 1(-) seguía siendo la más potente por encima de la FXR α 2(-), aunque en estas células las isoformas con inserto (FXR α 1(+) y FXR α 2(+)) sí fueron capaces de activar la expresión todos los genes diana estudiados. Los patrones de activación diferencial para las isoformas también se confirmaron en este modelo celular. Observamos patrones similares a los de las células Caco-2 para FGF19/IBABP y para SHP (Figura RD-17B). Otro hecho que se repitió fue la menor activación producida por el AQDC en comparación con el GW4064, que fue incluso inexistente para SHP. Desconocemos si este fenómeno, mucho más acusado en las dos líneas intestinales que en las células hepáticas (Figura RD-14), se debe a que las células LS 174T y Caco-2 son mucho más eficientes en la captación de GW4064 que las células Alexander o si existe algún factor característico del intestino que potencia la activación de FXR por GW4064.

Cuando comparamos de forma global los resultados obtenidos en las dos líneas celulares intestinales observamos un hecho curioso. En las células Caco-2 la diana más sensible a la activación por FXR fue IBABP y FGF19 apenas incrementó su expresión al doble o el triple de las células control (Figura RD-17A), mientras que en las células LS 174T se dio el caso contrario y FGF19 se indujo mucho más que IBABP (Figura RD-17B). La inducción de SHP fue similar en ambos casos. Esto demuestra de nuevo la importancia de la utilización de un buen modelo celular para analizar las propiedades de FXR, ya que, en nuestras condiciones experimentales, las células Caco-2 y LS 174T serían un buen modelo para estudiar la respuesta de IBABP y FGF19, respectivamente, pero no de SHP.

En resumen, nuestros datos indican que, independientemente de que la procedencia de la línea celular utilizada sea hepática o intestinal, la isoforma FXR α 1(-) es siempre igual o más potente que las demás y que existen patrones de activación por las distintas isoformas de FXR característicos de las dianas de este receptor nuclear. Estos resultados, junto con los mostrados en la Figura RD-2, apuntan a que no es la potencia de activación exhibida por las isoformas la que explica las diferencias de expresión entre los distintos tejidos analizados, sino que deben existir factores adicionales que expliquen el porqué de la existencia de las 4 isoformas de FXR y su peculiar distribución tisular (Figura RD-2). Una de las posibilidades es que las distintas isoformas tengan distinta afinidad por las secuencias consenso localizadas en las regiones promotoras de las dianas y se unan a conjuntos diferentes de genes, como apunta un trabajo publicado recientemente, en el que se observó que FXR era capaz de unirse a diferentes conjuntos de genes en hígado e intestino de ratón, aunque algunos de ellos eran compartidos (Thomas et al., 2010). Incluso hay datos que apoyan el que la capacidad de unión al ADN de FXR podría modificarse en determinadas patologías (Lee et al., 2012). Otra de las posibilidades, que no descarta la anterior, es que las isoformas características de hígado o intestino tengan distinta afinidad por determinados cofactores del complejo de transcripción, lo que vendría determinado por el extremo N-terminal diferencial, aunque de momento no hay datos en la literatura referentes a FXR que apoyen esta hipótesis.

4.1.4.2- Actividad agonista de ácidos biliares libres y conjugados

Como ya se ha mencionado, un estudio publicado recientemente apunta a que la desconjugación de los ABs por las bacterias intestinales incrementa la activación del FXR expresado en el íleon de ratón (Kuribayashi et al., 2012), por lo que el siguiente paso de nuestro trabajo fue estudiar si los ABs conjugados mostraban o no actividad agonista de FXR en una línea celular intestinal humana.

Decidimos utilizar las células LS 174T, ya que era el modelo celular intestinal en el que obtuvimos mejores resultados en cuanto a la inducción de la expresión de dianas de FXR por el AQDC (Figura RD-17). Para que estos resultados fueran comparables con el modelo hepático de transfección, las células Alexander, decidimos transfectar también las células intestinales con OATP1B1, además de FXR y RXR, y para descartar algún efecto isoforma-dependiente en estos experimentos, transfectamos las isoformas FXR α 1(-) y FXR α 2(-) por separado.

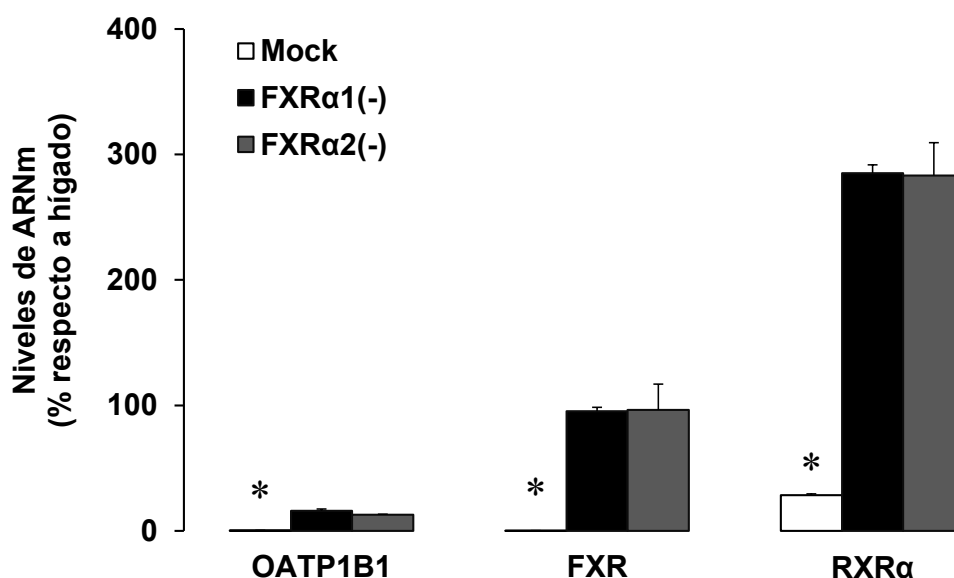


Figura RD-18. Niveles relativos de ARNm de OATP1B1, FXR y RXR α en células LS 174T 48 h tras la transfección con un vector vacío (Mock) o con RXR α y OATP1B1 junto con la isoformas FXR α 1(-) o FXR α 2(-), determinados por RT-QPCR. El ADN plasmídico remanente se eliminó de las muestras mediante tratamiento del ADNc con la enzima de restricción *DpnI*. Los valores se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células transfectadas con la isoforma FXR α 1(-).

El análisis de los niveles de expresión de los plásmidos transfectados confirmó una vez más que la eficacia de transfección de los mismos fue similar en ambas condiciones experimentales (Figura RD-18). La expresión de las 3 proteínas fue muy superior a la de las células transfectadas con el vector vacío y, para FXR y RXR, similar a los experimentos mostrados en la Figura RD-16B. Los niveles de expresión de OATP1B1, aunque bajos en comparación con los de las células Alexander transfectadas con este plásmido ($\approx 300\%$ con respecto a hígado, Figura RD-8B), eran aproximadamente 50 veces superiores a los de las células LS 174T transfectadas con el vector vacío (Figura RD-18).

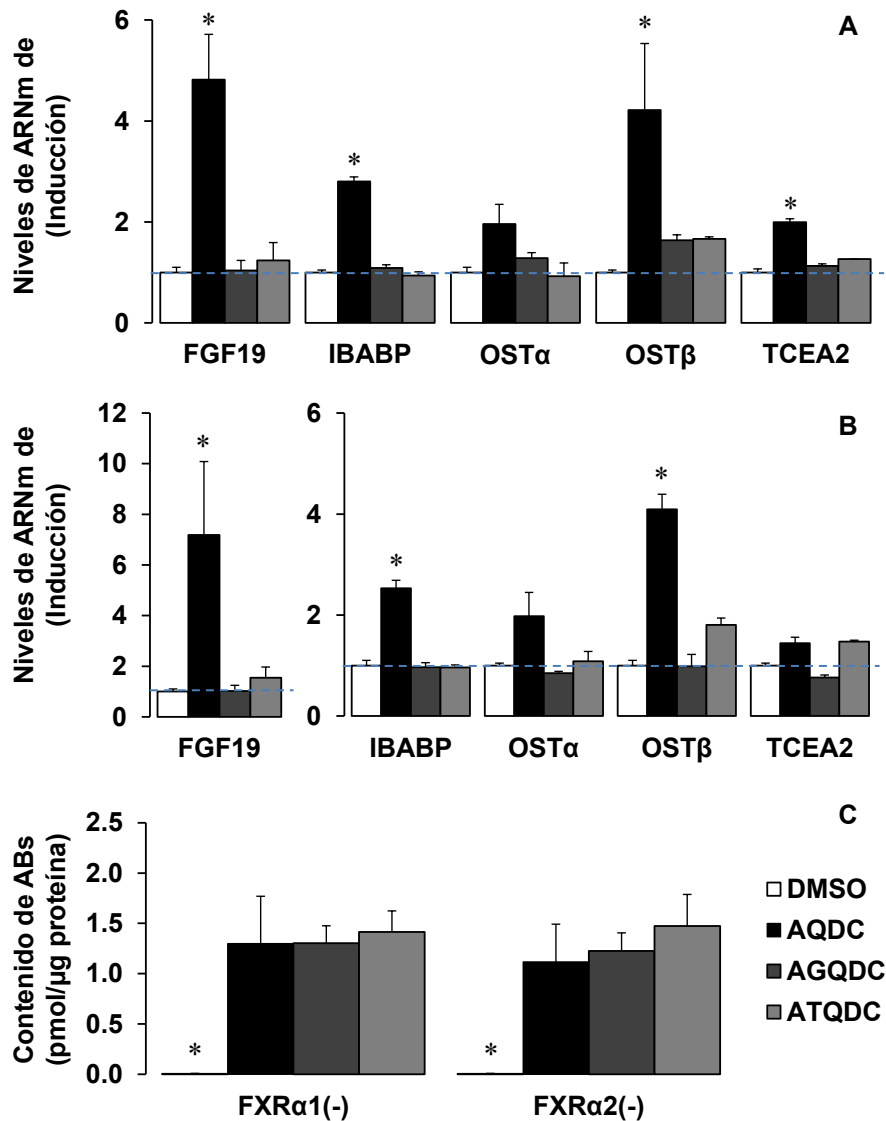


Figura RD-19. A-B. Niveles relativos de ARNm de FGF19, IBABP, OST α , OST β y TCEA2 en células LS 174T transfectadas con OATP1B1 y RXR α junto con las isoformas FXR α 1(-) (A) o FXR α 2(-) (B), y tratadas o no (DMSO) con 50 μ M de AQDC, 100 μ M de AGQDC o 100 μ M ATQDC durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de expresión de las células control. *, $p < 0.05$, comparando con las células control (DMSO). **C.** Contenido de ácidos biliares (ABs) en estas células. Los valores se expresan como media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, $p < 0.05$, comparando con las células tratadas con AQDC.

Las células así transfectadas se trataron con 50 μ M de AQDC o con 100 μ M de AGQDC o ATQDC, para intentar conseguir niveles intracelulares similares de los 3 ABs, ya que en experimentos previos habíamos comprobado que la captación de la forma libre también está favorecida en estas células. Tras 24 h de exposición a los ABs se determinó, mediante RT-QPCR, la expresión de varias dianas de FXR (Figura RD-19). En este caso no se analizó SHP, puesto que ya habíamos visto que el AQDC no era capaz de inducir su expresión en estas células (Figura RD-17B). En la Figura RD-19 se observa que el único AB capaz de activar todas las dianas de FXR estudiadas fue el AQDC libre, mientras que sus formas conjugadas solamente mostraron una débil capacidad de activación en el caso de OST β . Estos resultados son muy similares a los obtenidos en las células hepáticas carentes de expresión endógena de FXR, las células Alexander (Figura RD-10).

El análisis del contenido intracelular de ABs en estas condiciones reveló en primer lugar que, como cabía esperar, estas células carecen de la capacidad de conjugarse el AQDC administrado. En la Figura RD-19D se observa que, en todos los casos, se encontraron cantidades similares de ABs en las células incubadas con ellos, por lo que, una vez más, la mayor potencia de activación de FXR encontrada para el AQDC libre no puede atribuirse a una mayor concentración intracelular de este compuesto.

4.1.5- Hipótesis propuestas para explicar las diferencias de actividad de los ácidos biliares libres y conjugados

Tomando en conjunto los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral y lo publicado en la literatura en lo referente a la capacidad de los ABs libres y conjugados para activar a FXR, podríamos proponer dos hipótesis que explicarían nuestros hallazgos.

La primera sería que los ABs libres son capaces de activar FXR en células hepáticas humanas, pero no en las intestinales, es decir, que la diferencia se debe a un factor dependiente del territorio en que se expresa este receptor nuclear. La segunda hipótesis sería que los ABs conjugados pueden activar a FXR en ambos tipos celulares en la especie humana, pero existe un factor o factores, desconocidos hasta el momento, que se pierden bien en el proceso de desdiferenciación o acompañando a la pérdida de expresión de FXR que se da en células tumorales como las Alexander y las LS 174T.

En cualquier caso, en nuestras condiciones experimentales parece evidente que debe existir un factor adicional, ya sea un cofactor proteico del complejo de transcripción o una modificación postraduccional de FXR, que los ABs conjugados, pero no los libres, necesitan para que se produzca la liberación del complejo corepresor y el reclutamiento del complejo coactivador. En la Figura RD-20 se recoge un esquema que ilustra el mecanismo propuesto.

Para dilucidar cuál de las dos hipótesis es correcta sería interesante reproducir los experimentos llevados a cabo en hepatocitos en cultivo primario, en células intestinales humanas sanas (ileocitos o colonocitos), de forma que si los ABs conjugados no fuesen capaces de activar a FXR en ellas la primera hipótesis sería válida, y podríamos proponer la existencia de algún factor hepático que está ausente en intestino, y que se requiere para la activación de FXR por los ABs conjugados. Por el contrario, si estos compuestos indujeran la expresión de las dianas de FXR en células intestinales bien diferenciadas la segunda hipótesis ganaría peso, y la ausencia de respuesta en intestino de ratón "in vivo" (Kuribayashi et al., 2012) habría que atribuirlo a diferencias interespecíficas.

Independientemente de cuál sea el mecanismo implicado, es importante señalar que las diferencias encontradas en cuanto a la activación de FXR por parte de los ABs libres y sus formas conjugadas podrían cobrar importancia fisiopatológica en determinadas situaciones. En este sentido, nuestro grupo ha descrito recientemente que el tratamiento con glucocorticoides en ratas produce una alteración en el perfil de conjugación de los ABs que,

además, va asociado a una disminución de los niveles de expresión de FXR (Rosales et al., 2013). Del mismo modo, como se comentará en el siguiente apartado, la tumorigénesis hepática e intestinal también se acompaña de una disminución en los niveles de este receptor nuclear. Cabría esperar que cambios en el patrón de conjugación de ABs en estas situaciones modifiquen la respuesta de FXR, actuando como un mecanismo de modulación de la actividad de este receptor nuclear.

Células hepáticas/diferenciadas

Células intestinales/desdiferenciadas

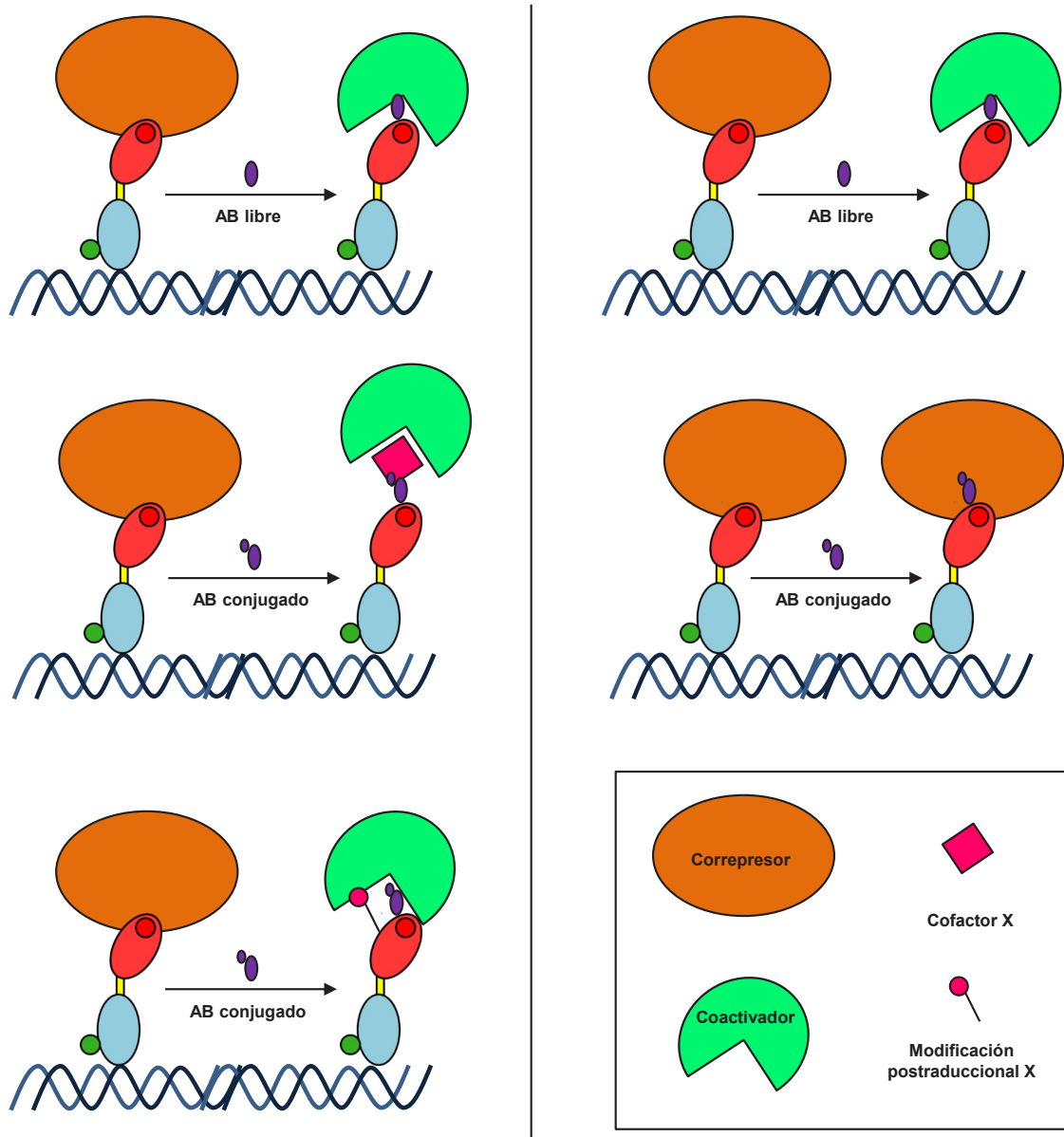


Figura RD-20. Modelo propuesto para explicar las diferencias de activación de ácidos biliares (ABs) libres y conjugados sobre FXR en células hepáticas e intestinales.

4.2- PAPEL DE FXR EN LOS MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA DE TUMORES DEL CIRCUITO ENTEROHEPÁTICO

Los tumores del circuito enterohepático constituyen uno de los grupos más frecuentes de cáncer a nivel mundial y sólo el cáncer de pulmón se sitúa por delante en lo que se refiere a la tasa de mortalidad (Ferlay et al., 2007; Ferlay et al., 2010). Independientemente de que el origen sea hepático o intestinal, la primera opción terapéutica para el tratamiento de estos tumores es la resección quirúrgica. Sin embargo, existen situaciones en las que estos tumores no son operables y se recurre a la terapia farmacológica con agentes antitumorales. En este sentido, el gran problema al que se enfrenta la lucha contra el cáncer actualmente es la aparición de resistencia al tratamiento con este tipo de fármacos por parte del tumor. En ocasiones el tumor desarrolla resistencia a lo largo del proceso terapéutico, mientras que en otras ocasiones la quimiorresistencia está presente antes incluso de empezar el tratamiento. Esta resistencia se debe en parte a cambios de expresión de genes pertenecientes a los mecanismos de quimiorresistencia (MOCs) descritos en el apartado 2.5 de esta Tesis Doctoral. Las proteínas codificadas por estos genes están presentes tanto en los tejidos sanos, donde se encargan de defender a las células del estrés químico producido por compuestos potencialmente tóxicos, como en las células tumorales, donde entorpecen el efecto antitumoral de los fármacos quimioterapéuticos.

FXR se ha considerado tradicionalmente como un receptor específico para los ABs, involucrado en el control de la expresión de genes encargados de mantener su homeostasis y la de otros lípidos y la glucosa (Lefebvre et al., 2009; Zhang y Edwards, 2008). Sin embargo, recientemente se ha descrito su papel en otros procesos como la prevención de la tumorigénesis hepática e intestinal (Kim et al., 2007; Modica et al., 2008), la regeneración hepática (Chen et al., 2010), el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal (Inagaki et al., 2006), la atenuación de la colestasis (Stedman et al., 2006) y la prevención de la formación de cálculos biliares (Moschetta et al., 2004). Para llevar a cabo varias de estas funciones, este receptor nuclear regula la expresión de numerosos genes que incluyen los que codifican para ciertas enzimas de oxidación de fase I (CYP3A4) (Gnerre et al., 2004), enzimas de conjugación de fase II (UGT2B4 y SULT2A1) (Barbier et al., 2003; Song et al., 2001) y transportadores de fase III (MRP2 y MDR3) (Huang et al., 2003; Kast et al., 2002), lo que podría sugerir un posible papel de FXR en el metabolismo de xenobióticos. De hecho, se ha descrito recientemente que este receptor nuclear puede proteger a las células frente a la toxicidad producida por ciertos compuestos xenobióticos (Lee et al., 2010; Noh et al., 2011; Williams et al., 2012).

Teniendo en cuenta que los tejidos que forman parte del sistema enterohepático expresan altos niveles de FXR, y que muchos de los genes diana implicados en las funciones detoxificantes de este receptor nuclear se han asociado a algunos MOCs, el principal objetivo de este apartado fue determinar si existían cambios de expresión de FXR en tumores hepáticos e intestinales y si esos cambios estaban relacionados con la expresión de genes involucrados en los MOCs de esos tumores. Además, debido a la diferente distribución de las isoformas de FXR en estos órganos (Figura RD-2), y a los resultados descritos en el

apartado 4.1.1, en donde se observó una clara diferencia en la potencia de las distintas isoformas para activar sus genes diana (Figuras RD-14/17), se incluyó en este estudio el análisis de las isoformas de FXR en estos tumores y su relación con los MOCs.

4.2.1- Papel de FXR en la activación de mecanismos de quimiorresistencia en tumores hepáticos

En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación, que formaba parte de la Tesis Doctoral del Dr. Pablo Martínez Becerra, se analizaron, mediante tarjetas microfluidicas (TLDA), los niveles de expresión de 90 genes implicados en MOCs relacionados con tumores gastrointestinales, con el objetivo de desarrollar un test para predecir la falta de respuesta a la quimioterapia antitumoral. Los niveles de expresión se analizaron en muestras pareadas de tejido sano y tejido tumoral, que procedían de pacientes que no habían sido tratados previamente y a los que se hicieron biopsias con fines diagnósticos. También se analizó la expresión génica en líneas celulares de origen hepático, y el efecto de la exposición de éstas, durante 72 h, a concentraciones de cisplatino equivalentes al valor de IC_{50} , determinado para cada línea celular en estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación.

A pesar de que el análisis de las muestras procedentes de los pacientes mostró una considerable heterogeneidad en la firma genética de los diferentes individuos, también se observaron ciertas tendencias a la sobreexpresión o represión de determinados genes pertenecientes a MOCs, como por ejemplo la sobreexpresión del gen *BIRC5* y la represión de *SLC22A1* y *CYP1A2*, que se encontraron en todos los tipos de tumores hepáticos estudiados (Figura RD-21).

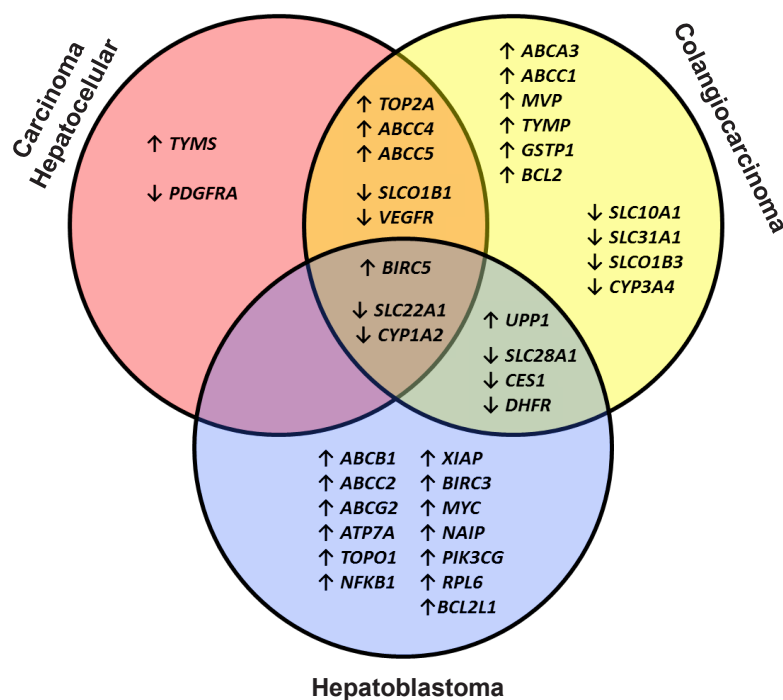


Figura RD-21. Esquema de los perfiles de expresión génica de genes implicados en el fenotipo MDR entre diferentes tipos de cáncer hepático.

El objetivo del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral era determinar si existían cambios de expresión de FXR y de la proporción de sus isoformas en los tumores, y si esos cambios estaban relacionados con la inducción o represión de los diferentes genes pertenecientes a MOCs, que se había observado previamente.

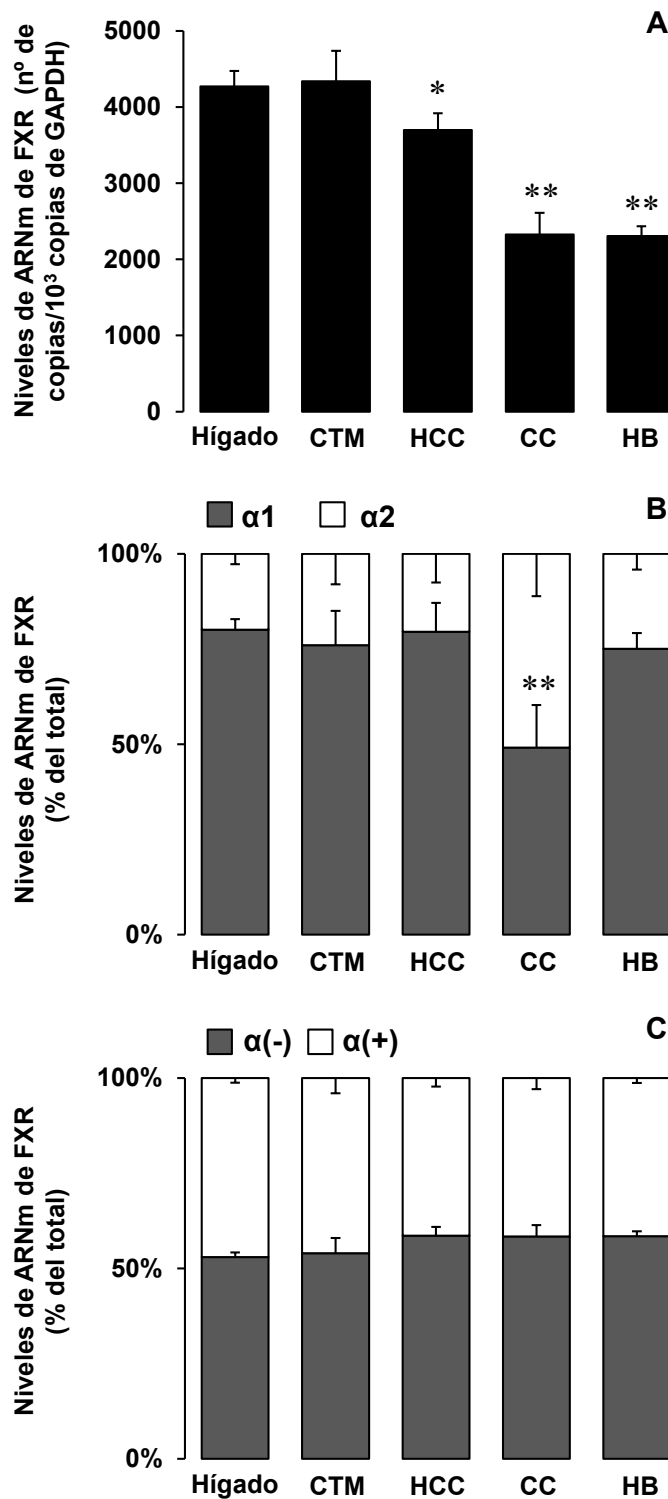


Figura RD-22. Cuantificación absoluta de los niveles totales de ARNm de FXR (A) y de las proporciones de sus isoformas (B y C) en muestras de hígado sano (n = 13), carcinoma hepatocelular (HCC, n = 12) y los márgenes cirróticos del tumor (CTM, n = 5), colangiocarcinomas (CC, n = 12) y hepatoblastomas (HB, n = 12). Los valores se expresan como media ± EEM. *, p < 0.05; **, p < 0.01, comparando la abundancia total y las proporciones con los de hígado sano.

Cuando analizamos la expresión de FXR en las muestras observamos que este receptor nuclear no se encontraba sobreexpresado en los tumores, sino que, por el contrario, su expresión se encontraba reducida de forma significativa en las muestras de HCC y de forma aún más acusada en las muestras de CC y HB (Figura RD-22A). Curiosamente, los niveles de expresión de FXR en muestras obtenidas de los márgenes cirróticos del tumor (CTM) se mantenían al nivel del hígado sano, a pesar de que este tipo de tejido (considerado un estadio intermedio en la transición de tejido sano a tumor) ya tenía activados algunos de los mecanismos de quimiorresistencia que se encontraron en las muestras de HCC. Es importante resaltar que en el caso de las muestras procedentes de CC la reducción encontrada en los niveles de expresión de FXR puede deberse a una represión de la transcripción del gen NR1H4, pero también a que la expresión basal de este receptor nuclear sea menor en los colangiocitos. En el caso de las muestras de HB, en este trabajo no se han realizado medidas de expresión de FXR en hígado fetal (del que deriva este tipo de tumores), pero los datos recogidos en la bibliografía indican que la expresión de este receptor nuclear es similar en hígado fetal e hígado adulto (Huber et al., 2002), por lo que los niveles de expresión encontrados en las muestras de HB en este trabajo pueden deberse a un mecanismo de represión génica de este receptor nuclear durante el proceso de carcinogénesis.

Cuando analizamos la expresión de las isoformas de FXR en las mismas muestras no encontramos ningún cambio en las proporciones de isoformas FXR α 1 y FXR α 2 en HCC ni en HB con respecto a hígado sano (Figura RD-22B), en el que, como se comentó en el apartado 4.1.1, hay una mayor proporción de isoformas FXR α 1. Sin embargo, en el caso del CC observamos que la proporción de isoformas FXR α 1 y FXR α 2 era aproximadamente del 50% (Figura RD-22B). En el apartado 4.1.1 se explicó que las líneas celulares derivadas de CC intrahepático (CAA 10417 y HuH-28) tenían una mayor proporción de isoformas FXR α 1, mientras que las líneas celulares derivadas de CC extrahepático (EGI-I y TFK-1) presentaban una mayor proporción de isoformas FXR α 2. Teniendo en cuenta estos resultados, se analizó la proporción de isoformas de manera individual en las muestras de CC y se observó que algunas muestras tenían una mayor proporción de isoformas FXR α 1 y otras de FXR α 2, y es al mediar todas cuando obtuvimos la proporción del 50%.

En el caso de la proporción de isoformas FXR α (+) y FXR α (-), nuestro análisis no mostró diferencias significativas entre el hígado sano y los distintos tipos de tumores hepáticos, manteniéndose la proporción de ambas en torno al 50% (Figura RD-22C).

Por otra parte, el estudio llevado a cabo en las líneas celulares mostró que los perfiles de expresión génica de las líneas derivadas de los distintos tumores tenían cierta similitud con los perfiles encontrados en los tumores parentales (Martinez-Becerra, 2010). En este sentido, líneas celulares como SK-Hep-1 y Alexander, cuya expresión de FXR es prácticamente nula (Figura RD-2), ya presentaban cambios en la expresión de varios genes pertenecientes a MOCs (Martinez-Becerra, 2010).

Por tanto, tomando en conjunto los datos de las muestras de pacientes y de las líneas celulares parece claro que la sobreexpresión de FXR, y quizá ni siquiera su presencia, son necesarias para la expresión del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) característico de los tumores hepáticos.

4.2.2- Papel de FXR en la activación de mecanismos de quimiorresistencia en tumores de colon

Para completar el estudio anterior, se llevó a cabo un trabajo similar, que formaba parte del Trabajo de Grado de la Licenciada Isabel Monte Grondona, con el objetivo de analizar los MOCs implicados en la falta de sensibilidad a la quimioterapia de los tumores intestinales, uno de los tipos más frecuentes de cáncer del circuito enterohepático. Para ello, se analizó, mediante TLDA, la expresión de los mismos genes incluidos en el estudio de los tumores hepáticos, en 10 muestras pareadas de tejido sano y de ACC procedentes de pacientes que no habían recibido tratamiento. Al igual que en el estudio anterior se realizaron también experimentos en líneas celulares derivadas de ACC, la línea celular LS 174T silvestre y una sublínea parcialmente resistente al cisplatino (LS 174T/R), generada previamente en nuestro laboratorio por el Dr. Oscar Briz Sánchez. Se analizó el efecto de la exposición de ambas líneas a concentraciones de cisplatino equivalentes al valor de IC_{50} durante 72 h, sobre la expresión de genes de quimiorresistencia.

Al igual que en el estudio de los tumores hepáticos, el análisis mostró importantes diferencias interindividuales entre las distintas muestras de ACC, en cuanto a la expresión de los genes pertenecientes a MOCs, aunque también se detectaron claras tendencias en la sobreexpresión o represión de algunos de ellos. Centrándonos en los cambios de expresión que, teóricamente, favorecerían la resistencia de las células tumorales a diversos fármacos quimioterapéuticos, se encontró que los genes *ABCC2*, *VEGFR*, *MYC*, *RPL6* y *BIRC5*, estaban sobreexpresados, mientras que *BCL-2* se encontraba reprimido (Monte, 2010). En ese trabajo también se detectaron algunos cambios importantes que podrían influir en la vectorización de fármacos hacia este tipo de tumores, como es la sobreexpresión de dos genes que codifican proteínas transportadoras de captación, *OCT2* y *OATP1B3*, que juegan un importante papel en la entrada de varios fármacos antitumorales al interior de la célula (Abe et al., 2001; Marin et al., 2010; Yonezawa et al., 2006).

Debido a que los cambios de expresión en estos genes tienen considerable relevancia a la hora de elegir el tratamiento idóneo para los pacientes con esta patología, en esta Tesis Doctoral decidimos ampliar el estudio y analizar, mediante RT-QPCR convencional, la expresión de estos genes en otra tanda de muestras, hasta alcanzar un total de 19 parejas de tejido sano y ACC. Los resultados obtenidos (Figura RD-23) confirmaban en todos los casos los resultados de las TLDA, siendo los cambios de todos los genes antes mencionados estadísticamente significativos.

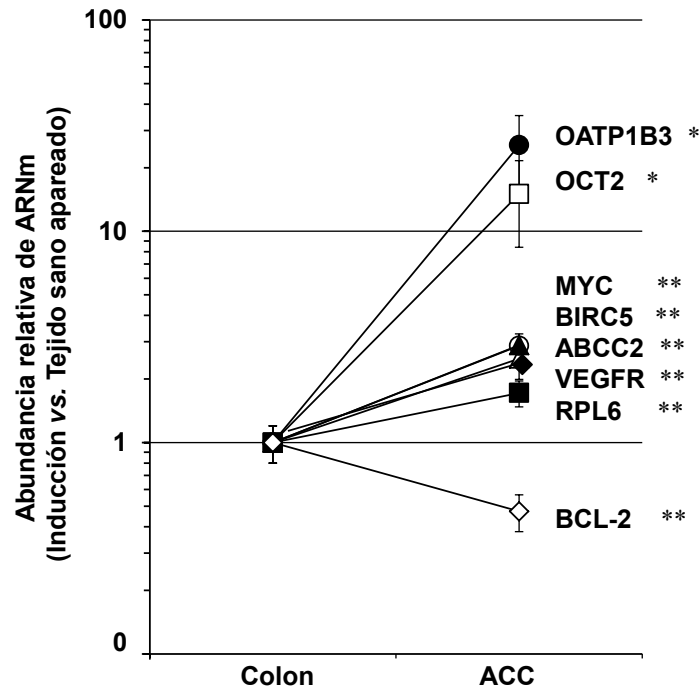


Figura RD-23. Re-evaluación mediante RT-QPCR convencional de los cambios en la expresión de los genes más relevantes involucrados en el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en adenocarcinoma de colon (ACC) detectados mediante TLDA. Los valores se expresan como media \pm EEM y son media de 19 muestras pareadas de colon sano y ACC. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, comparando con el tejido sano.

El siguiente paso fue investigar si la expresión de FXR y sus isoformas se encontraba modificada en los tumores, y si los cambios estaban relacionados con los cambios de expresión de los genes involucrados en el fenotipo MDR característico de este tipo de tumores.

Al igual que en el caso anterior, observamos que los niveles de FXR se reducían de forma estadísticamente significativa en las muestras tumorales (Figura RD-24).

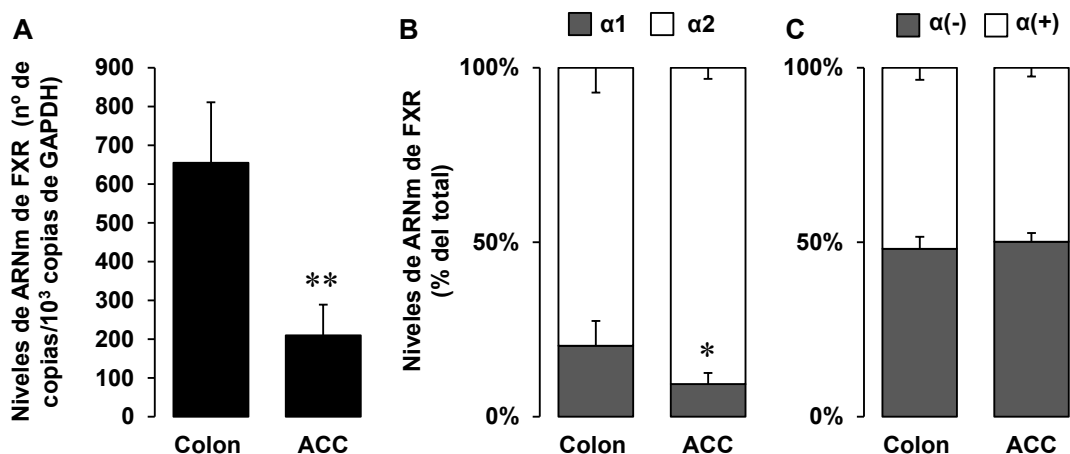


Figura RD-24. Cuantificación absoluta de los niveles totales de ARNm de FXR (A) y de las proporciones de sus isoformas (B-C) en 19 muestras pareadas de colon sano y adenocarcinoma de colon (ACC), determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como media \pm EEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, comparando la abundancia total y las proporciones con las del tejido sano.

Esta reducción en los niveles de ARNm se confirmó también mediante inmunohistoquímica en varias muestras de tejido sano y ACC (Figura RD-25).

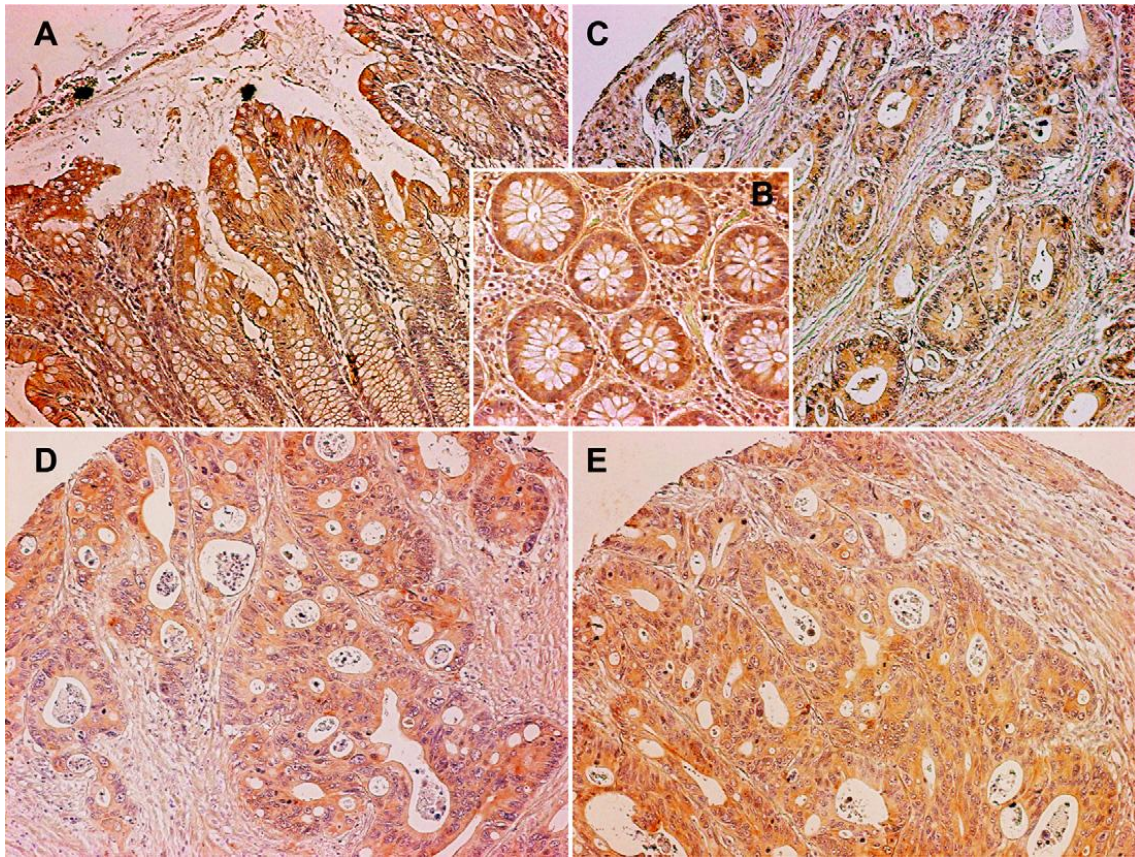


Figura RD-25. Análisis mediante inmunohistoquímica de la expresión de FXR (marcaje marrón), comparando dos cortes de colon humano sano (A, B) con 3 cortes de adenocarcinoma de colon con niveles reducidos (C), o muy bajos (D, E), de expresión de FXR.

El análisis de la proporción de isoformas no mostró apenas cambios para los niveles relativos de isoformas FXR α (+) y FXR α (-) (Figura RD-24C), que se mantuvieron en una proporción del 50%, mientras que se detectó un pequeño incremento en la proporción de isoformas FXR α 2 con respecto a las FXR α 1 en los tumores, aunque éstas ya eran las isoformas claramente predominantes en el tejido sano (Figura RD-24B). Por tanto, en este caso tampoco parece probable que se pueda atribuir el fenotipo MDR propio del ACC a una sobreexpresión de FXR o a un cambio en sus isoformas.

Por último, las líneas celulares derivadas de ACC, LS 174T y LS 174T/R, se trataron con cisplatino con el objeto de simular el estrés farmacológico al que se verían sometidas las células de los tumores de un paciente bajo tratamiento. Los análisis por TLDA revelaron que tanto las células silvestres como las resistentes, mostraban cambios en la expresión de genes pertenecientes a los diferentes MOCs, que favorecerían la quimiorresistencia de las células (Monte, 2010), a pesar de que, como vimos previamente (Figura RD-2), las células LS 174T expresan niveles de FXR demasiado bajos como para justificar un efecto a este respecto. Sin embargo, el análisis de los niveles de ARNm de FXR en las células resistentes aportó un dato sorprendente, ya que sobreexpresaban aproximadamente 300 veces este receptor nuclear con respecto a las células silvestres (Figura RD-26).

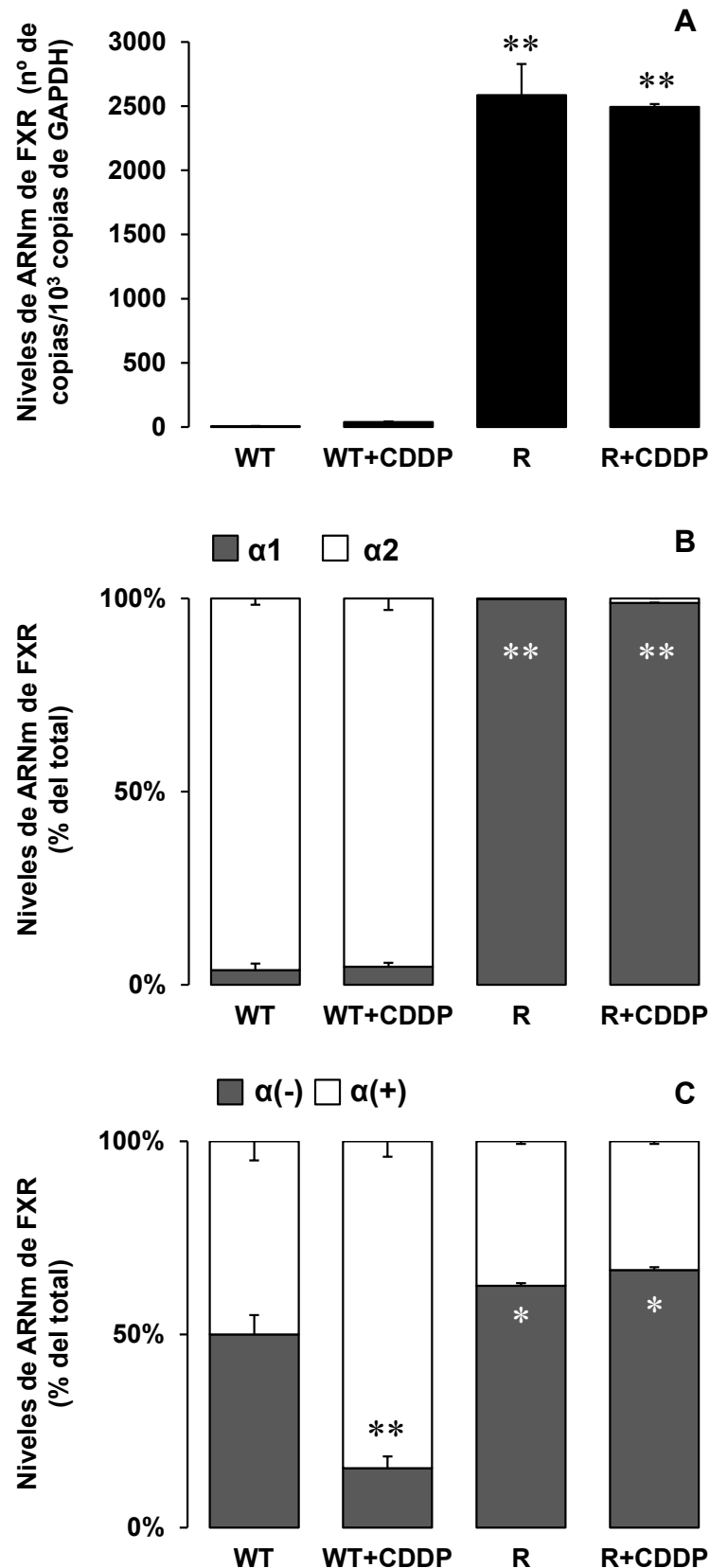


Figura RD-26. Cuantificación absoluta de los niveles totales de ARNm de FXR (A) y de las proporciones de sus isoformas (B-C) en células LS 174T silvestres (WT) y parcialmente resistentes a cisplatino (R), determinados por RT-QPCR. Las células se incubaron con una concentración de cisplatino (CDDP) próxima a la IC₅₀ o el vehículo (DMSO) durante 72 h previamente a la extracción del ARNm. Los valores se expresan como media ± EEM de, al menos, 3 cultivos. *, p < 0.05; **, p < 0.01, comparando la abundancia total y las proporciones con las de las células control (WT).

La medida de la proporción de isoformas en estas líneas celulares también aportó otro dato muy curioso y es que, mientras que tanto las células silvestres como el tejido sano y tumoral de colon presentaban una dominancia clara de las isoformas FXR α 2 (Figuras RD-24 y RD-26), las células resistentes expresaban un 100% de isoformas FXR α 1, características del tejido hepático y no del intestinal (Figura RD-2). En la Tesis Doctoral de otro miembro de nuestro grupo, la Dra. Elisa Herráez Aguilar, en la que se caracterizaron algunos aspectos de esta sublínea parcialmente resistente al cisplatino, se observó que estas células sobreexpresan el factor HNF1 α (de "Hepatocyte Nuclear Factor 1 α ") (Herraez, 2011). El aumento de este factor de transcripción podría explicar el aumento de los niveles de FXR, y en especial de las isoformas FXR α 1, en estas células, ya que se ha descrito que el HNF1 α es capaz de activar la expresión del promotor de FXR en células HepG2 (Lou et al., 2007), las cuales expresan únicamente isoformas del tipo α 1 (Figura RD-2). Por tanto, el estrés oxidativo generado por el tratamiento a largo plazo con cisplatino (Block et al., 2008) podría dar lugar a un aumento de la expresión de HNF1 α (Qadri et al., 2006) que, a su vez, induciría la expresión de FXR α 1 en estas células.

En el caso de la proporción de isoformas FXR α (+) y FXR α (-), la línea celular resistente presentaba un ligero, aunque significativo, incremento en isoformas FXR α (-), con respecto a la línea silvestre.

El tratamiento a corto plazo (72 h) con cisplatino no incrementó aún más los niveles de expresión de FXR en las células resistentes. Sin embargo, sí fue capaz de inducir un aumento de expresión de 5.6 veces de este receptor nuclear en las células silvestres, aunque los niveles de FXR seguían siendo muy bajos en comparación con las células resistentes (Figura RD-26). El tratamiento con cisplatino no modificó la proporción de isoformas FXR α 1/2 en ninguna de las líneas celulares. Sin embargo, la proporción FXR α (+/-), que era aproximadamente del 50% en las células silvestres sin tratar, se modificó hacia un claro predominio las isoformas FXR α (+) en las células silvestres tratadas (Figura RD18). Esto no ocurrió en la línea resistente LS 174T/R.

Teniendo en cuenta en su conjunto los resultados del análisis de las muestras de tumores, y de las líneas celulares, parece evidente que la sobreexpresión de FXR no es necesaria para la presencia de un fenotipo MDR en los distintos tumores hepáticos e intestinales de pacientes aún sin tratar. Sin embargo, el marcado aumento de expresión de FXR en las células LS 174T/R sugiere que sí podría jugar un papel importante en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia por parte de las células cancerígenas durante el tratamiento antitumoral.

4.3- PAPEL DE FXR EN EL DESARROLLO DE PROCESOS DE QUIMIORRESISTENCIA EN CÉLULAS HEPÁTICAS E INTESTINALES

Según los resultados descritos en el apartado 4.2 de esta Tesis Doctoral, los tumores del circuito enterohepático de pacientes que no han recibido tratamiento farmacológico desarrollan quimiorresistencia mediante la alteración de la expresión basal, con respecto al tejido sano, de determinados genes pertenecientes a MOCs, a pesar de la reducción de la expresión de FXR. Sin embargo, los resultados obtenidos en las células LS174T/R dejan en el aire un posible papel de este receptor nuclear en el desarrollo de quimiorresistencia en respuesta al estrés generado por el tratamiento farmacológico. Por ello, el objetivo que nos propusimos a continuación fue analizar el efecto de la ausencia o presencia de FXR, y su activación mediante un ligando sintético bien conocido (GW4064), en cuanto al desarrollo de resistencia a la quimioterapia por parte de líneas celulares hepáticas e intestinales.

Los experimentos recogidos en el apartado 4.1 demostraron que la potencia de la isoforma FXR α 1(-), en cuanto a la activación de los genes diana de FXR analizados, era igual o mayor que la del resto de isoformas, tanto en líneas celulares hepáticas como intestinales (Figuras RD-14/17). Además, a pesar de que las células LS 174T derivan de ACC, el cual expresa en su mayoría FXR α 2(+/-), las isoformas presentes en la sublínea LS 174T/R parcialmente resistente al cisplatino, eran FXR α 1(+/-) (Figura RD-26). Debido a esto se decidió usar el plásmido que contenía la isoforma FXR α 1(-), en los diferentes experimentos de transfección que se mostrarán a continuación y a ella nos referiremos siempre cuando se indique que se transfectó FXR.

Aunque durante el desarrollo de este apartado de resultados de la Tesis Doctoral se utilizaron más agentes quimioterapéuticos y/o compuestos tóxicos, la mayoría de los experimentos se realizaron usando como fármaco modelo el cisplatino. Este agente antitumoral se escogió, independientemente de su utilidad real en el tratamiento de pacientes con cáncer de hígado, porque es un conocido inductor de quimiorresistencia en la mayoría de tumores estudiados. Además, este compuesto y sus derivados, están entre los agentes antitumorales más eficaces utilizados para tratar varios tipos de tumores, entre ellos el cáncer de colon (Boulikas y Vougiouka, 2003). De hecho, los regímenes de quimioterapia basados en compuestos derivados de platino en combinación con otros fármacos antitumorales constituye la terapia farmacológica de elección para el tratamiento del cáncer de colon (Andre et al., 2004; de Gramont et al., 2000).

4.3.1- Efecto protector de FXR frente a la toxicidad producida por distintos tóxicos en células hepáticas

En primer lugar decidimos analizar el efecto protector de FXR frente a la toxicidad del cisplatino en una línea celular hepática, para lo cual transfectamos la línea celular Alexander, que no expresa niveles funcionales de este receptor nuclear (Figuras RD-2/14), con un vector vacío (Mock), FXR, RXR o la combinación de ambos, y tratamos las células con con-

centraciones crecientes de cisplatino, junto con 1 μM de GW4064 o el vehículo (DMSO), durante 72 h, antes de medir la viabilidad mediante el test de formazán (Figura RD-27).

Como se observa en la Figura RD-27B, la transfección con RXR no modificó la sensibilidad de las células al tratamiento con cisplatino. Del mismo modo, el GW4064 no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad en las células transfectadas con RXR o con el vector vacío. Sin embargo, la transfección con FXR o FXR/RXR era capaz de proteger a las células frente a la toxicidad de este fármaco, lo que se tradujo en un incremento significativo de la IC_{50} . Además, la activación de FXR mediante el tratamiento con GW4064 incrementó todavía más el efecto protector de este receptor nuclear. El mayor efecto protector se observó en la condición en la que se transfectó el dímero FXR/RXR y se trataron las células con GW4064, como se muestra en las curvas de viabilidad de la Figura RD-27A. La IC_{50} de estas células era casi 6 veces superior que la de las células control, pasando de 16 μM a 92 μM de cisplatino.

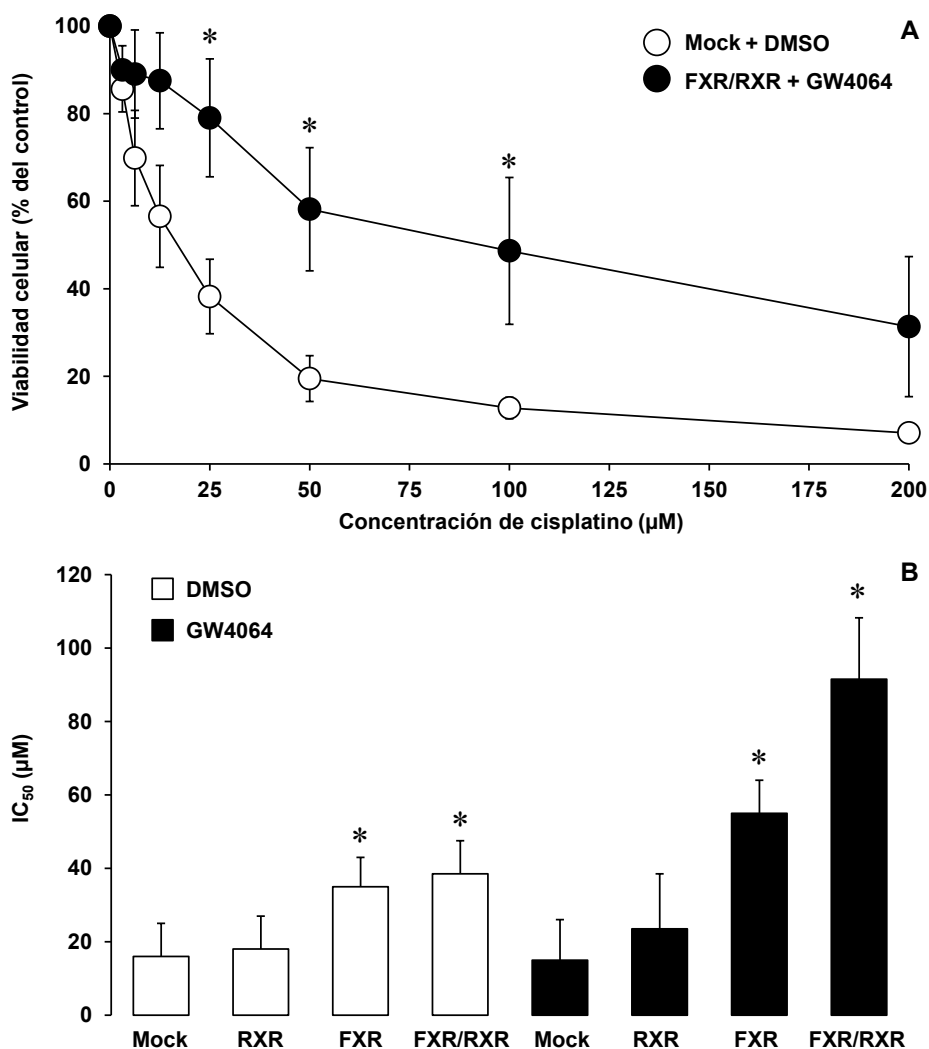


Figura RD-27. Efecto protector de FXR frente a la toxicidad del cisplatino en células Alexander transfectadas con un vector vacío (Mock), RXR α , FXR α 1(-) o ambos (FXR/RXR) y tratadas o no (DMSO) con 1 μM de GW4064. La viabilidad se determinó mediante el test de formazán tras exponer las células al fármaco durante 72 h y se expresó como porcentaje de células vivas con respecto a las células no tratadas (A) o como IC_{50} (B). La IC_{50} se definió como la concentración de fármaco requerida para reducir la viabilidad celular al 50%. Los valores representan la media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, $p < 0.05$, comparando con la viabilidad de las células control (Mock + DMSO).

La ausencia de efecto del GW4064 en las células transfectadas con el vector vacío no fue sorprendente, ya que este compuesto es un agonista muy específico de FXR y, no debe tener efecto en células Alexander no modificadas, que carecen de expresión de este receptor nuclear, como se comentó en el apartado 4.1.3.2 (Figura RD-14). Por contra, podría esperarse que un aumento de expresión de RXR protegiese a las células frente al cisplatino, ya que RXR forma pareja con varios receptores nucleares que podrían jugar un papel en quimiorresistencia, como por ejemplo PXR (Ihunnah et al., 2011) o CAR (Suino et al., 2004), dos conocidos receptores nucleares de respuesta a xenobióticos (Ihunnah et al., 2011; Suino et al., 2004). Sin embargo, según nuestros datos las células Alexander también expresan niveles muy reducidos de estos dos receptores nucleares, concretamente $0.0014\% \pm 0.0002$ y $0.1\% \pm 0.02$ con respecto a hígado para PXR y CAR, respectivamente. Por tanto, la falta de protección de las células Alexander transfectadas con RXR, indica que éste no parece inducir ningún mecanismo de respuesta a la toxicidad del cisplatino, al menos de forma individual y en este modelo experimental.

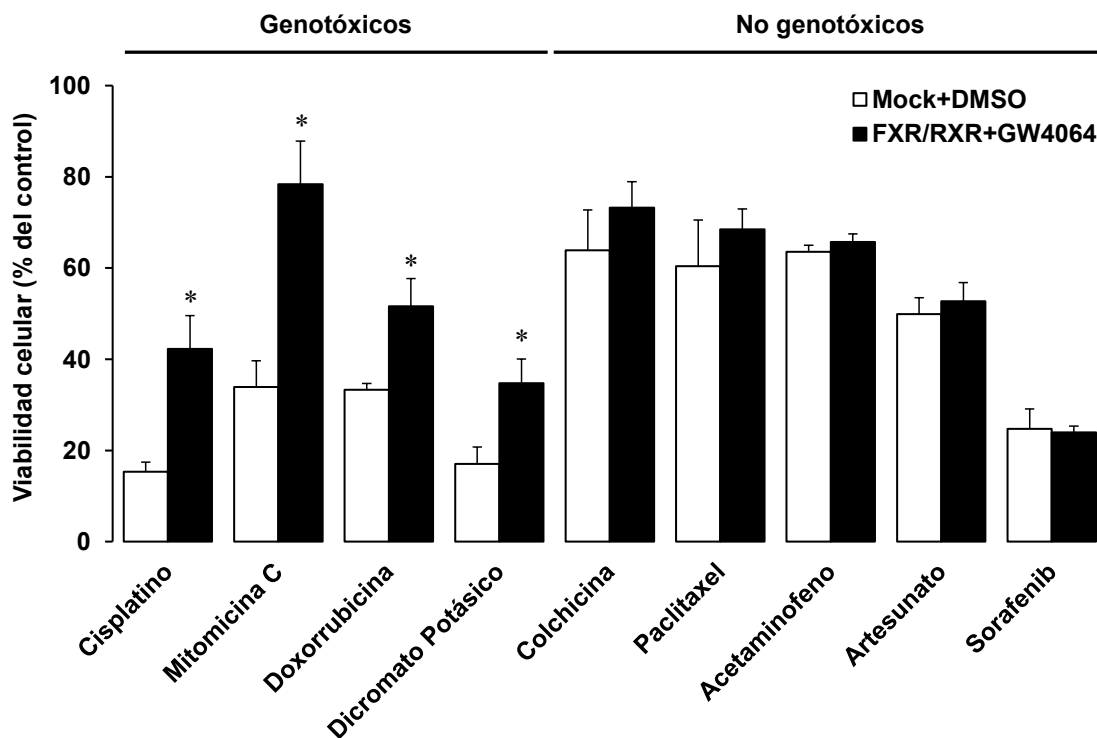


Figura RD-28. Efecto protector de FXR frente a la toxicidad de diferentes compuestos en células Alexander. Las células Alexander transfectadas con un vector vacío (Mock) o cotransfectadas con FXR α 1(-) junto con RXR α se trataron con 50 μ M de cisplatino, 2.5 μ M de mitomicina C, 250 nM de doxorubicina, 2.5 μ M de dicromato potásico, 5 μ M de colchicina, 10 nM de paclitaxel, 1.5 mM de acetaminofeno, 20 μ M de artesunato o 5 μ M de sorafenib, junto con 1 μ M de GW4064 o el vehículo (DMSO) durante 72 h. La viabilidad se determinó mediante el test de formazán y se expresó como porcentaje de células vivas con respecto a las células no tratadas. Los valores representan la media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, $p < 0.05$, comparando con la viabilidad de las células control (Mock + DMSO).

El siguiente paso fue investigar si el efecto protector de FXR era exclusivo para la toxicidad del cisplatino o si este receptor nuclear era capaz de defender a las células frente a otros compuestos tóxicos. Para ello utilizamos las condiciones de mayor protección del experimento anterior, es decir, células Alexander transfectadas con el heterodímero

FXR/RXR y tratadas con 1 μ M de GW4064, y las células transfectadas con un vector vacío (Mock) y tratadas con el vehículo (DMSO) como control. Estas células se trataron con una dosis única y tóxica de cisplatino (50 μ M), como control positivo de la protección, y con varios compuestos tóxicos y agentes antitumorales con diferentes mecanismos de acción, como son la mitomicina C, la doxorubicina, el dicromato potásico, la colchicina, el paclitaxel, el acetaminofeno, el artesunato y el sorafenib. Las dosis de cada uno de estos agentes se escogieron en base a experimentos previos de viabilidad en estas mismas células.

La transfección y posterior activación de FXR fue capaz de proteger a las células Alexander frente a la toxicidad de la mitomicina C, la doxorubicina y el dicromato potásico, pero no frente a la colchicina, el paclitaxel, el acetaminofeno, el artesunato o el sorafenib (Figura RD-28). Curiosamente, todos los compuestos frente a los que FXR era capaz de aumentar la resistencia de las células eran genotóxicos, mientras que el resto de compuestos presentaban otros mecanismos de acción diferentes, como se explicará más adelante.

4.3.2- Inducción de un elemento IR-1 de respuesta a FXR por cisplatino

En la introducción de esta Tesis Doctoral se explicó que FXR necesita estar activado por un ligando, ya sea endógeno o sintético, para desempeñar sus funciones como factor de transcripción, induciendo la transcripción o represión de sus genes diana (apartado 2.2.3). Sin embargo, acabamos de ver que la simple transfección de FXR o del heterodímero FXR/RXR era capaz de proteger a las células Alexander frente al efecto tóxico del cisplatino (Figura RD-27). Este dato nos sorprendió, puesto que estas células estaban tratadas solamente con el vehículo (DMSO) y, como se comentó anteriormente (Figura RD-8), el suero añadido al medio de cultivo no contiene niveles detectables de ABs, es decir, en estas condiciones no había ningún agonista conocido presente en el medio que explicase el efecto protector de FXR. De hecho, el único compuesto presente en estas condiciones era el propio cisplatino. Por ello, nos preguntamos si, de alguna forma, el cisplatino era capaz de activar FXR promoviendo la protección de las células contra su propia toxicidad.

Para investigar la posible activación de FXR por el cisplatino, decidimos utilizar el plásmido pGL4.28[Luc2CP]/IR-1 (Figura MM-2), en el que un elemento IR-1 de respuesta a FXR dirige la expresión de la Luc2CP. Además, utilizamos el plásmido pGL4.28[Luc2CP], que carece del elemento IR-1 (Figura MM-2), como control negativo para descartar posibles activaciones inespecíficas de la actividad luciferasa por parte del cisplatino. A continuación, transfectamos células HepG2, que expresan niveles elevados de FXR de forma endógena (Figura RD-2), y células Alexander, con el plásmido que carecía (Figura RD-29A) o contenía (Figura RD-29B) el elemento IR-1. Además, las células Alexander se transfectaron con un vector vacío (Mock), RXR, FXR o con la combinación de ambos (FXR/RXR). Por último, ambas líneas celulares se trataron con 5 μ M de cisplatino, 1 μ M de GW4064 o el vehículo (DMSO), durante solamente 4 h para evitar el efecto tóxico del cisplatino sobre las células, antes de medir la actividad luciferasa en las diferentes condiciones.

Como era de esperar, ninguno de los compuestos tuvo efecto en las células transfectadas con el vector pGL4.28[Luc2CP] (Figura RD-29A), ya que en este plásmido la expresión de la luciferasa de luciérnaga está controlada por una secuencia, denominada minPr (de “Minimal Promoter”), que contiene un elemento típico de los promotores, denominado caja TATA, que no responde a estímulos.

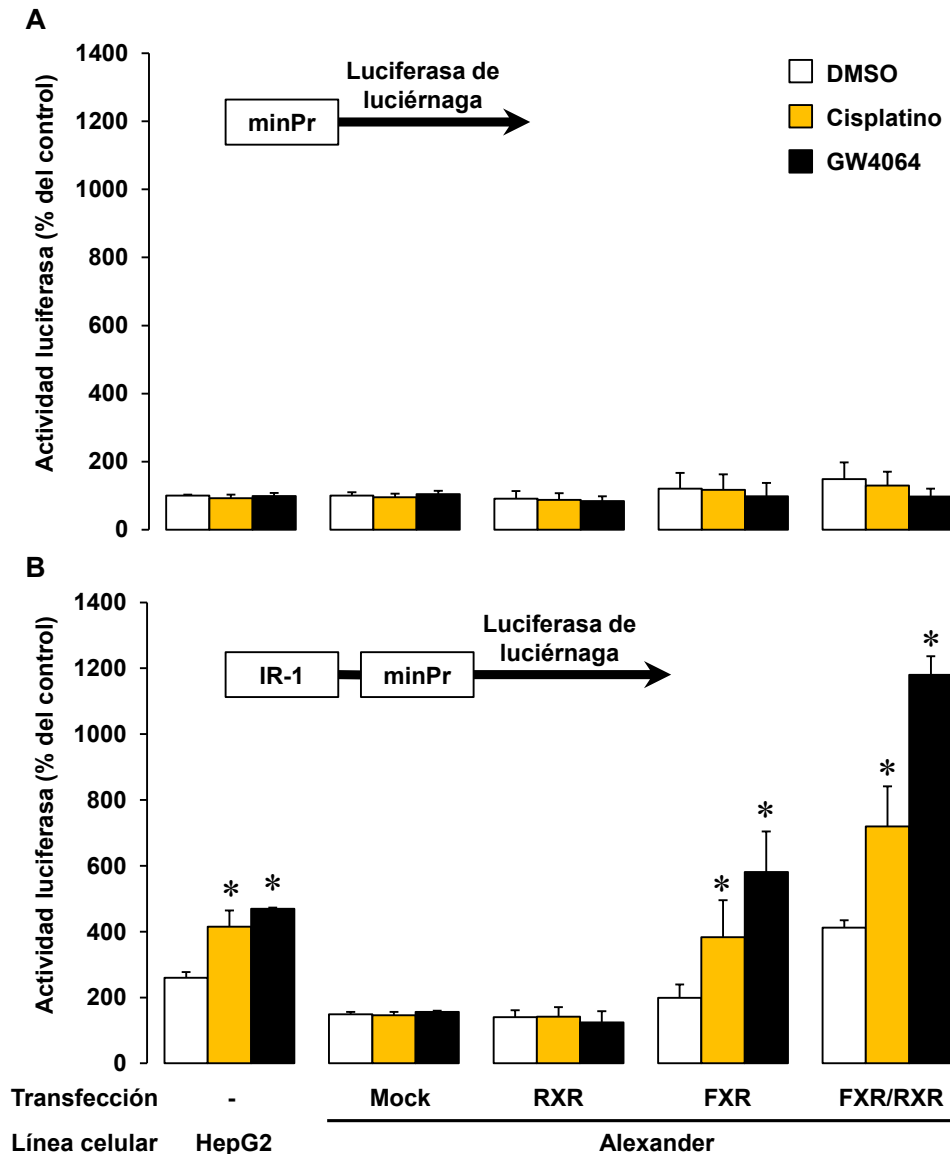


Figura RD-29. Inducción de un elemento IR-1 de respuesta a FXR en células de hepatoblastoma humano HepG2 y en células de hepatoma humano Alexander transfectadas con un vector vacío (Mock), RXR α , FXR α 1(-) o ambos (FXR/RXR), tratadas o no (DMSO) con 5 μ M cisplatino o 1 μ M de GW4064 durante 4 h. Ambas líneas celulares se transfectaron además con un plásmido que contenía la ORF de la luciferasa de luciérnaga desestabilizada (Luc2CP) precedida por un promotor mínimo (minPr) (A) y un elemento de respuesta IR-1 (B). La actividad luciferasa se expresó como porcentaje de emisión de luz con respecto a las células control (Mock + minPr-Luc2CP + DMSO) y es la media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, $p < 0.05$, comparando con las células control (DMSO).

Sin embargo, tanto el cisplatino como el GW4064 fueron capaces de activar la expresión de la luciferasa en las células HepG2 transfectadas con el vector pGL4.28[Luc2CP]/IR-1, aunque el efecto del cisplatino era menor que el del agonista sintético (Figura RD-29B).

En las células Alexander ninguno de los compuestos fue capaz de activar la expresión de la luciferasa cuando éstas se transfectaban con el vector vacío o con RXR, mientras que cuando se transfectaban con FXR o con el heterodímero FXR/RXR, ambos compuestos inducían la expresión del gen reportero y, al igual que ocurría en las HepG2, el cisplatino era menos potente que el GW4064.

Por tanto, el cisplatino es capaz de activar la expresión de la luciferasa sólo cuando las células expresan FXR, ya sea de forma endógena o exógena, lo que indica que este receptor nuclear puede activarse, de forma independiente de ABs, por la exposición a cisplatino y quizá a otros compuestos xenobióticos. Sin embargo, la estructura tridimensional del cisplatino hace difícil que este compuesto pueda unirse al LBD de FXR como un agonista típico, por lo que el mecanismo de activación debe ser diferente. Una posible ruta de activación podría implicar la inducción de rutas de fosforilación mediadas por PKC en respuesta al daño al ADN. Por una parte, se ha descrito que el daño al ADN producido por compuestos como el cisplatino induce la actividad de la isoforma PKC δ (Basu y Tu, 2005), y por otra, que determinadas isoformas de PKC, como la PKC α y la PKC ζ , son capaces de fosforilar determinados residuos de FXR (Frankenberg et al., 2008; Gineste et al., 2008), incrementando su actividad incluso en ausencia de ligandos típicos. Por lo tanto, es posible que el cisplatino sea capaz de inducir la actividad de una isoforma de PKC, capaz a su vez de fosforilar a FXR, aumentando la actividad de este último.

4.3.3- Efecto del cisplatino sobre genes diana de FXR en células hepáticas

El siguiente paso fue comprobar si el cisplatino era capaz también de inducir la cascada de señalización de FXR en las células. Aunque contábamos con dos líneas celulares en las que el cisplatino activaba FXR, dado que las células HepG2 expresan también niveles funcionales de PXR (Rigalli et al., 2011), lo que podría complicar el análisis de los resultados, decidimos utilizar las células Alexander e introducir FXR a nuestra voluntad. Por tanto, transfectamos células Alexander con un vector vacío (Mock) o con el heterodímero FXR/RXR y las tratamos durante, 24, 48 y 72 h, con 5 μ M de cisplatino, 1 μ M de GW4064 o el vehículo (DMSO).

Como ya habíamos visto en los experimentos de transfección de las isoformas de FXR descritos en el apartado 4.1.3.2, el tratamiento con GW4064 fue capaz de inducir 3 dianas típicas de FXR (BSEP, SHP y OST β) sólo cuando las células expresaban este receptor nuclear (Figura RD-30). El grado de inducción de las dianas tendía a ser menor a tiempos largos de exposición (Figura RD-30), probablemente debido a que la transfección era transitoria y no estable, por lo que la expresión de FXR en estas células va disminuyendo con el tiempo (Figura RD-6).

El tratamiento con cisplatino aportó al estudio datos muy interesantes. A diferencia del GW4064, este fármaco era capaz de activar algunas dianas de FXR tanto en las células que expresaban FXR (aunque con menor eficacia que el GW4064), como en las que carecían de este receptor nuclear (Figura RD-30). Así, el cisplatino activaba BSEP sólo en

presencia de FXR, pero sorprendentemente era capaz de inducir la expresión de SHP y OST β también en las células transfectadas con el vector vacío. Además, el efecto del cisplatino parecía aumentar con el tiempo de exposición, a diferencia de lo observado para el GW4064, lo que sugiere que este compuesto podría estar actuando a través de dos vías, una dependiente y otra independiente de FXR.

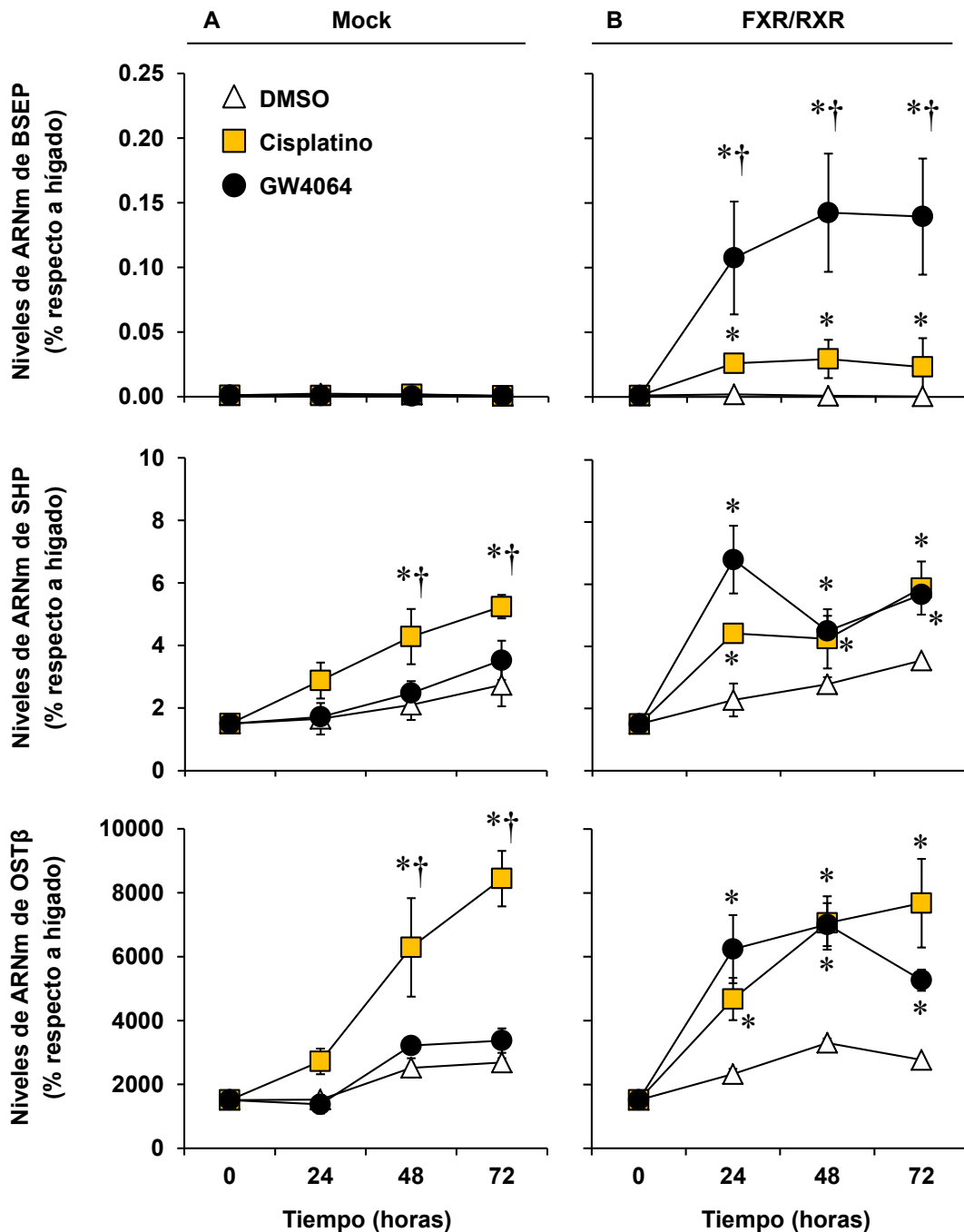


Figura RD-30. Evolución temporal de los niveles relativos de ARNm de BSEP, SHP y OST β en células Alexander transfectadas con un vector vacío (Mock, A) o cotransfectadas con FXR α 1(-) junto con RXR α (B) y tratadas o no (DMSO) con 5 μ M de cisplatino o 1 μ M de GW4064, durante 24, 48 o 72 h. Los valores, determinados por RT-QPCR, se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células control (DMSO). †, $p < 0.05$, comparando las células tratadas con cisplatino y GW4064.

Una posible explicación a la activación de estas dianas independiente de FXR puede ser una activación paralela de p53 por el cisplatino. Recientemente se ha demostrado que la expresión de SHP puede inducirse por p53 en respuesta al daño al ADN (Kim et al., 2011). Esto se debe a que FXR y p53 comparten una metil-transferasa, denominada MLL3, que forma parte de un complejo coactivador capaz de interactuar con numerosos factores de transcripción (Kim et al., 2011). Nuestros resultados sugieren que podría existir una activación cruzada de ambas rutas por el cisplatino.

4.3.4- Activación de la ruta de p53 por cisplatino en células hepáticas

La proteína p53 es un supresor de tumores codificado por el gen *TP53*, que ejerce funciones clave en el control del ciclo celular (Suzuki y Matsubara, 2011). Es un factor de transcripción que, ante situaciones oncogénicas y genotóxicas, se transloca al núcleo y lleva a cabo su función, en colaboración con otras proteínas como p21 (Dotto, 2000), produciendo la detención del ciclo celular. Cuando el daño al ADN es irreparable, p53 induce apoptosis en la célula dañada mediante la regulación de la transcripción de genes pro-apoptóticos, como BAX (Thornborrow et al., 2002) y FAS (Petak et al., 2000), y la inhibición de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 (Zhan et al., 1999).

Para comprobar si p53 pudiera ser la causante de la inducción de SHP y OST β en nuestros experimentos, decidimos investigar si la ruta de señalización de esta proteína estaba activa en las mismas condiciones.

Primero medimos la expresión de p53 en células Alexander, transfectadas con el vector vacío (Mock) y tratadas con cisplatino o el vehículo (DMSO), para comprobar si expresaban esta proteína a niveles que pudieran ser funcionales. Comprobamos que, efectivamente, estas células expresaban p53 a niveles detectables y su expresión se indujo por el tratamiento con cisplatino (Figura RD-31). Hay que señalar que la expresión de p53 aumentaba también a las 24 h en ausencia de cisplatino, quizá activada por la toxicidad inherente al proceso de transfección (Figura RD-31).

Por tanto, las células Alexander expresaban niveles de p53 que podrían ser responsables del efecto del cisplatino sobre las dianas de FXR. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el gen *TP53*, que codifica para p53, se encuentra mutado en la mayoría de los tumores, dando como resultado una forma de p53 con la función alterada en la mayoría de los casos (Forbes et al., 2011; Petitjean et al., 2007), por lo que nuestras células podrían estar expresando una forma no funcional de la proteína. Debido a esto decidimos comprobar también la funcionalidad de p53 mediante el análisis de la expresión, en las mismas condiciones experimentales, de 3 dianas bien conocidas de esta proteína, como son p21 (Meng et al., 1999), FAS (Petak et al., 2000) y GADD45 (Meng et al., 1999). En efecto, la expresión de las 3 dianas se indujo en las células Alexander transfectadas con el vector vacío y tratadas con cisplatino (Figura RD-31). Además, al igual que pasaba con las dianas de FXR, la inducción de las dianas de p53 se incrementaba con el tiempo de exposición al agente platinado.

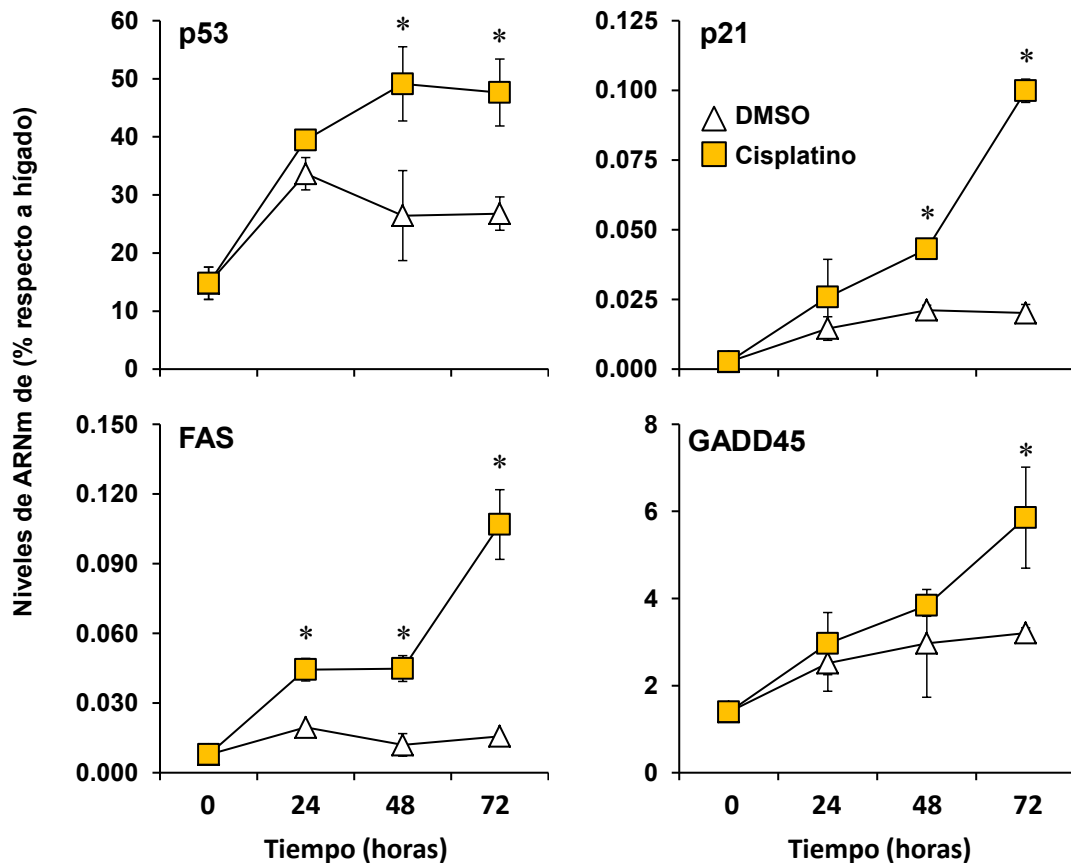


Figura RD-31. Evolución temporal de los niveles relativos de ARNm de p53, p21, FAS y GADD45 en células Alexander transfectadas con un vector vacío (Mock) y tratadas o no (DMSO) con 5 µM de cisplatino, durante 24, 48 o 72 h. Los valores, determinados por RT-QPCR, se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media ± EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células control (DMSO).

Por tanto, nuestros resultados apoyan el concepto de que p53, un sensor clave de daño al ADN, podría estar involucrado en la activación indirecta de un complejo de transcripción capaz, a su vez, de activar la expresión de algunos genes diana de FXR.

4.3.5- Efecto del cisplatino en hepatocitos humanos en cultivo primario

Para descartar la existencia de un posible artefacto dependiente del modelo experimental, decidimos investigar también el efecto del cisplatino sobre hepatocitos humanos en cultivo primario, obtenidos de los márgenes sanos de resecciones de tumores hepáticos.

En primer lugar analizamos el efecto protector de FXR frente a la toxicidad del cisplatino en los hepatocitos de la misma forma que lo habíamos hecho en células Alexander. Los hepatocitos se trataron durante 72 h con concentraciones crecientes del fármaco junto con 1 µM de GW4064 o el vehículo (DMSO) y se midió su viabilidad mediante el test de formazán. Como se observa en la Figura RD-32, la activación de FXR con GW4064 protegió a los hepatocitos frente a la toxicidad del cisplatino, aumentando la IC_{50} en estas células aproximadamente 4 veces.

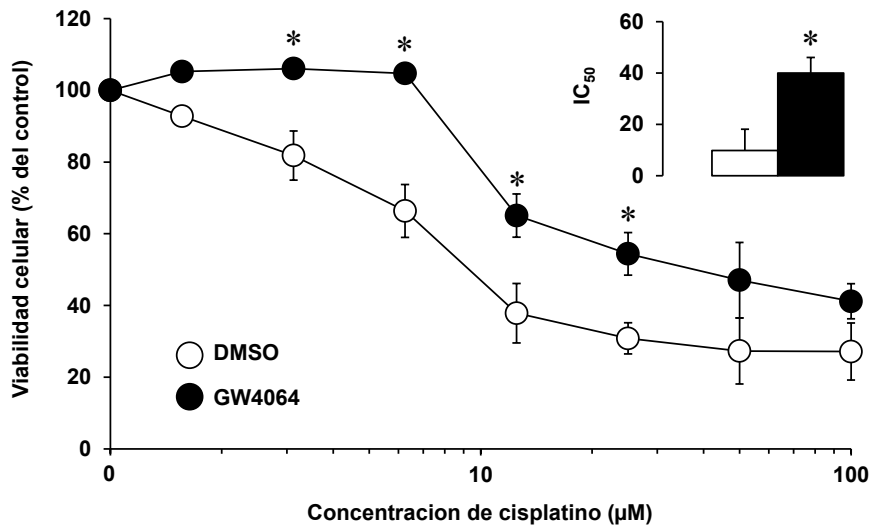


Figura RD-32. Efecto protector de FXR frente a la toxicidad del cisplatino en hepatocitos humanos en cultivo primario tratados o no (DMSO) con 1 µM de GW4064. La viabilidad se determinó mediante el test de formazán tras exponer las células al fármaco durante 72 h y se expresó como porcentaje de células vivas con respecto a las células no tratadas o como IC₅₀ (Inserto). La IC₅₀ se definió como la concentración de fármaco requerida para reducir la viabilidad celular al 50%. Los valores representan la media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, p<0.05, comparando con la viabilidad de las células control (DMSO).

Tras confirmar el efecto protector de FXR frente al cisplatino en células hepáticas sanas, decidimos comprobar si este fármaco también era capaz de inducir la expresión endógena de genes diana de FXR en estas células. Para ello tratamos los hepatocitos humanos con 5 µM de cisplatino, 1 µM de GW4064 o el vehículo (DMSO), durante 24 h, y determinamos la expresión de dianas bien conocidas de FXR. El tratamiento con ambos compuestos fue capaz de inducir la expresión de BSEP, SHP y OSTα en estas células, aunque el cisplatino fue menos potente que el GW4064 (Figura RD-33), al igual que ocurría en las células Alexander. La expresión de FXR no se vio modificada significativamente por ninguno de los tratamientos (Figura RD-33).

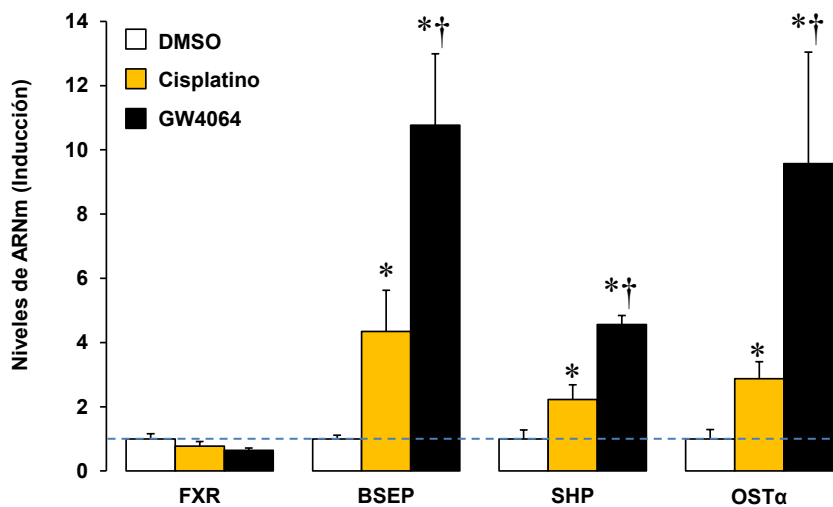


Figura RD-33. Niveles relativos de ARNm de FXR, BSEP, SHP y OSTα en hepatocitos humanos en cultivo primario tratados o no (DMSO) con 5 µM de cisplatino o 1 µM de GW4064 durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y son media ± EEM de, al menos, 3 cultivos. *, p<0.05, comparando con las células control (DMSO). †, p < 0.05, comparando las células tratadas con cisplatino y GW4064.

En base a estos resultados, tanto la protección frente a la toxicidad del cisplatino, como la inducción de la expresión génica de la ruta de FXR por este fármaco, tienen lugar en los hepatocitos humanos en cultivo primario. Por lo tanto, parece que FXR no sólo está involucrado en la generación de quimiorresistencia en las células tumorales, sino también en la quimioprotección de células hepáticas sanas frente al estrés producido por compuestos xenobióticos.

4.3.6- Activación de la ruta de señalización de FXR en células LS 174T/R

Una vez investigado el papel de FXR en cuanto a la generación de quimiorresistencia en células hepáticas, decidimos comprobar si el mismo efecto se daba también en otros territorios del circuito enterohepático en los que este receptor nuclear se expresa, como por ejemplo el tejido intestinal. En este caso, la elección del modelo experimental fue fácil, puesto que contábamos con la sublínea celular parcialmente resistente al cisplatino LS 174T/R, que sobreexpresaba FXR, y su línea celular parental silvestre LS 174T, con niveles de expresión prácticamente despreciables de este receptor nuclear (Figura RD-26).

En primer lugar quisimos comprobar si el aumento de expresión de FXR observado en las células LS 174T/R daba lugar también a un aumento de su función. Para ello tratamos las células LS 174T y LS 174T/R con 50 μ M de AQDC, 1 μ M de GW4064 o el vehículo (DMSO), para ver si el tratamiento con estos agonistas era capaz de inducir la expresión de las dianas de FXR.

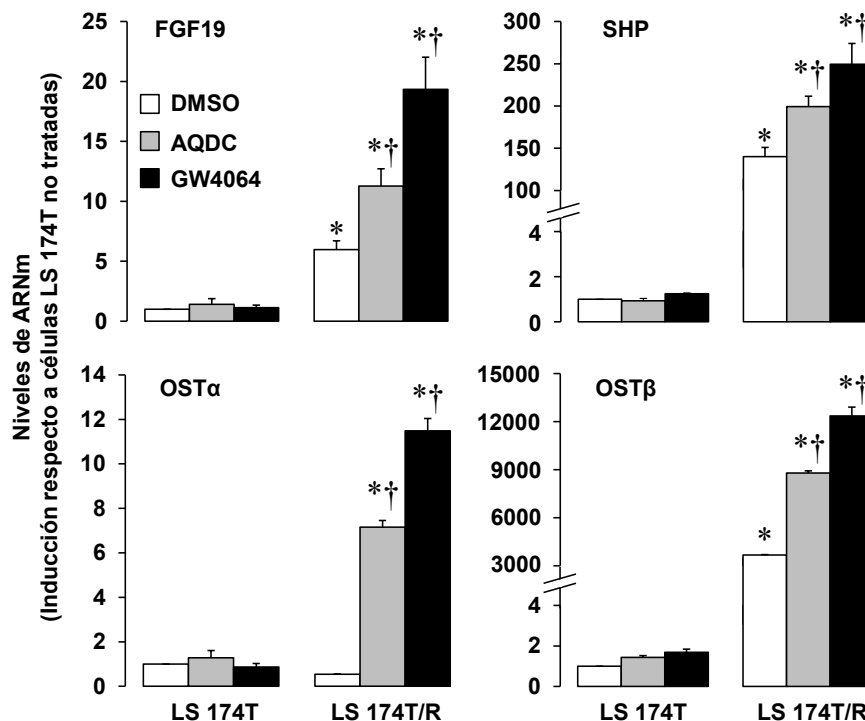


Figura RD-34. Niveles relativos de ARNm de FGF19, SHP, OST α y OST β en células LS 174T y LS 174T/R tratadas o no (DMSO) con 50 μ M de AQDC o 1 μ M de GW4064 durante 24 h, determinados por RT-QPCR. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (LS 174T + DMSO) y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células LS 174T+DMSO. †, $p < 0.05$, comparando con las células tratadas con el vehículo (DMSO).

Como ya vimos en el apartado 4.1.4.1 de esta Tesis Doctoral, el tratamiento con ambos agonistas no tuvo ningún efecto sobre las dianas de FXR en la línea celular silvestre (Figura RD-34), debido sin duda a la baja expresión del receptor nuclear en estas células. Curiosamente, la mayoría de ellas (FGF19, SHP y OST β), se encontraban ya sobreexpresadas de forma basal en la sublínea resistente con respecto a la línea celular silvestre, mientras que en el caso de OST α se observó una tendencia a la represión basal en la línea resistente, aunque ésta no llegó a ser significativa (Figura RD-34). Además, el tratamiento con los dos agonistas indujo la expresión de las 4 dianas de forma marcada, siendo más potente el efecto del GW4064 sobre todas ellas (Figura RD-34).

Un dato curioso de estos experimentos fue la tendencia a la represión de OST α en la sublínea resistente, a pesar de la sobreexpresión de FXR. Cuando la Dra. Elisa Herráez caracterizó estas células encontró que algunos factores de transcripción se encontraban sobreexpresados en ellas, como C/EBP β , HNF3 β , HNF4 α y el ya mencionado HNF1 α (Herraez, 2011), por lo que cabe la posibilidad de que estas células sobreexpresen algún factor de transcripción que actúe como represor de OST α , y que aún desconocemos.

En cualquier caso, la sobreexpresión del resto de dianas estudiadas y la inducción de todas ellas provocada por los dos agonistas, indican que la sobreexpresión, a nivel de ARNm, de FXR en la línea celular resistente da lugar a una proteína funcional capaz de activar su ruta de señalización.

4.3.7- Efecto protector de FXR frente a la toxicidad del cisplatino en células intestinales

Puesto que las células resistentes presentaban niveles elevados de FXR y éste era funcional, decidimos comprobar si la activación de este receptor nuclear con un agonista incrementaría aún más su resistencia al cisplatino.

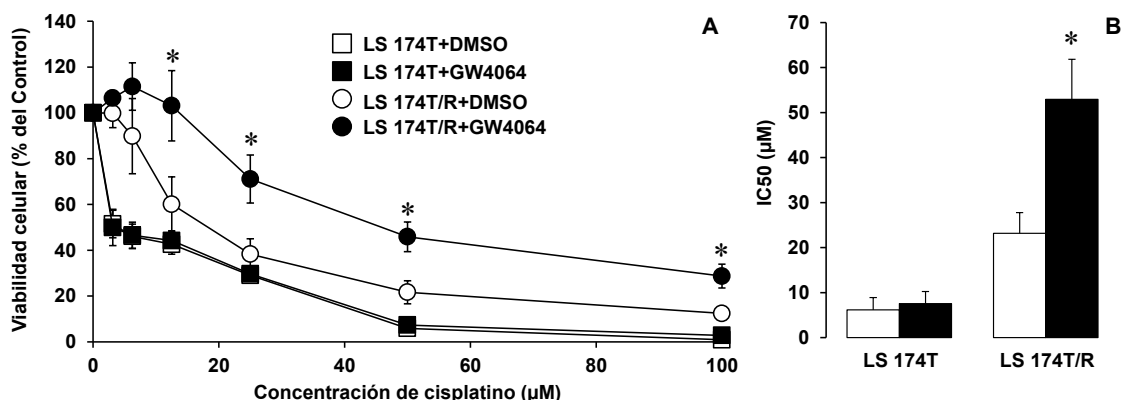


Figura RD-35. Efecto protector de FXR frente a la toxicidad del cisplatino en células LS 174T y LS 174T/R tratadas o no (DMSO) con 1 µM de GW4064. La viabilidad se determinó mediante el test de formazán tras exponer las células al fármaco durante 72 h y se expresó como porcentaje de células vivas con respecto a las células no tratadas (A) o como IC₅₀ (B). La IC₅₀ se definió como la concentración de fármaco requerida para reducir la viabilidad celular al 50%. Los valores representan la media ± EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, p<0.05, comparando con la viabilidad o la IC50 de las células control (DMSO).

Para ello, primero realizamos experimentos similares a los llevados a cabo en hepatocitos humanos, tratando las células LS 174T y LS 174T/R con concentraciones crecientes de cisplatino junto con 1 μM de GW4064 o el vehículo (DMSO).

En la Figura RD-35 se observa como el tratamiento con GW4064 no modificó la sensibilidad de las células silvestres al cisplatino. Sin embargo, el mismo tratamiento indujo un incremento en la viabilidad de las células resistentes con respecto a las células tratadas con el vehículo, duplicando la IC_{50} en estas células, que ya era de por sí casi 3 veces más alta que en las células silvestres (Figura RD-35B).

A continuación, intentamos reproducir el efecto protector observado en las células resistentes, pero en células silvestres, que expresaban bajos niveles de FXR. Para ello, transfectamos las células LS 174T con FXR y RXR, y, al igual que en el experimento anterior, las tratamos con concentraciones crecientes de cisplatino junto con 1 μM de GW4064 o el vehículo (DMSO).

La transfección de ambos receptores nucleares indujo un leve incremento de la viabilidad de las células expuestas al cisplatino, aunque éste no llegó a ser estadísticamente significativo (Figura RD-36). Sin embargo, cuando las células se trataron además con GW4064, se observó un claro incremento en la viabilidad y la IC_{50} de las células, que sí fue estadísticamente significativo (Figura RD-36).

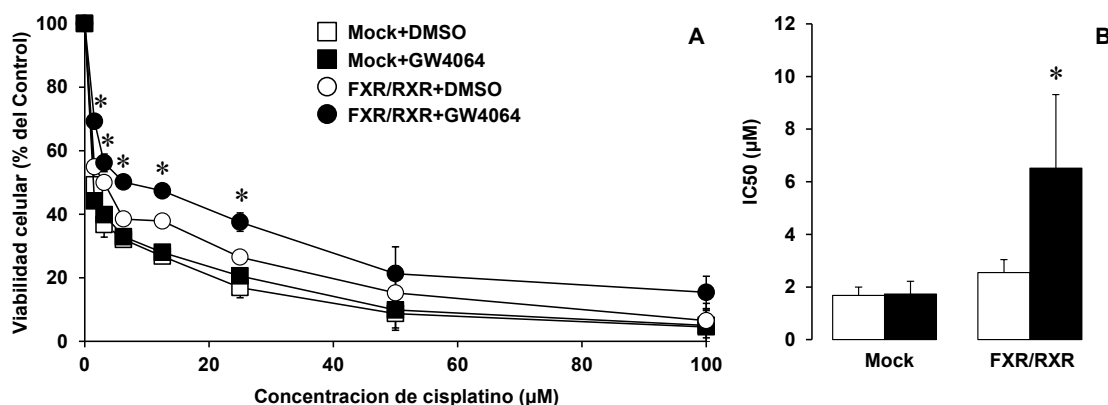


Figura RD-36. Efecto protector de FXR frente a la toxicidad del cisplatino en células LS 174T transfectadas con un vector vacío (Mock), o cotransfectadas con FXR α 1(-) junto con RXR α y tratadas o no (DMSO) con 1 μM de GW4064. La viabilidad se determinó mediante el test de formazán tras exponer las células al fármaco durante 72 h y se expresó como porcentaje de células vivas con respecto a las células no tratadas (A) o como IC_{50} (B). La IC_{50} se definió como la concentración de fármaco requerida para reducir la viabilidad celular al 50%. Los valores representan la media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, $p < 0.05$, comparando con la viabilidad o la IC_{50} de las células control (Mock+DMSO).

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en células Alexander (Figura RD-27), se observa que la introducción del heterodímero FXR/RXR en las células LS 174T tiene el mismo efecto en cuanto a la resistencia al cisplatino, pero la protección generada por estos receptores nucleares es menor. Esto probablemente se deba a que la eficacia de transfección de esta línea celular intestinal, en nuestras condiciones experimentales, resultó ser mucho menor que la de las células Alexander.

4.3.8- Análisis de la expresión de genes implicados en mecanismos de quimiorresistencia

Teniendo en cuenta todos los resultados presentados hasta el momento en este apartado, podemos afirmar que la presencia de FXR, ya sea de forma endógena (hepatocitos humanos y LS 174T/R) o exógena (Alexander y LS 174T), y su activación por agonistas, es capaz de proteger a las células, ya sean hepáticas o intestinales, de la toxicidad producida por la exposición al cisplatino y a otros compuestos de carácter genotóxico. Sin embargo, aún desconocíamos la forma en que FXR puede mediar esta quimiorresistencia.

Para investigar el mecanismo implicado en la generación de quimiorresistencia por FXR, decidimos analizar la expresión de una amplia batería de 109 genes (Tabla RD-1) involucrados en los diferentes MOCs descritos en el apartado 2.5 de esta Tesis Doctoral.

Tabla RD-1. Se muestran los genes incluidos en el análisis, clasificados en base a su papel en los mecanismos de quimiorresistencia (MOCs).

MOC-1a	MOC-1b	MOC-2	MOC-3	MOC-4	MOC-5a	MOC-5b
<i>SLC10A1</i>	<i>ABCA2</i>	<i>CES1</i>	<i>DHFR</i>	<i>DUT</i>	<i>AEG1</i>	<i>AKT1</i>
<i>SLC10A2</i>	<i>ABCA3</i>	<i>CES2</i>	<i>ESR2</i>	<i>ERCC1</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL2</i>
<i>SLCO1B1</i>	<i>ABCA6</i>	<i>CEBPB</i>	<i>FRAP1</i>	<i>GADD45A</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>BIRC1</i>
<i>SLCO1B3</i>	<i>ABCA8</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>KDR</i>	<i>MLH1</i>	<i>BIRC2</i>	<i>BIRC4</i>
<i>SLCO2B1</i>	<i>ABCB1</i>	<i>CYP1A2</i>	<i>KIT</i>	<i>MLH3</i>	<i>BIRC3</i>	<i>BIRC5</i>
<i>SLCO4A1</i>	<i>ABCB4</i>	<i>CYP3A4</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>MSH2</i>	<i>CASP8</i>	<i>BIRC7</i>
<i>SLC22A1</i>	<i>ABCB11</i>	<i>DPYD</i>	<i>TOP1</i>	<i>MSH6</i>	<i>CDKN1</i>	<i>BTG1</i>
<i>SLC22A2</i>	<i>ABCC1</i>	<i>GSTA1</i>	<i>TOP2A</i>	<i>PMS1</i>	<i>DIABLO</i>	<i>CCL14</i>
<i>SLC22A4</i>	<i>ABCC2</i>	<i>GSTP1</i>	<i>mTOR</i>	<i>PMS2</i>	<i>FAS</i>	<i>CCL15</i>
<i>SLC22A5</i>	<i>ABCC3</i>	<i>TYMP</i>	<i>TYMS</i>	<i>PRKDC</i>	<i>PSMD9</i>	<i>CFLAR</i>
<i>SLC28A1</i>	<i>ABCC4</i>	<i>UGT1A</i>		<i>RAD51</i>	<i>TP53</i>	<i>EGFR</i>
<i>SLC28A2</i>	<i>ABCC5</i>	<i>UMPS</i>		<i>RAD51AP1</i>		<i>JUN</i>
<i>SLC28A3</i>	<i>ABCC6</i>	<i>UGT1A</i>		<i>TCEA1</i>		<i>KRT13</i>
<i>SLC29A1</i>	<i>ABCC10</i>	<i>UPP1</i>		<i>TCEA2</i>		<i>MAPK1</i>
<i>SLC29A2</i>	<i>ABCC11</i>	<i>UPP2</i>		<i>TCEA3</i>		<i>MYC</i>
<i>SLC31A1</i>	<i>ABCG2</i>			<i>UDG</i>		<i>NFKB1</i>
	<i>ATP7A</i>			<i>XPA</i>		<i>PIK3CG</i>
	<i>ATP7B</i>			<i>XPC</i>		<i>RPL6</i>
	<i>LRP</i>			<i>XRCC5</i>		<i>SQSTM1</i>
				<i>XRCC6</i>		

En negrita se indican genes previamente descritos como dianas de FXR en humanos, rata o ratón.

Entre los genes analizados se encontraban los 90 genes incluidos en las TLDAs utilizadas en los estudios previos de nuestro grupo, comentados en el apartado 4.2, y además otros 19 genes cuya expresión se determinó mediante RT-QPCR tradicional. Estos 19 genes se seleccionaron en base a su descripción previa como dianas de FXR implicadas en quimiorresistencia, como por ejemplo *CEBPB* y *KRT13*, o porque pudieran explicar la protección observada frente a alguno de los compuestos estudiados. En este sentido, y

puesto que la protección se observó frente a compuestos genotóxicos, se incluyeron en el estudio varios genes pertenecientes al MOC-4, que agrupa los implicados en mecanismos de reparación del ADN.

Se determinaron los cambios de expresión de los genes mostrados en la Tabla RD-1 en células Alexander y LS 174T transfectadas con el heterodímero FXR/RXR, y los cambios observados fueron confirmados en hepatocitos humanos y células LS 174T/R. Los resultados más notables se muestran en la Figura RD-37.

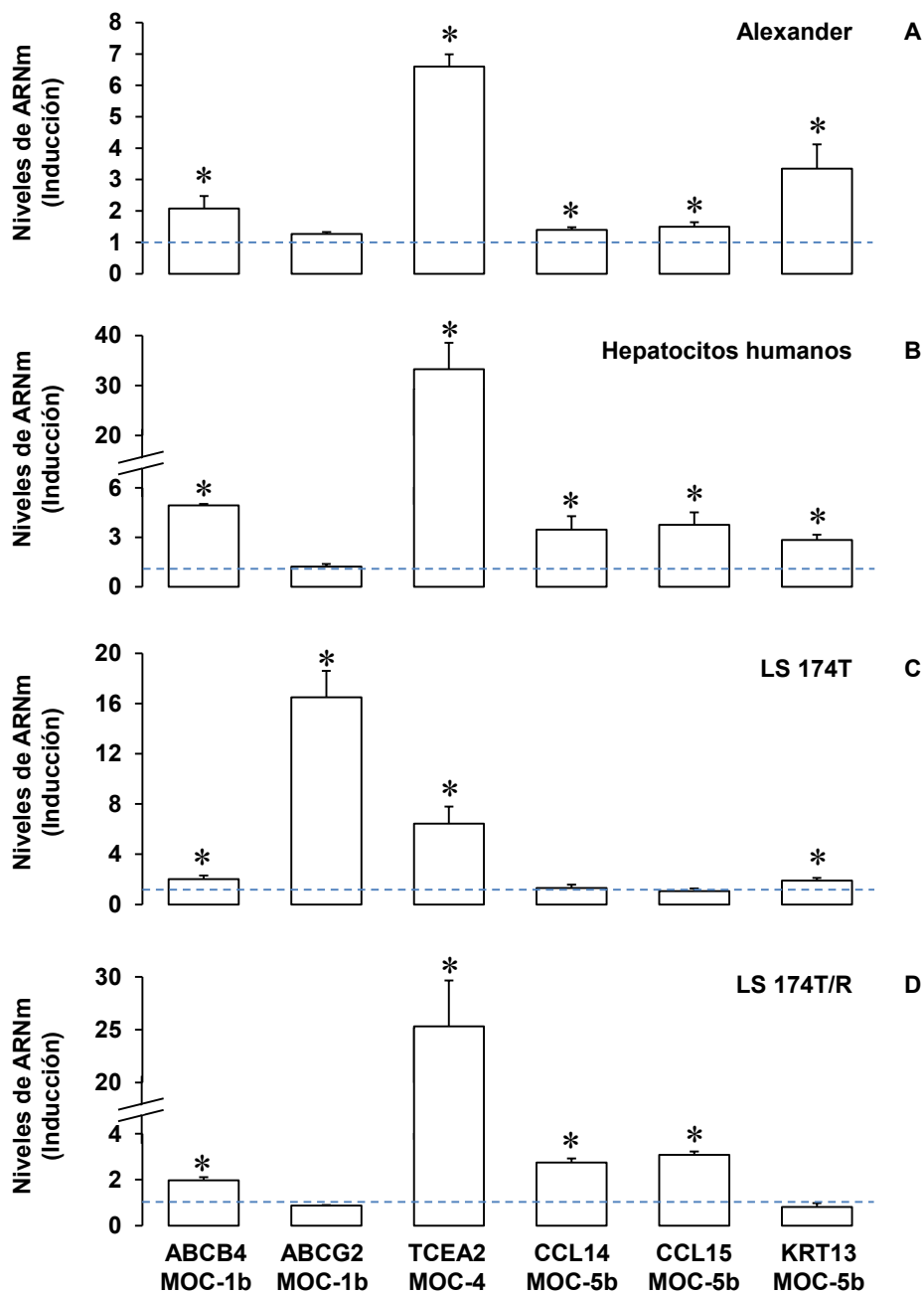


Figura RD-37. Respuesta de genes involucrados en mecanismos de quimiorresistencia a la exposición a GW4064 en células Alexander transfectadas con FXR α 1(-) junto con RXR α (A), hepatocitos humanos en cultivo primario (B), células LS 174T transfectadas con FXR α 1(-) junto con RXR α (C) y células LS 174T/R (D). Los niveles relativos de ARNm se determinaron por RT-QPCR tras la exposición de los 4 tipos de células a 1 μ M de GW4064 o el vehículo (DMSO) durante 24 h. Los valores se expresan como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de las células control. *, $p < 0.05$, comparando con las células control (DMSO).

Entre los cambios provocados por la incubación con 1 μ M de GW4064 durante 24 h en las células Alexander transfectadas, sólo 5 de ellos podían explicar la protección observada en estas células. El tratamiento con el agonista de FXR indujo un aumento estadísticamente significativo de la expresión de 5 genes (Figura RD-37A) involucrados en los MOC-1b (*ABCB4*), MOC-4 (*TCEA2*) y MOC-5b (*CCL14*, *CCL15* y *KRT13*). Ninguno de estos cambios se observó en células Alexander transfectadas con el vector vacío (Mock) y tratadas con el inductor durante el mismo tiempo. Sin embargo, todos los cambios de expresión se confirmaron en los hepatocitos humanos tratados con GW4064. Además, todos los cambios, excepto la inducción de *KRT13*, fueron de mayor magnitud en estas células (Figura RD-37B).

En las células LS 174T silvestres, transfectadas con el heterodímero FXR/RXR, el tratamiento con GW4064 activó la expresión de algunos, pero no de todos los genes inducidos en células Alexander. Se observó un incremento de la expresión de *ABCB4*, *TCEA2* y *KRT13*, pero no de *CCL14* o *CCL15* (Figura RD-37C). Además, en estas células encontramos una potente inducción de la expresión del gen *ABCG2* (Figura RD-37C), también perteneciente al MOC-1b, que no se observó en las células Alexander (Figura RD-37A). En este caso, tampoco se encontraron cambios en las células transfectadas con el vector vacío. Curiosamente, en células LS 174T/R se observó un patrón de cambios diferente. En las células resistentes, el GW4064 indujo la expresión de *ABCB4*, *TCEA2*, *CCL14* y *CCL15*, pero no de *ABCG2* ni *KRT13* (Figura RD-37D).

Para intentar comprender como los cambios mostrados en la Figura RD-37 podían explicar el efecto protector generado por FXR en las distintas líneas celulares, decidimos recopilar información sobre los mecanismos de acción de los agentes antitumorales y compuestos tóxicos utilizados en esta Tesis Doctoral.

Como se ha comentado con anterioridad, el cisplatino, el fármaco modelo en nuestro estudio, es un potente agente antitumoral utilizado en el tratamiento de un gran número de tumores. Los datos acumulados durante las últimas décadas indican que la principal diana del cisplatino es el ADN (Jamieson y Lippard, 1999), aunque también puede unirse covalentemente a otros componentes celulares, principalmente proteínas (Akaboshi et al., 1992; Akaboshi et al., 1994) y glutatión (Fuertes et al., 2003). El mecanismo de acción del cisplatino se basa fundamentalmente en su capacidad para unirse a los residuos de guanina y adenina situados en el surco mayor del ADN. La unión del cisplatino al ADN puede producir varios aductos estructuralmente diferentes, como aductos monofuncionales, en los que el cisplatino se une a un solo residuo de guanina o adenina, o aductos bifuncionales, en los que el cisplatino se une a dos residuos de guanina o adenina, que pueden estar localizados en la misma hebra (puentes intra-hebra) o en hebras distintas de la molécula de ADN (puentes inter-hebra). Independientemente del tipo de aducto formado, el daño generado por el cisplatino, puede inhibir los procesos de replicación y/o transcripción del ADN, desencadenando la activación de diferentes rutas de señalización (c-ABL, p53, p38 MAPK, etc) que conducen a la muerte celular (Mansouri et al., 2003; Shaul, 2000; Weller, 1998). El daño generado por este agente antitumoral puede corregirse por varios mecanismos de

reparación del ADN, entre los que se encuentran NER (de “Nucleotide Excision Repair”) (Bruhn et al., 1992), que parece ser un mecanismo importante en la aparición de resistencia al cisplatino, MMR (de “Mismatch Repair”) y la DNA-PK (Turchi y Henkels, 1996), una proteína encargada de reparar roturas en la doble hebra del ADN.

Los otros compuestos contra los que se ha observado protección mediada por FXR en las células Alexander son la doxorubicina, la mitomicina C y el dicromato potásico (Figura RD-28), al igual que el cisplatino, todos ellos con actividad genotóxica.

La doxorubicina es un antibiótico perteneciente al grupo de las antraciclinas que se ha utilizado en el tratamiento de distintos tumores sólidos y hematológicos. Su actividad antineoplásica se basa fundamentalmente en su capacidad para intercalarse en la molécula de ADN, interfiriendo con su replicación y con el proceso de síntesis proteica, y en su actividad como agente inhibidor de la actividad de la topoisomerasa II (Fortune y Osherooff, 2000; Gewirtz, 1999). También se ha descrito que la doxorubicina puede actuar en cierto grado mediante la formación de aductos con el ADN (Zeman et al., 1998). Entre los mecanismos implicados en la reparación del daño generado por la doxorubicina también se encuentra NER (Moraes et al., 2012) y HR (de “Homologous Recombination”) (Spencer et al., 2008).

La mitomicina C es un antibiótico antitumoral aislado a partir del hongo *Streptomyces caespitosus*, que se ha utilizado en quimioterapia desde los años 70 (Paz et al., 2012). El mecanismo de acción de este fármaco se basa principalmente en su unión covalente al ADN (Tomasz, 1995). En sí misma, la mitomicina C es inerte, pero tras ser activada mediante una cascada de reacciones de reducción (Hoey et al., 1988), se genera un intermediario que contiene dos grupos electrofílicos capaces de reaccionar con diferentes componentes celulares, principalmente el ADN, formando aductos monofuncionales y bifuncionales (Tomasz y Palom, 1997), que conducen a la generación de puentes inter-hebra, considerados la causa principal de su actividad citotóxica (Palom et al., 2002). En este caso, tanto NER (Ahn et al., 2004) como MMR (Pors y Patterson, 2005) están implicados en la reparación del daño inducido al ADN por este fármaco. Además de su acción genotóxica, se ha descrito que la mitomicina C puede activar la apoptosis a través de la inducción de la expresión de la caspasa 8 (Liedtke et al., 2007).

El dicromato potásico es uno de los principales compuestos de Cr(VI). El Cr(VI) es un conocido contaminante ambiental con propiedades carcinogénicas, que se produce en diversos procesos industriales (Wise et al., 2008). Durante años se ha demostrado que el efecto carcinogénico de este compuesto se debe a su potente actividad genotóxica. Los efectos biológicos del Cr están influenciados en gran medida por su estado redox (Katz y Salem, 1993; Witmer et al., 1994), de forma que el Cr(VI) debe ser reducido a Cr(III) en la célula, para que éste pueda ejercer su acción sobre el ADN. Durante este proceso de reducción se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden producir daño oxidativo sobre macromoléculas celulares, incluyendo el ADN y las proteínas. Una vez reducido, el Cr(III) se une covalentemente al ADN, produciendo diferentes alteraciones, entre las que se incluyen los puentes inter-hebra y las uniones ADN-proteína (Cohen et al., 1993).

En cualquier caso, estas modificaciones en la estructura del ADN impiden el progreso normal de la replicación y la transcripción del mismo (Bridgewater et al., 1994). En el caso del Cr, también hay varios mecanismos de reparación del ADN implicados en la defensa contra su toxicidad. Se ha demostrado que la helicasa WRN desempeña un papel importante en la reparación de roturas de la doble hélice generadas por una función anormal del sistema de reparación MMR en la reparación de aductos de Cr (Zecevic et al., 2009). También se ha visto que el mecanismo NER de reparación del ADN no es el responsable de la eliminación de puentes ADN-proteína, pero actúa como mecanismo de defensa para prevenir su formación (Zecevic et al., 2010).

El resto de compuestos ensayados, cuya toxicidad no fue contrarrestada por FXR, presentan mecanismos de acción más diversos e independientes del daño directo al ADN.

El paclitaxel es un agente antitumoral que promueve la polimerización de dímeros de tubulina para formar microtúbulos e inhibe el proceso de despolimerización (Amos y Lowe, 1999). De esta forma, los microtúbulos, que en condiciones normales son estructuras dinámicas, se tornan en estructuras estables por inhibición de la despolimerización, lo que conduce a la parada del ciclo celular en la fase G1/G2 de la mitosis. Estos efectos citotóxicos producidos por el paclitaxel resultan en la inducción de la apoptosis mediante la regulación de los genes TP53 y BCL-2. La alteración de los microtúbulos conduce a la inducción de p21 y a la alteración del balance BAX/BCL-2 (Wang et al., 1999b), lo que termina por inducir la apoptosis.

El paracetamol es un analgésico y antipirético comúnmente utilizado. A dosis terapéuticas es eliminado mediante glucuronidación o sulfatación y sólo una pequeña proporción es metabolizada por el citocromo P450 formándose un metabolito reactivo, *N*-acetil-*p*-benzoquinoneimina (NAPQI), que se elimina eficazmente mediante conjugación con glutatión (GSH). Sin embargo, tras una dosis tóxica, la producción de NAPQI se incrementa superando la capacidad de detoxificación del GSH y se une covalentemente a distintas proteínas (Nelson, 1990), generando estrés oxidativo y causando un deterioro de la función hepática.

El sorafenib es una bi-arilurea que puede inhibir distintas proteínas quinasas, fundamentalmente Raf serina/treonina quinasas y distintos receptores de tipo tirosina quinasa, como EGFR (de "Epidermal Growth Factor Receptor"), VEGFR (de "Vascular Endothelial Growth Factor Receptor") y PDGFR (de "Platelet Derived Growth Factor Receptor") (Wilhelm et al., 2006).

La colchicina es un fármaco utilizado en el tratamiento de enfermedades autoinflammatorias y gota (Wallace, 1974), que posee propiedades anti-inflamatorias, anti-mitóticas y anti-fibróticas (Brossi et al., 1988). Su mecanismo de acción se basa, al igual que el del paclitaxel, en la alteración de los microtúbulos. La colchicina se une a los residuos de tubulina y los complejos colchicina-tubulina se unen al extremo final de los microtúbulos (Hastie, 1991), bloqueando la polimerización de los mismos y deteniendo el ciclo celular

en diferentes fases de la mitosis, desencadenando finalmente el proceso de apoptosis. Uno de los mecanismos descritos para la inducción de la apoptosis por la colchicina es la desregulación del balance BAX/BCL-2 (Chen et al., 2012).

El artesunato es un derivado semisintético de la artemisinina, que se utiliza fundamentalmente para el tratamiento de la malaria (Castelli et al., 2012). Sin embargo, se ha descrito que este fármaco puede tener propiedades anticancerígenas (Liu et al., 2011). Entre los mecanismos descritos hasta el momento para explicar el efecto antiproliferativo de este compuesto se encuentra la activación de la apoptosis a través de la generación de ROS por la vía mitocondrial (Efferth et al., 2007) y mediante la inducción de un incremento en la proporción BAX/BCL-2 (Wang et al., 2002).

A continuación expondremos cómo la relación entre los mecanismos de acción de estos compuestos y los cambios de expresión de los genes pertenecientes a los diferentes MOCs podría explicar la mayor parte de los efectos observados en los experimentos en los que FXR exhibió protección frente a los compuestos genotóxicos, pero no frente al resto.

La reducción en la captación de fármacos por parte de las células tumorales conlleva la disminución de su concentración intracelular y, en consecuencia, una disminución de su eficacia por descenso de la concentración intracelular activa. Los mecanismos celulares que determinan esta reducción son los englobados en el MOC-1a. Algunos de los fármacos utilizados en nuestro estudio son transportados por proteínas pertenecientes a este MOC, como por ejemplo el paclitaxel, que es transportado por los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos, OATP1B1 y OATP1B3 (Svoboda et al., 2011), que además son dianas descritas de FXR (Jung et al., 2002; Meyer Zu Schwabedissen et al., 2010). Sin embargo, nuestro análisis no mostró cambios significativos en ninguna de las proteínas pertenecientes a este MOC, siendo además la expresión de la mayoría de ellas demasiado baja como para tener una función relevante en el transporte de estos fármacos.

La disminución de la concentración intracelular de fármaco puede alcanzarse también por la expulsión del fármaco fuera de la célula mediante sistemas de bombeo, que se incluyen en el MOC-1b. Las principales proteínas implicadas en la reducción de la concentración de fármacos antitumorales dentro de la célula son bombas, en su mayoría pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC. La expresión de estas proteínas en células tumorales constituye uno de los principales problemas de resistencia a la quimioterapia, ya que son capaces de bombear al exterior celular una gran variedad de sustratos. En lo que se refiere a este MOC, los cambios encontrados en nuestro análisis de expresión génica fueron bastante notables.

Por una parte, encontramos una clara inducción de una diana típica de FXR, BSEP, concretamente en células Alexander (Figura RD-30) y hepatocitos humanos (Figura RD-33), al ser una bomba exportadora expresada principalmente en la membrana canalicular de los hepatocitos. Es poco lo que se sabe acerca del papel de esta proteína en cuanto a quimiorresistencia, aunque se ha demostrado que es capaz de transportar algu-

nos agentes antitumorales como la vinblastina, pero no otros como la daunorrubicina o el paclitaxel (Lecureur et al., 2000).

Otro de los cambios encontrados fue la inducción de la expresión del gen *ABCB4*, que codifica para una flipasa denominada MDR3, que también se expresa fundamentalmente en la membrana canalicular de los hepatocitos y se sabe que es inducida por FXR (Huang et al., 2003). Sin embargo, su sobreexpresión tuvo lugar en todas las líneas celulares estudiadas. Al igual que para BSEP, se conoce poco del papel de MDR3 en quimiorresistencia, aunque se ha descrito que está sobreexpresada en líneas celulares resistentes a la doxorubicina (Johnsson et al., 2005), uno de los compuestos que mostraron menor toxicidad tras la activación de FXR.

Por último, un hallazgo particularmente interesante e inesperado fue la inducción del gen *ABCG2*, que codifica para la proteína BCRP (de “Breast Cancer Resistance Protein”), una bomba exportadora que presenta una distribución tisular casi ubicua (Ni et al., 2010) y que juega un importante papel en la quimiorresistencia de una gran variedad de cánceres y líneas celulares tumorales. La inducción de esta proteína en respuesta al GW4064 fue una sorpresa porque, a diferencia de BSEP y MDR3, no hay ningún dato publicado acerca de que BCRP sea diana de FXR. Además, sólo se dio en la línea celular LS 174T silvestre, pero no en células Alexander ni en hepatocitos humanos, lo que podría indicar que es una diana intestinal de este receptor nuclear. Sin embargo, *ABCG2* no se indujo en la línea LS 174T resistente, como cabría de esperar. Al comparar la expresión basal de BCRP en las dos líneas celulares intestinales observamos que esta proteína se sobreexpresaba ya unas 3500 veces en la línea resistente con respecto a la silvestre. Pensamos que esta sobreexpresión probablemente se deba al incremento de expresión de FXR en la línea resistente, y que quizá el mecanismo de inducción de esta proteína esté de alguna manera saturado en estas células y ya no responda al GW4064, aunque no podemos descartar que alguno de los elementos de este mecanismo de inducción se encuentre alterado en las células resistentes. BCRP tiene una amplia especificidad de sustrato, transportando fármacos como metotrexato, mitoxantrona, flavopiridol, irinotecan, imatinib, doxorubicina, etc (Ni et al., 2010). Sin embargo, apenas hay datos en cuanto a su papel en la resistencia al cisplatino, aunque se ha descrito su sobreexpresión en líneas celulares resistentes a este agente antitumoral derivadas de cáncer esofágico (To et al., 2012).

Aunque los cambios de expresión encontrados aportaron datos para explicar la quimiorresistencia de nuestras células a algunos de los fármacos, es importante comentar que la ausencia de cambios de expresión en otras proteínas pertenecientes al MOC-1b también es muy interesante.

Hay que destacar, por ejemplo, que la expresión del gen *ABCC2*, no se modificó en respuesta al GW4064. Este gen codifica para la proteína MRP2, que se expresa en órganos como intestino, riñón, vesícula biliar, bronquios, placenta y en la membrana canalicular de los hepatocitos. A pesar de haber sido descrita previamente como diana de FXR en rata (Kast et al., 2002), a través de un elemento de respuesta ER-8 localizado en el promotor

del gen, nosotros no hemos encontrado cambios de expresión en ninguna de las líneas celulares estudiadas, lo que puede indicar que MRP2 sea diana de FXR en rata, pero no en humanos. Esta proteína también muestra una amplia versatilidad en cuanto a la especificidad de sustratos (Jemnitz et al., 2010), siendo capaz de expulsar fuera de la célula numerosos agentes citostáticos, entre ellos el cisplatino y el paclitaxel, lo que puede explicar la falta de protección en nuestros experimentos contra la toxicidad de este último. Otras proteínas capaces de transportar paclitaxel y que no cambiaron su expresión en respuesta al GW4064, son MDR1 (Wang et al., 2012) y ATP7A (Owatari et al., 2007).

En el MOC-2 se engloban los mecanismos que incluyen cambios en enzimas responsables de la transformación de profármacos a compuestos activos o que están implicadas en el metabolismo de fármacos para producir metabolitos inactivos. Nuestro análisis no mostró sobreexpresión de ninguna proteína perteneciente a este grupo en respuesta al GW4064, incluidas dos proteínas descritas como dianas de FXR, CYP3A4 (Gnerre et al., 2004) y C/EBP β (Noh et al., 2011). Ahora bien, la falta de respuesta de los genes que codifican estas dos proteínas puede ser importante para explicar la sensibilidad de las células a algunos fármacos.

Los fármacos activos son detoxificados por reacciones de oxidorreducción llevadas a cabo por enzimas de fase I, como las relacionadas con el citocromo p450, entre las que se encuentra la CYP3A4. Esta enzima está implicada en la biotransformación del paclitaxel a su principal metabolito, el 6- α -hidroxipaclitaxel, que es posteriormente excretado a la bilis para su eliminación. Del mismo modo, la CYP3A4 también participa en la biotransformación del sorafenib (Ghassabian et al., 2012) y otros inhibidores de tirosina quinasas (Adams y Leggas, 2007). Por tanto, la falta de respuesta de esta enzima al GW4064 podría explicar la falta de protección de las células Alexander frente a estos dos agentes antitumorales.

En el caso de C/EBP β , se ha descrito que esta proteína es capaz de inducir la expresión de varias enzimas detoxificantes (Noh et al., 2011), entre las que se encuentran la GCLC (de "Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit"), la GCLM (de "Glutamate-Cysteine Ligase Modifier subunit") y la MnSOD (de "Superoxide Dismutase"), todas ellas implicadas en la defensa celular frente al estrés oxidativo. Además, recientemente se ha descrito que FXR es capaz de proteger células hepáticas de la toxicidad del paracetamol (Lee et al., 2010) a través de la inducción de varias enzimas de fase II, entre las que se encuentra la GCLM. Por tanto, teniendo en cuenta que el principal mecanismo de toxicidad del paracetamol es la generación de ROS, la ausencia de respuesta al GW4064 de C/EBP β y su vía de señalización podría explicar la falta de protección de las células Alexander frente a este fármaco.

La alteración de los niveles de expresión o de la actividad de las proteínas diana y de las vías de señalización sensibles a fármacos antineoplásicos se incluye en el MOC-3. La ausencia de cambios de expresión en los genes investigados pertenecientes a este MOC (Tabla RD-1) no nos sorprendió, puesto que ninguno de ellos había sido descrito previamente como diana de FXR. En cualquier caso, la falta de cambios en los receptores de tipo

tirosina quinasa EGFR y PDGFR, ambos dianas del sorafenib, es otro ejemplo que explica la falta de resistencia a este antitumoral en las células tratadas con GW4064.

El siguiente MOC era el más interesante en nuestro caso, ya que todos los compuestos que mostraron menor toxicidad tras la transfección y activación de FXR eran genotóxicos, y en el MOC-4 se engloban las proteínas que intervienen en los procesos de reparación del ADN. En nuestro análisis se incluían genes involucrados en los principales mecanismos de reparación del ADN, como NER, BER (de “Base Excision Repair”), MMR, HR y NHEJ (de “Non-homologous DNA End Joining”).

Sin embargo, de todos los genes analizados, sólo el *TCEA2*, incrementó su expresión en respuesta al GW4064. Este gen, descrito como diana de FXR muy recientemente (Cuesta et al., 2012), codifica para un factor de transcripción, denominado TFIIS, que participa en una variante del mecanismo de reparación NER acoplada a la transcripción, denominada TC-NER (de “Transcription Coupled Nucleotide Excision Repair”) (Fousteri y Mullenders, 2008). En ocasiones, el daño inducido al ADN por compuestos con actividad genotóxica o por radiación UV, genera lesiones abultadas que distorsionan la estructura del ADN, bloqueando el proceso de elongación de la transcripción, de forma que la ARN polimerasa se queda parada en el lugar de la lesión. Este estancamiento de la ARN polimerasa es la señal de activación del mecanismo TC-NER (Fousteri y Mullenders, 2008), que se encarga de reparar este tipo de lesiones para que la transcripción pueda continuar de forma eficaz.

Se ha demostrado que TFIIS es capaz de estimular el corte de ARN nacientes, estimular la elongación y facilitar la eliminación de bases erróneas durante la transcripción de la ARN polimerasa II “in vitro” (Wind y Reines, 2000). Además, se ha descrito un papel para este factor en el mecanismo TC-NER “in vivo”. Cuando se produce un daño en el ADN y la ARN polimerasa II queda varada en la lesión, uno de los pasos cruciales es la translocación de esta proteína aguas arriba, con objeto de dejar libre el sitio de la lesión para que el resto de proteínas de TC-NER puedan llevar a cabo la reparación (Cramer et al., 2001). Tras la reparación, la reanudación de la transcripción depende de la escisión del ARNm sobrante sintetizado previamente y el reposicionamiento del extremo 3' en el centro activo de la polimerasa (Nudler, 1999). Este es el paso en el que interviene TFIIS, estimulando la actividad de corte de la ARN polimerasa II, permitiendo así que se reinicie el proceso de transcripción. En este sentido, hay que remarcar que la actividad de estimulación de corte de ARNm nacientes de TFIIS se ha probado en fragmentos de ADN con aductos de cisplatino (Tornaletti et al., 2003).

Existen tres isoformas diferentes de TFIIS generadas a partir de 3 genes diferentes, denominados *TCEA1*, *TCEA2* y *TCEA3*. El primero se expresa de forma ubicua, el segundo se expresa predominantemente en testículos y ovarios, y el tercero se expresa fundamentalmente en corazón, hígado, músculo esquelético y riñón (Taira et al., 1998; Umehara et al., 1995; Xu et al., 1994). Curiosamente, la isoforma sobreexpresada en respuesta al GW4064 en nuestros experimentos fue la generada a partir del gen *TCEA2*, cuya expre-

sión no se da en hígado según la bibliografía (Umehara et al., 1995), mientras que la expresión de *TCEA1* no cambió en ninguno de los casos y la expresión de *TCEA3*, la isoforma específica de hígado, sólo se modificó en los hepatocitos humanos expuestos al GW4064, disminuyendo su expresión aproximadamente al 50% (Tabla RD-2). En estudios en *Xenopus*, se ha visto que la isoforma 2 puede expresarse en tejidos adultos adicionales a los ya comentados (Labhart y Morgan, 1998). De hecho, en nuestro estudio, los genes *TCEA1* y *TCEA3* muestran mayor expresión basal en hepatocitos humanos y células Alexander (Tabla RD-2), pero el gen *TCEA2* presenta una expresión basal detectable en ambos tipos celulares, y tras su activación por el GW4064 alcanza niveles más elevados que los de la isoforma *TCEA3*, específica del tejido hepático.

Tabla RD-2. Ciclos umbrales (Cts) encontrados para los genes codificantes para el factor TFIIIS.

Línea celular	<i>TCEA1</i>	<i>TCEA2</i>	<i>TCEA3</i>	<i>GAPDH</i>
Alexander + DMSO	19.2 ± 0.1	26.2 ± 0.1	24.0 ± 0.1	19.3 ± 0.1
Alexander + GW4064	19.3 ± 0.1	23.6 ± 0.1	24.1 ± 0.1	19.4 ± 0.1
Hepatocitos H. + DMSO	19.1 ± 0.2	25.7 ± 0.4	21.2 ± 0.1	20.5 ± 0.2
Hepatocitos H. + GW4064	19.0 ± 0.2	20.8 ± 0.3	21.9 ± 0.2	20.3 ± 0.0
LS174T + DMSO	19.3 ± 0.0	32.0 ± 0.2	22.5 ± 0.0	21.6 ± 0.1
LS174T + GW4064	19.4 ± 0.1	29.3 ± 0.3	22.8 ± 0.2	21.6 ± 0.0
LS174T/R + DMSO	18.2 ± 0.1	27.4 ± 0.1	20.3 ± 0.1	20.4 ± 0.1
LS174T/R + GW4064	18.3 ± 0.0	22.7 ± 0.2	20.5 ± 0.1	20.4 ± 0.1

Se muestran los Cts mediante los cuales se determinó la expresión de los 3 genes codificantes para el factor de transcripción TFIIIS y el normalizador GAPDH en células Alexander cotransfectadas con FXR α 1(-) junto con RXR α , hepatocitos humanos en cultivo primario, células LS 174T cotransfectadas con FXR α 1(-) junto con RXR α y células LS 174T/R, expuestas o no (DMSO) a 1 μ M de GW4064. Los valores se determinaron mediante RT-QPCR y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos.

Otro dato a tener en cuenta es que, mientras que los genes *TCEA1* y *TCEA3* apenas modifican su expresión entre las células LS 174T silvestres y las resistentes, el gen *TCEA2* se encuentra sobreexpresado 10.4 veces en las células resistentes con respecto a las silvestres (Tabla RD-2), lo que sugiere un papel de esta isoforma en el fenotipo MDR que exhiben estas células.

Por tanto, aunque el factor TFIIIS codificado por el gen *TCEA2* no sea el característico de los tejidos en donde se expresa FXR, parece claro que la activación de su expresión por este receptor nuclear tiene lugar en células hepáticas e intestinales, sugiriendo un posible papel para este factor de transcripción en la protección celular mediada por FXR frente al cisplatino y otros compuestos con propiedades genotóxicas. El papel protector de TFIIIS tendría lugar a través del mecanismo de reparación del ADN TC-NER, permitiendo así la transcripción de los genes dañados y la restauración de la función celular.

Por último, se encontraron también cambios en la expresión de algunos genes pertenecientes al MOC-5, que engloba las proteínas implicadas en la estimulación de procesos de apoptosis (MOC-5a) y supervivencia (MOC-5b).

Por una parte se produjo una sobreexpresión del gen *KRT13*, que codifica para la queratina 13. Este gen ha sido previamente descrito como diana de FXR en células epiteliales gástricas (Lian et al., 2011), pero no en células hepáticas o intestinales. Nuestros resultados indican que esta proteína podría ser diana de FXR en todos los tejidos en los que se expresa este receptor nuclear. Las keratinas son proteínas estructurales, pero también se les han asignado propiedades anti-apoptóticas, a través de la inhibición de rutas de activación de este proceso de muerte celular (Caulin et al., 2000; Gilbert et al., 2001). Por tanto, el aumento de expresión de la queratina 13 podría defender a las células contra el efecto apoptótico de alguno de los compuestos utilizados en nuestro estudio, como la mitomicina C, capaz de inducir la expresión de la caspasa 8 para iniciar el proceso apoptótico (Liedtke et al., 2007).

También encontramos una sobreexpresión de dos citoquinas, CCL14 y CCL15, cuyo significado desconocemos, ya que este tipo de proteínas está involucrado en angiogénesis, proliferación celular, migración, invasión y metástasis (Forssmann et al., 2001), pero se conoce muy poco de su papel en quimiorresistencia.

Otro hallazgo inesperado fue la ausencia de cambios en el gen *SQSTM1*, que codifica para la proteína p62, a la que se han atribuido propiedades protectoras y que ha sido recientemente postulada como diana de FXR (Williams et al., 2012). Sin embargo, al igual que sucedía con MRP2, los estudios sobre la relación entre FXR y *SQSTM1* no han sido realizados en humanos, sino en ratón, por lo que es posible que no sea una diana en humanos, o que las líneas celulares utilizadas en nuestro estudio carezcan de algún factor necesario para la activación de este gen por FXR.

Finalmente, hay que mencionar que la ausencia de cambios de expresión en algunos genes, como *BAX* y *BCL2*, podría explicar la falta de protección de FXR frente a compuestos como la colchicina, el paclitaxel o el artesunato, cuyo mecanismo de acción implica la activación de la apoptosis.

4.3.9- Efecto protector de BCRP frente a la toxicidad del cisplatino en células intestinales

Entre los cambios mencionados anteriormente, uno de los que más nos llamó la atención fue la sobreexpresión de BCRP en respuesta al GW4064 en las células LS 174T silvestres transfectadas con el heterodímero FXR/RXR.

Hasta el momento sólo se han publicado dos trabajos que relacionan BCRP y cisplatino (Niu et al., 2012; To et al., 2012), pero en ninguno de ellos se demuestra realmente que BCRP transporte este fármaco o alguno de sus derivados. En el trabajo de Niu y colaboradores, observan que el tratamiento de células de adenocarcinoma de pulmón resistentes al cisplatino con heparina de bajo peso molecular disminuye los niveles proteicos de BCRP mediante la activación de su degradación en el proteasoma. Tras el tratamiento la resistencia al cisplatino disminuye en esta línea celular y los autores achacan esta mayor

sensibilidad a la disminución de la expresión de BCRP. En el estudio de To y colaboradores demuestran la sobreexpresión de BCRP en una línea celular de carcinoma de esófago resistente al cisplatino, algo similar a lo encontrado por nosotros al comparar las líneas LS 174T silvestre y resistente, pero no demuestran que la mayor resistencia de estas células al cisplatino se deba a la sobreexpresión de esta bomba ABC.

Con el objetivo de comprobar si el aumento de expresión de BCRP en las células LS 174T silvestres conllevaba un aumento de la resistencia al cisplatino, realizamos experimentos de protección similares a los descritos en el apartado 4.3.7, pero en este caso transfectamos las células con un vector que contenía la ORF de BCRP, que había sido clonado previamente en nuestro laboratorio por la Dra. Alba María García Blázquez. Dos días después de la transfección tratamos las células con concentraciones crecientes de cisplatino o mitoxantrona, un agente antineoplásico transportado con gran eficacia por BCRP (Ni et al., 2010).

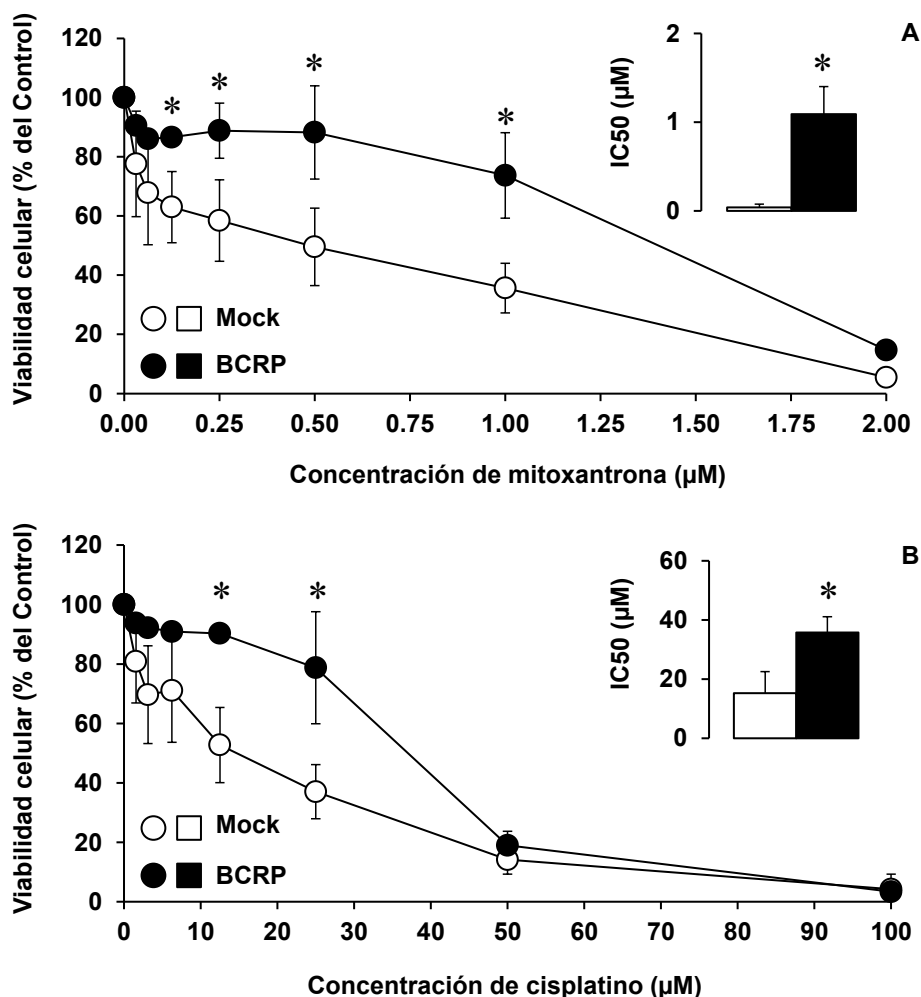


Figura RD-38. Efecto protector de BCRP frente a la toxicidad de la mitoxantrona (A) y el cisplatino (B) en células LS 174T transfectadas con un vector vacío (Mock) o BCRP. La viabilidad se determinó mediante el test de formazán tras exponer las células al fármaco durante 72 h y se expresó como porcentaje de células vivas con respecto a las células no tratadas o como IC_{50} (Inserto). La IC_{50} se definió como la concentración de fármaco requerida para reducir la viabilidad celular al 50%. Los valores representan la media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos realizados por triplicado. *, $p < 0.05$, comparando con las células control (Mock).

Como se observa en la Figura RD-38, la sensibilidad de las células frente a la toxicidad de ambos compuestos se redujo de forma significativa en las células transfectadas con BCRP. Como era de esperar, la inducción de resistencia fue mayor para la mitoxantrona, con un incremento de la IC_{50} de unas 29 veces, mientras que el aumento para el cisplatino fue de 2.5 veces. Estos resultados indican que la BCRP es capaz de transportar cisplatino o alguno de sus derivados, aunque con menor eficacia que la mitoxantrona, y que, por tanto, es uno de los factores que influyen en la quimiorresistencia inducida por FXR, al menos en células intestinales.

4.3.10- Expresión del gen *TCEA2* en respuesta al cisplatino

De entre todos los genes pertenecientes a MOCs cuya expresión varió en respuesta al GW4064, el principal candidato a ser el responsable de la protección mediada por la activación de FXR era el *TCEA2*, tanto por su función en el mecanismo de reparación del ADN TC-NER, como porque fue el gen que más se indujo en todas las líneas celulares utilizadas en el estudio, exceptuando la inducción de BCRP en las células LS 174T silvestres. Debido a esto, decidimos comprobar cómo se comportaba este gen en respuesta al cisplatino en los cultivos de células Alexander transfectadas con el heterodímero FXR/RXR y los cultivos de hepatocitos humanos, expuestos en los apartados 4.3.3 y 4.3.5, respectivamente.

El GW4064 no tuvo ningún efecto sobre la expresión de *TCEA2* en células Alexander transfectadas con el vector vacío (Mock), mientras que en las tratadas con cisplatino se observó una pequeña tendencia a la inducción a las 48 h de exposición, que no llegó a ser estadísticamente significativa (Figura RD-39A). Sin embargo, en las células transfectadas con FXR/RXR, tanto el GW4064 como el cisplatino, aunque este último con menor eficacia, fueron capaces de inducir la expresión de este gen de forma significativa, mostrando el máximo de inducción a las 24 h y disminuyendo a partir de ese momento (Figura RD-39B). Por tanto, la respuesta del gen *TCEA2* al cisplatino es similar a la de BSEP (Figura RD-30) y, por consiguiente, probablemente también mediada por entero a través de FXR.

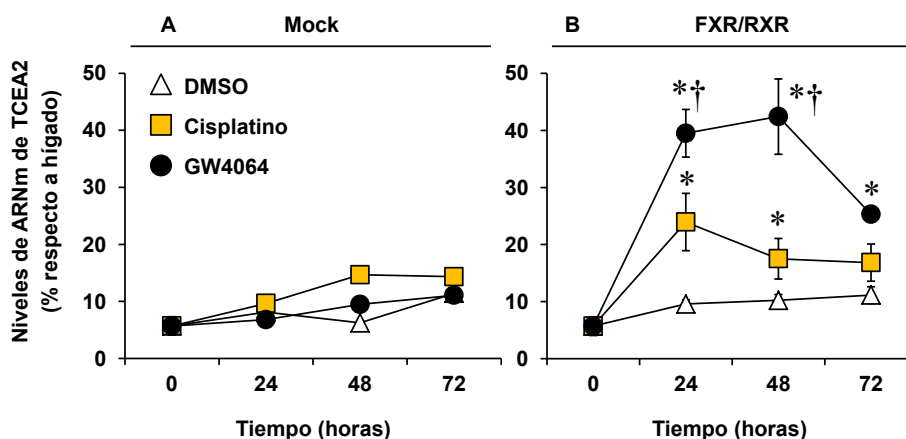


Figura RD-39. Efecto del cisplatino en la respuesta del gen *TCEA2* en células Alexander. Las células se transfectaron con un vector vacío (Mock, A) o con FXR α 1(-) junto con RXR α (B) y se trataron o no (DMSO) con 5 μ M de cisplatino o 1 μ M de GW4064, durante 24, 48 o 72 h. Los niveles relativos de ARNm, determinados por RT-QPCR, se expresan como porcentaje de expresión respecto a hígado humano y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células control (DMSO). †, $p < 0.05$, comparando las células tratadas con cisplatino y GW4064.

De la misma forma, la exposición de los hepatocitos humanos al cisplatino indujo la expresión de *TCEA2*, aunque con menor eficacia que el GW4064 (Figura RD-40). Además, la inducción de este gen fue incluso mayor que la observada para BSEP en las mismas condiciones (Figura RD-33), considerada una de las dianas más específicas y sensibles de FXR.

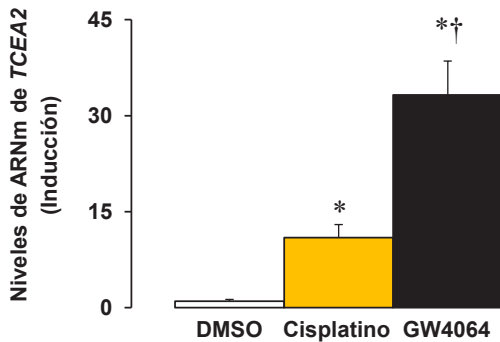


Figura RD-40. Efecto del cisplatino en la respuesta del gen *TCEA2* en hepatocitos humanos en cultivo primario. Los hepatocitos se trataron o no (DMSO) con 5 μ M de cisplatino o 1 μ M de GW4064 durante 24 h. Los niveles relativos de ARNm, determinados por RT-QPCR, se expresan como veces de inducción respecto a las células control (DMSO) y son media \pm EEM de, al menos, 3 cultivos. *, $p < 0.05$, comparando con las células control (DMSO). †, $p < 0.05$, comparando las células tratadas con cisplatino y GW4064.

4.4- MODELO PROPUESTO DEL PAPEL DE FXR EN QUIMIORRESISTENCIA

En la Figura RD-41 se muestra un esquema con el modelo propuesto para el papel que juega el receptor nuclear FXR en la quimiorresistencia de células hepáticas e intestinales frente a fármacos antineoplásicos y compuestos xenobióticos, a partir de los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral.

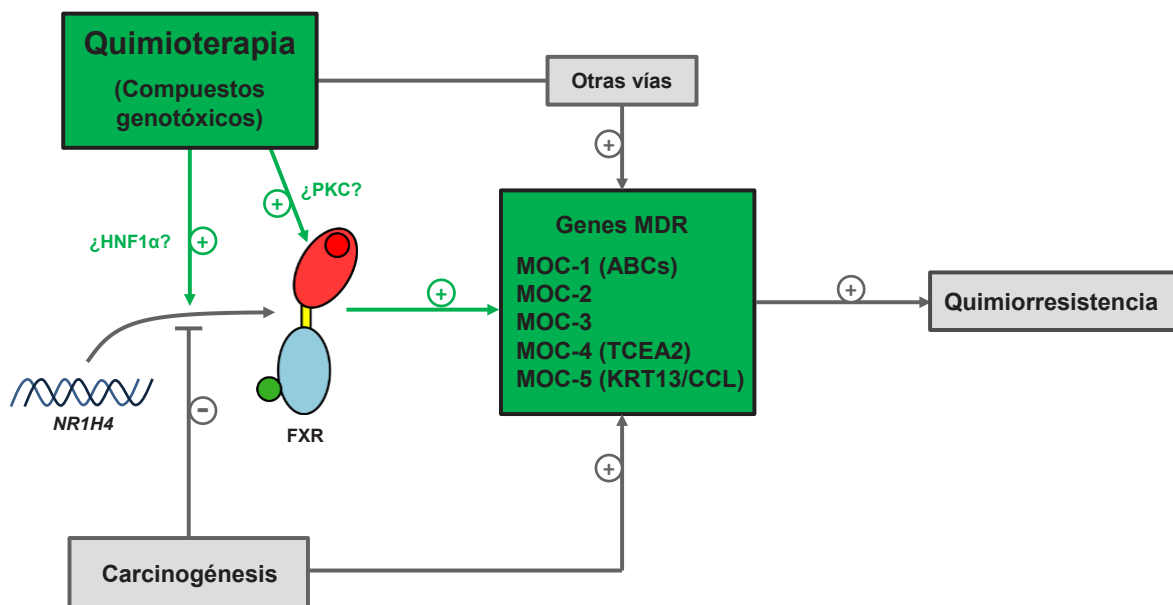


Figura RD-41. Modelo propuesto del papel de FXR en la mediación de quimiorresistencia a fármacos antitumorales y compuestos xenobióticos en células hepáticas e intestinales. Los recuadros y flechas grises indican datos bibliográficos y los recuadros y flechas verdes indican los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral.

Durante los últimos años se han obtenido muchos datos acerca de la relación entre la caída de expresión de FXR y el proceso carcinogénico, aunque todavía no se ha demostrado de forma concluyente si el proceso tumoral es consecuencia de la represión génica de este receptor nuclear o viceversa. En cualquier caso, los últimos trabajos publicados en los que se describe la aparición espontánea de tumores en ratones knock-out para FXR, tanto a nivel hepático como intestinal (Kim et al., 2007; Maran et al., 2009; Modica et al., 2008; Yang et al., 2007), así como otros trabajos más recientes, en los que se ha demostrado que FXR es capaz de inhibir la gankirina en células hepáticas (Jiang et al., 2012), inhibiendo así la degradación proteosómica de determinadas proteínas supresoras de tumores, o que este receptor nuclear es capaz de inhibir la proliferación de las células intestinales mediante la inhibición de la ruta de Src (Peng et al., 2012), relacionan la expresión de FXR con el proceso tumoral. Nuestros datos concuerdan con la información publicada previamente, ya que hemos encontrado una disminución de la expresión de FXR en todos los tipos de tumores hepáticos e intestinales analizados.

Por otra parte, el proceso carcinogénico por sí mismo da lugar a la activación de determinados MOCs en ambos tipos de tumores, como demuestran los datos del trabajo previo realizado por el Dr. Pablo Martínez Becerra y la Licenciada Isabel Monte Grondona. Del mismo modo, la quimioterapia es capaz de activar genes de quimiorresistencia por vías de señalización que no involucran a FXR, ya que, como hemos visto, el tratamiento con cisplatino incrementa la expresión de genes pertenecientes a MOCs en células que no expresan este receptor nuclear.

Sin embargo, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral apoyan la existencia de un papel para el receptor nuclear FXR tanto en la quimioprotección de células sanas, como en el desarrollo de quimiorresistencia en células tumorales, en respuesta al tratamiento con quimioterapia o xenobióticos, concretamente con compuestos con capacidad genotóxica.

Por una parte, el tratamiento con cisplatino, y quizá otros compuestos genotóxicos, es capaz de inducir la expresión de FXR, probablemente a través de rutas de señalización que implican la activación de factores del tipo HNF, como el HNF1 α , que se encarga de regular la expresión de este receptor nuclear en células HepG2 (Lou et al., 2007).

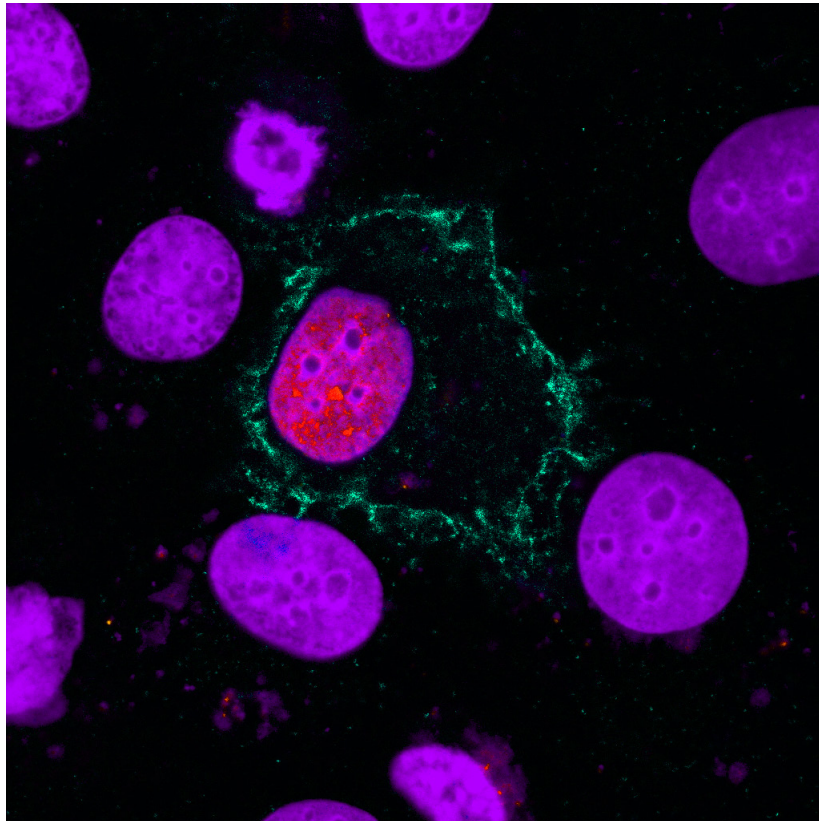
Por otra parte, el tratamiento con estos compuestos es capaz de incrementar también la actividad de este receptor nuclear, aunque no con la misma eficacia que un ligando típico, probablemente actuando a través de rutas que implican la fosforilación de FXR mediante alguna isoforma de PKC activada en respuesta al daño al ADN.

Finalmente estos dos procesos dan lugar a un incremento de la expresión de genes pertenecientes a la vía de señalización de este receptor nuclear, involucrados en diferentes MOCs, que provocarían a su vez un aumento de la protección de las células frente a la toxicidad de estos compuestos genotóxicos.

Por supuesto, como apoyan los trabajos publicados en los últimos años por otros grupos (Lee et al., 2010; Lian et al., 2011; Noh et al., 2011; Williams et al., 2012), no se puede

descartar que la activación de FXR, por ligandos típicos u otras vías, de lugar además a la activación de otros genes protectores que no respondan en nuestros modelos celulares.

En resumen, nuestros datos demuestran que FXR está involucrado en la quimiorresistencia a fármacos antitumorales y compuestos xenobióticos en células hepáticas e intestinales, no sólo mediante la inducción de la expresión de varios genes pertenecientes a diferentes MOCs, sino como parte de un sistema sensor de estrés genotóxico poco conocido hasta el momento.



“Nada es imposible, sino matemáticamente improbable”

Anónimo

5. Conclusiones

CONCLUSIÓN PRIMERA

En los tejidos en los que se expresa el receptor nuclear FXR aparecen patrones característicos de expresión de las isoformas FXR α 1(+/-) y FXR α 2(+/-), de manera que las isoformas FXR α 1 son más abundantes en hígado, mientras que en intestino y riñón predominan las FXR α 2. Por el contrario, en todos los territorios en los que FXR está presente aparecen cantidades equivalentes de las isoformas FXR α (+) y FXR α (-). Además, todas las isoformas muestran idéntica distribución subcelular, es decir intranuclear, con independencia del tejido del que proceden las células en las que se expresa FXR.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La magnitud de la respuesta de FXR a sus agonistas naturales, los ácidos biliares, y sintéticos, como el GW4064, difiere entre las cuatro isoformas de este receptor nuclear, siendo en general, en lo que se refiere a la magnitud de la estimulación de la expresión de los genes diana de FXR, la isoforma FXR α 1(-) más potente que la FXR α 2(-) y las isoformas largas (+) menos potentes que las cortas (-). El orden de potencia estimuladora de la transcripción por parte de las isoformas de FXR se mantiene en distintas líneas celulares tanto hepáticas como intestinales.

CONCLUSIÓN TERCERA

Como resultado de la activación de las isoformas de FXR por agonistas endógenos o sintéticos se pueden distinguir tres patrones diferentes de inducción de los genes diana de este receptor nuclear. Un patrón de respuesta diferencial a las isoformas de FXR es compartido por algunos genes diana característicamente hepáticos, como BSEP, e intestinales, como FGF19 e IBABP. Los otros dos tipos de respuesta diferencial tienen como prototipos dos genes (SHP y OST β) cuya expresión responde a la activación de FXR tanto en hígado como en intestino. Los patrones de estimulación diferencial de la transcripción por las isoformas de FXR se mantienen de forma independiente del agonista que active al receptor nuclear.

CONCLUSIÓN CUARTA

En lo que se refiere al núcleo esteroide, existe una considerable diversidad en la capacidad de las distintas especies moleculares de ácidos biliares para activar FXR. Así, el ácido quenodesoxicólico, el ácido desoxicólico, el ácido litocólico y el ácido allo-cólico, son capaces de activar FXR, mientras que el ácido cólico y el ácido ursodesoxicólico carecen de esta capacidad.

CONCLUSIÓN QUINTA

Dependiendo del tipo celular considerado, la conjugación con taurina o glicina anula, reduce o no afecta a la capacidad de los ácidos biliares para activar FXR. Esto sugiere que, para ejercer su capacidad agonista sobre este receptor nuclear, los ácidos biliares conjugados, pero no sus formas libres, necesitan de la presencia de ciertos mecanismos adicionales, aún por determinar y que han desaparecido o están menos activos en algunas líneas celulares hepáticas e intestinales.

CONCLUSIÓN SEXTA

En pacientes que aún no han recibido tratamiento farmacológico, la presencia del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos característico de los tumores hepáticos e intestinales no se acompaña de una mayor expresión de FXR. Por el contrario, los niveles de expresión de este receptor nuclear en hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y adenocarcinoma de colon están disminuidos. Además no existe un cambio en los patrones de expresión de las isoformas de FXR que pudiese justificar cambios globales en la activación de la transcripción dependiente de este receptor nuclear.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA

En células en cultivo, tanto células tumorales hepáticas e intestinales como hepatocitos humanos sanos, un aumento en los niveles de expresión de FXR, ya sea mediante transfección o inducido por tratamiento prolongado con cisplatino, y su posterior activación, estimula la expresión de genes incluidos en, al menos, tres mecanismos de quimiorresistencia diferentes. Entre ellos se encuentran las bombas exportadoras ABCB4 y ABCG2, la proteína TCEA2 implicada en la reparación del ADN, y las proteínas CCL14, CCL15 y KRT13 relacionadas con la supervivencia celular.

CONCLUSIÓN OCTAVA

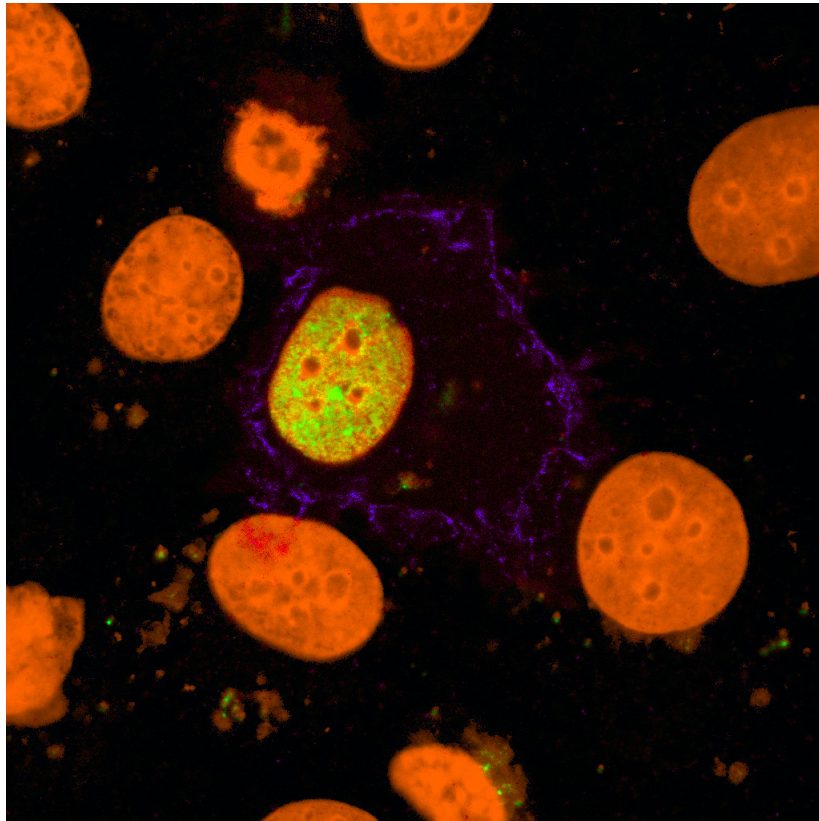
Los procesos de quimiorresistencia activados por FXR son capaces de proteger de forma parcial a células hepáticas e intestinales frente la toxicidad de compuestos con actividad genotóxica, como el cisplatino, la mitomicina C, la doxorubicina y el dicromato potásico. Sin embargo, no consiguen disminuir el efecto tóxico de compuestos con otros mecanismos de acción diferentes al daño al ADN, como la colchicina, el paclitaxel, el acetaminofeno, el artesunato y el sorafenib.

CONCLUSIÓN NOVENA

Algunos agentes genotóxicos como el cisplatino son capaces de activar de forma probablemente indirecta a FXR. Además, el cisplatino también es capaz de inducir, de forma independiente de FXR, la expresión de genes pertenecientes a la ruta de señalización de este receptor nuclear.

CONCLUSIÓN GLOBAL

FXR está implicado en la activación de mecanismos de respuesta a la agresión química causada por sustancias endógenas y exógenas. Así, FXR puede formar parte de un complejo sistema de defensa celular al estrés químico, similar al sistema SOS que está muy conservado en bacterias. En células hepáticas e intestinales sanas, FXR puede jugar un papel de protección frente a sustancias genotóxicas y por lo tanto potencialmente cancerígenas, mientras que en las células tumorales FXR puede favorecer su mayor resistencia a la quimioterapia.



“Si no quieres perderte en el olvido tan pronto como estés muerto y corrompido, escribe cosas dignas de leerse, o haz cosas dignas de escribirse.”

Benjamin Franklin

6. Bibliografía

- Abe, T., Unno, M., Onogawa, T., Tokui, T., Kondo, T.N., Nakagomi, R., Adachi, H., Fujiwara, K., Okabe, M., Suzuki, T., Nunoki, K., Sato, E., Kakyō, M., Nishio, T., Sugita, J., Asano, N., Tanemoto, M., Seki, M., Date, F., Ono, K., Kondo, Y., Shiiba, K., Suzuki, M., Ohtani, H., Shimosegawa, T., Iinuma, K., Nagura, H., Ito, S., Matsuno, S., 2001. LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 120, 1689-1699.
- Adams, V.R., Leggas, M., 2007. Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. *Clinical therapeutics* 29, 1338-1353.
- Ahn, B., Kang, D., Kim, H., Wei, Q., 2004. Repair of mitomycin C cross-linked DNA in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay. *Molecules and cells* 18, 249-255.
- Akaboshi, M., Kawai, K., Maki, H., Akuta, K., Ujeno, Y., Miyahara, T., 1992. The number of platinum atoms binding to DNA, RNA and protein molecules of HeLa cells treated with cisplatin at its mean lethal concentration. *Japanese journal of cancer research : Gann* 83, 522-526.
- Akaboshi, M., Kawai, K., Ujeno, Y., Takada, S., Miyahara, T., 1994. Binding characteristics of (-)-(R)-2-aminomethylpyrrolidine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-2-platinum(II) to DNA, RNA and protein molecules in HeLa cells and its lethal effect: comparison with cis- and trans-diamminedichloroplatinums(II). *Japanese journal of cancer research : Gann* 85, 106-111.
- Alvarez, L., Jara, P., Sanchez-Sabate, E., Hierro, L., Larrauri, J., Diaz, M.C., Camarena, C., De la Vega, A., Frauca, E., Lopez-Collazo, E., Lapunzina, P., 2004. Reduced hepatic expression of farnesoid X receptor in hereditary cholestasis associated to mutation in ATP8B1. *Human molecular genetics* 13, 2451-2460.
- Amos, L.A., Lowe, J., 1999. How Taxol stabilises microtubule structure. *Chemistry & biology* 6, R65-69.
- Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., Suchy, F.J., 2001. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 276, 28857-28865.
- Ananthanarayanan, M., Li, S., Balasubramanian, N., Suchy, F.J., Walsh, M.J., 2004. Ligand-dependent activation of the farnesoid X-receptor directs arginine methylation of histone H3 by CARM1. *J Biol Chem* 279, 54348-54357.
- Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., de Gramont, A., 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England journal of medicine* 350, 2343-2351.
- Anisfeld, A.M., Kast-Woelbern, H.R., Meyer, M.E., Jones, S.A., Zhang, Y., Williams, K.J., Willson, T., Edwards, P.A., 2003. Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem* 278, 20420-20428.
- Araya, Z., Wikvall, K., 1999. 6 α -hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1438, 47-54.

- Back, P., Walter, K., 1980. Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium. *Gastroenterology* 78, 671-676.
- Barbier, O., Torra, I.P., Sirvent, A., Claudel, T., Blanquart, C., Duran-Sandoval, D., Kuipers, F., Kosykh, V., Fruchart, J.C., Staels, B., 2003. FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* 124, 1926-1940.
- Barone, M., Francavilla, A., Polimeno, L., Ierardi, E., Romanelli, D., Berloco, P., Di Leo, A., Panella, C., 1996. Modulation of rat hepatocyte proliferation by bile salts: in vitro and in vivo studies. *Hepatology* 23, 1159-1166.
- Basu, A., Tu, H., 2005. Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase Cdelta. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1068-1073.
- Bavner, A., Sanyal, S., Gustafsson, J.A., Treuter, E., 2005. Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16, 478-488.
- Belghiti, J., Carr, B.I., Greig, P.D., Lencioni, R., Poon, R.T., 2008. Treatment before liver transplantation for HCC. *Annals of surgical oncology* 15, 993-1000.
- Benson, A.B., 3rd, Schrag, D., Somerfield, M.R., Cohen, A.M., Figueredo, A.T., Flynn, P.J., Krzyzanowska, M.K., Maroun, J., McAllister, P., Van Cutsem, E., Brouwers, M., Charette, M., Haller, D.G., 2004. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 3408-3419.
- Bialecki, E.S., Di Bisceglie, A.M., 2005. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 7, 26-34.
- Bianchini, F., Caderni, G., Dolara, P., Fantetti, L., Kriebel, D., 1989. Effect of dietary fat, starch and cellulose on fecal bile acids in mice. *The Journal of nutrition* 119, 1617-1624.
- Bjorkhem, I., 1992. Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *Journal of lipid research* 33, 455-471.
- Block, K.I., Koch, A.C., Mead, M.N., Tothy, P.K., Newman, R.A., Gyllenhaal, C., 2008. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int J Cancer* 123, 1227-1239.
- Bodin, K., Lindbom, U., Diczfalusy, U., 2005. Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4. *Biochim Biophys Acta* 1687, 84-93.
- Borude, P., Edwards, G., Walesky, C., Li, F., Ma, X., Kong, B., Guo, G.L., Apte, U., 2012. Hepatocyte specific deletion of farnesoid X receptor delays, but does not inhibit liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*.
- Boulikas, T., Vougiouka, M., 2003. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncology reports* 10, 1663-1682.

- Bridgewater, L.C., Manning, F.C., Woo, E.S., Patierno, S.R., 1994. DNA polymerase arrest by adducted trivalent chromium. *Molecular carcinogenesis* 9, 122-133.
- Briz, O., Macias, R.I., Vallejo, M., Silva, A., Serrano, M.A., Marin, J.J., 2003. Usefulness of liposomes loaded with cytostatic bile acid derivatives to circumvent chemotherapy resistance of enterohepatic tumors. *Mol Pharmacol* 63, 742-750.
- Brobst, D.E., Ding, X., Creech, K.L., Goodwin, B., Kelley, B., Staudinger, J.L., 2004. Guggulsterone activates multiple nuclear receptors and induces CYP3A gene expression through the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 528-535.
- Brossi, A., Yeh, H.J., Chrzanowska, M., Wolff, J., Hamel, E., Lin, C.M., Quin, F., Suffness, M., Silverton, J., 1988. Colchicine and its analogues: recent findings. *Medicinal research reviews* 8, 77-94.
- Bruhn, S.L., Pil, P.M., Essigmann, J.M., Housman, D.E., Lippard, S.J., 1992. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2307-2311.
- Budd, G.T., Fleming, T.R., Bukowski, R.M., McCracken, J.D., Rivkin, S.E., O'Bryan, R.M., Balcerzak, S.P., Macdonald, J.S., 1987. 5-Fluorouracil and folinic acid in the treatment of metastatic colorectal cancer: a randomized comparison. A Southwest Oncology Group Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 5, 272-277.
- Burris, T.P., Montrose, C., Houck, K.A., Osborne, H.E., Bocchinfuso, W.P., Yaden, B.C., Cheng, C.C., Zink, R.W., Barr, R.J., Hepler, C.D., Krishnan, V., Bullock, H.A., Burris, L.L., Galvin, R.J., Bramlett, K., Stayrook, K.R., 2005. The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Molecular pharmacology* 67, 948-954.
- Campana, G., Pasini, P., Roda, A., Spampinato, S., 2005. Regulation of ileal bile acid-binding protein expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic acid: role of the farnesoid X receptor. *Biochem Pharmacol* 69, 1755-1763.
- Carter, B.A., Taylor, O.A., Prendergast, D.R., Zimmerman, T.L., Von Furstenberg, R., Moore, D.D., Karpen, S.J., 2007. Stigmasterol, a soy lipid-derived phytosterol, is an antagonist of the bile acid nuclear receptor FXR. *Pediatr Res* 62, 301-306.
- Castelli, F., Tomasoni, L.R., Matteelli, A., 2012. Advances in the treatment of malaria. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 4, e2012064.
- Caulin, C., Ware, C.F., Magin, T.M., Oshima, R.G., 2000. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *The Journal of cell biology* 149, 17-22.
- Claudel, T., Staels, B., Kuipers, F., 2005. The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 2020-2030.

- Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I.P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J.C., Dallongeville, J., Hum, D.W., Kuipers, F., Staels, B., 2002. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest* 109, 961-971.
- Cohen, M.D., Kargacin, B., Klein, C.B., Costa, M., 1993. Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Critical reviews in toxicology* 23, 255-281.
- Combettes, L., Berthon, B., Claret, M., 1992. Taurolithocholate-induced Ca²⁺ release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J* 287 (Pt 3), 891-896.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Kornberg, R.D., 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292, 1863-1876.
- Crouse, J.R., 3rd, 1987. Hypertriglyceridemia: a contraindication to the use of bile acid binding resins. *The American journal of medicine* 83, 243-248.
- Cuesta, E.P., Langhi, C., Haro, D., Marrero, P.F., Rodriguez, J.C., 2012. Transcription elongation factor TFIIIS.1 gene is regulated by farnesoid X receptor. *the FEBS Journal* 279, 276.
- Cui, J., Heard, T.S., Yu, J., Lo, J.L., Huang, L., Li, Y., Schaeffer, J.M., Wright, S.D., 2002. The amino acid residues asparagine 354 and isoleucine 372 of human farnesoid X receptor confer the receptor with high sensitivity to chenodeoxycholate. *J Biol Chem* 277, 25963-25969.
- Cui, J., Huang, L., Zhao, A., Lew, J.L., Yu, J., Sahoo, S., Meinke, P.T., Royo, I., Pelaez, F., Wright, S.D., 2003. Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. *J Biol Chem* 278, 10214-10220.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., Van Cutsem, E., 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 351, 337-345.
- Chen, W.D., Wang, Y.D., Zhang, L., Shiah, S., Wang, M., Yang, F., Yu, D., Forman, B.M., Huang, W., 2010. Farnesoid X receptor alleviates age-related proliferation defects in regenerating mouse livers by activating forkhead box m1b transcription. *Hepatology* 51, 953-962.
- Chen, X.M., Liu, J., Wang, T., Shang, J., 2012. Colchicine-induced apoptosis in human normal liver L-02 cells by mitochondrial mediated pathways. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 26, 649-655.
- Chong, H.K., Infante, A.M., Seo, Y.K., Jeon, T.I., Zhang, Y., Edwards, P.A., Xie, X., Osborne, T.F., 2010. Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1. *Nucleic Acids Res* 38, 6007-6017.
- Dawson, P.A., Hubbert, M., Haywood, J., Craddock, A.L., Zerangue, N., Christian, W.V., Ballatori, N., 2005. The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 280, 6960-6968.

- De Gottardi, A., Touri, F., Maurer, C.A., Perez, A., Maurhofer, O., Ventre, G., Bentzen, C.L., Niesor, E.J., Dufour, J.F., 2004. The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer. *Digestive diseases and sciences* 49, 982-989.
- de Gramont, A., Figuer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F., Bonetti, A., 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18, 2938-2947.
- de Vree, J.M., Jacquemin, E., Sturm, E., Cresteil, D., Bosma, P.J., Aten, J., Deleuze, J.F., Desrochers, M., Burdelski, M., Bernard, O., Oude Elferink, R.P., Hadchouel, M., 1998. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 282-287.
- Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., Karpen, S.J., 2001. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121, 140-147.
- Dotto, G.P., 2000. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 1471, M43-56.
- Downes, M., Verdecia, M.A., Roecker, A.J., Hughes, R., Hogenesch, J.B., Kast-Woelbern, H.R., Bowman, M.E., Ferrer, J.L., Anisfeld, A.M., Edwards, P.A., Rosenfeld, J.M., Alvarez, J.G., Noel, J.P., Nicolaou, K.C., Evans, R.M., 2003. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell* 11, 1079-1092.
- Dussault, I., Beard, R., Lin, M., Hollister, K., Chen, J., Xiao, J.H., Chandraratna, R., Forman, B.M., 2003. Identification of gene-selective modulators of the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem* 278, 7027-7033.
- Efferth, T., Giaisi, M., Merling, A., Krammer, P.H., Li-Weber, M., 2007. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. *PloS one* 2, e693.
- El-Mir, M.Y., Badia, M.D., Luengo, N., Monte, M.J., Marin, J.J., 2001. Increased levels of typically fetal bile acid species in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)* 100, 499-508.
- Elferink, R.O., Groen, A.K., 2002. Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta* 1586, 129-145.
- Epstein, R.J., Leung, T.W., 2007. Reversing hepatocellular carcinoma progression by using networked biological therapies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 11-17.
- Fabregat, I., Roncero, C., Fernandez, M., 2007. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 27, 155-162.
- Falany, C.N., Johnson, M.R., Barnes, S., Diasio, R.B., 1994. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem* 269, 19375-19379.

- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P., 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18, 581-592.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127, 2893-2917.
- Fiorucci, S., Clerici, C., Antonelli, E., Orlandi, S., Goodwin, B., Sadeghpour, B.M., Sabatino, G., Russo, G., Castellani, D., Willson, T.M., Pruzanski, M., Pellicciari, R., Morelli, A., 2005. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 604-612.
- Fiorucci, S., Rizzo, G., Donini, A., Distrutti, E., Santucci, L., 2007. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends in molecular medicine* 13, 298-309.
- Forbes, S.A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C.Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., Teague, J.W., Campbell, P.J., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2011. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 39, D945-950.
- Forman, B.M., Goode, E., Chen, J., Oro, A.E., Bradley, D.J., Perlmann, T., Noonan, D.J., Burka, L.T., McMorris, T., Lamph, W.W., Evans, R.M., Weinberger, C., 1995. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 81, 687-693.
- Forssmann, U., Magert, H.J., Adermann, K., Escher, S.E., Forssmann, W.G., 2001. Hemofiltrate CC chemokines with unique biochemical properties: HCC-1/CCL14a and HCC-2/CCL15. *Journal of leukocyte biology* 70, 357-366.
- Fortune, J.M., Osheroff, N., 2000. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 64, 221-253.
- Fousteri, M., Mullenders, L.H., 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell research* 18, 73-84.
- Frankenberg, T., Miloh, T., Chen, F.Y., Ananthanarayanan, M., Sun, A.Q., Balasubramaniyan, N., Arias, I., Setchell, K.D., Suchy, F.J., Shneider, B.L., 2008. The membrane protein ATPase class I type 8B member 1 signals through protein kinase C zeta to activate the farnesoid X receptor. *Hepatology* 48, 1896-1905.
- Fuertes, M.A., Alonso, C., Perez, J.M., 2003. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical reviews* 103, 645-662.
- Fujino, T., Takeuchi, A., Maruko-Ohtake, A., Ohtake, Y., Satoh, J., Kobayashi, T., Tanaka, T., Ito, H., Sakamaki, R., Kashimura, R., Ando, K., Nishimaki-Mogami, T., Ohkubo, Y., Kitamura, N., Sato, R., Kikugawa, K., Hayakawa, M., 2012. Critical role of farnesoid X receptor for hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Journal of biochemistry* 152, 577-586.
- Fujino, T., Une, M., Imanaka, T., Inoue, K., Nishimaki-Mogami, T., 2004. Structure-activity relationship of bile acids and bile acid analogs in regard to FXR activation. *Journal of lipid research* 45, 132-138.

- Gewirtz, D.A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57, 727-741.
- Ghassabian, S., Rawling, T., Zhou, F., Doddareddy, M.R., Tattam, B.N., Hibbs, D.E., Edwards, R.J., Cui, P.H., Murray, M., 2012. Role of human CYP3A4 in the biotransformation of sorafenib to its major oxidized metabolites. *Biochem Pharmacol* 84, 215-223.
- Gilbert, S., Loranger, A., Daigle, N., Marceau, N., 2001. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *The Journal of cell biology* 154, 763-773.
- Gineste, R., Sirvent, A., Paumelle, R., Helleboid, S., Aquilina, A., Darteil, R., Hum, D.W., Fruchart, J.C., Staels, B., 2008. Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 22, 2433-2447.
- Giovannucci, E., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., 1993. A meta-analysis of cholecystectomy and risk of colorectal cancer. *Gastroenterology* 105, 130-141.
- Gnerre, C., Blattler, S., Kaufmann, M.R., Looser, R., Meyer, U.A., 2004. Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* 14, 635-645.
- Gong, Y., Huang, Z.B., Christensen, E., Gluud, C., 2008. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000551.
- Gong, Y.Z., Everett, E.T., Schwartz, D.A., Norris, J.S., Wilson, F.A., 1994. Molecular cloning, tissue distribution, and expression of a 14-kDa bile acid-binding protein from rat ileal cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4741-4745.
- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., Maloney, P.R., Willson, T.M., Kliewer, S.A., 2000. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6, 517-526.
- Goulis, J., Leandro, G., Burroughs, A.K., 1999. Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *Lancet* 354, 1053-1060.
- Gray, M.A., Pollock, C.B., Schook, L.B., Squires, E.J., 2010. Characterization of porcine pregnane X receptor, farnesoid X receptor and their splice variants. *Exp Biol Med (Maywood)* 235, 718-736.
- Grober, J., Zaghini, I., Fujii, H., Jones, S.A., Kliewer, S.A., Willson, T.M., Ono, T., Besnard, P., 1999. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem* 274, 29749-29754.
- Hagenbuch, B., Dawson, P., 2004. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* 447, 566-570.

- Hagenbuch, B., Meier, P.J., 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447, 653-665.
- Halm, U., Etzrodt, G., Schiefke, I., Schmidt, F., Witzigmann, H., Mossner, J., Berr, F., 2000. A phase II study of pegylated liposomal doxorubicin for treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 11, 113-114.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., Brasch, M.A., 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788-1795.
- Hastie, S.B., 1991. Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacology & therapeutics* 51, 377-401.
- Hathcock, J.N., 1985. Metabolic mechanisms of drug-nutrient interactions. *Federation proceedings* 44, 124-129.
- Heckman, J.T., Devera, M.B., Marsh, J.W., Fontes, P., Amesur, N.B., Holloway, S.E., Nalesnik, M., Geller, D.A., Steel, J.L., Gamblin, T.C., 2008. Bridging locoregional therapy for hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation. *Annals of surgical oncology* 15, 3169-3177.
- Herraez, E., 2011. Implicación de promotores y transportadores de aniones orgánicos de las familias OATP y ABC en patología, toxicología y terapia antitumoral. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Hoey, B.M., Butler, J., Swallow, A.J., 1988. Reductive activation of mitomycin C. *Biochemistry* 27, 2608-2614.
- Hofmann, A.F., 1998. Progress in idiopathic bile acid malabsorption. *Gut* 43, 738-739.
- Howarth, D.L., Hagey, L.R., Law, S.H., Ai, N., Krasowski, M.D., Ekins, S., Moore, J.T., Kollitz, E.M., Hinton, D.E., Kullman, S.W., 2010. Two farnesoid X receptor alpha isoforms in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) are differentially activated in vitro. *Aquat Toxicol* 98, 245-255.
- Huang, L., Zhao, A., Lew, J.L., Zhang, T., Hrywna, Y., Thompson, J.R., de Pedro, N., Royo, I., Blevins, R.A., Pelaez, F., Wright, S.D., Cui, J., 2003. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem* 278, 51085-51090.
- Huang, W., Ma, K., Zhang, J., Qatanani, M., Cuvillier, J., Liu, J., Dong, B., Huang, X., Moore, D.D., 2006. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 312, 233-236.
- Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rupa, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., Hollis, G.F., Young, P.R., Mukherjee, R., Burn, T.C., 2002. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290, 35-43.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F., 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 350, 2335-2342.

- lhunnah, C.A., Jiang, M., Xie, W., 2011. Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochim Biophys Acta* 1812, 956-963.
- Ikemoto, S., Takahashi, M., Tsunoda, N., Maruyama, K., Itakura, H., Kawanaka, K., Tabata, I., Higuchi, M., Tange, T., Yamamoto, T.T., Ezaki, O., 1997. Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. *Am J Physiol* 273, E37-45.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., Gerard, R.D., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2005. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2, 217-225.
- Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R.T., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2006. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3920-3925.
- Ishiyama, T., Kano, J., Minami, Y., Iijima, T., Morishita, Y., Noguchi, M., 2003. Expression of HNFs and C/EBP alpha is correlated with immunocytochemical differentiation of cell lines derived from human hepatocellular carcinomas, hepatoblastomas and immortalized hepatocytes. *Cancer science* 94, 757-763.
- Izukura, M., Hashimoto, T., Gomez, G., Uchida, T., Greeley, G.H., Jr., Thompson, J.C., 1991. Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas* 6, 427-432.
- Jamieson, E.R., Lippard, S.J., 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical reviews* 99, 2467-2498.
- Jemnitz, K., Heredi-Szabo, K., Janossy, J., Ioja, E., Vereczkey, L., Krajcsi, P., 2010. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. *Drug metabolism reviews* 42, 402-436.
- Jiang, Y., Iakova, P., Jin, J., Sullivan, E., Sharin, V., Hong, I.H., Anakk, S., Mayor, A., Darlington, G., Finegold, M., Moore, D., Timchenko, N.A., 2012. FXR inhibits gankyrin in mouse livers and prevents development of liver cancer. *Hepatology*.
- Johnsson, A., Vallon-Christensson, J., Strand, C., Litman, T., Eriksen, J., 2005. Gene expression profiling in chemoresistant variants of three cell lines of different origin. *Anticancer research* 25, 2661-2668.
- Johnston, P.G., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Allegra, C.J., Danenberg, P.V., Leichman, L., 1995. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55, 1407-1412.
- Jung, D., Inagaki, T., Gerard, R.D., Dawson, P.A., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., Moschetta, A., 2007. FXR agonists and FGF15 reduce fecal bile acid excretion in a mouse model of bile acid malabsorption. *J Lipid Res* 48, 2693-2700.

- Jung, D., Podvinec, M., Meyer, U.A., Mangelsdorf, D.J., Fried, M., Meier, P.J., Kullak-Ublick, G.A., 2002. Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* 122, 1954-1966.
- Kang, H., O'Connell, J.B., Leonardi, M.J., Maggard, M.A., McGory, M.L., Ko, C.Y., 2007. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *International journal of colorectal disease* 22, 183-189.
- Kast, H.R., Goodwin, B., Tarr, P.T., Jones, S.A., Anisfeld, A.M., Stoltz, C.M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T.M., Edwards, P.A., 2002. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277, 2908-2915.
- Katz, S.A., Salem, H., 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *Journal of applied toxicology* : JAT 13, 217-224.
- Kavolius, J., Fong, Y., Blumgart, L.H., 1996. Surgical resection of metastatic liver tumors. *Surgical oncology clinics of North America* 5, 337-352.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M., 2003. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278, 9435-9440.
- Keitel, V., Kubitz, R., Haussinger, D., 2008. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* 14, 5620-5629.
- Kemper, J.K., 2011. Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta* 1812, 842-850.
- Kemper, J.K., Kim, H., Miao, J., Bhalla, S., Bae, Y., 2004. Role of an mSin3A-Swi/Snf chromatin remodeling complex in the feedback repression of bile acid biosynthesis by SHP. *Mol Cell Biol* 24, 7707-7719.
- Kemper, J.K., Xiao, Z., Ponugoti, B., Miao, J., Fang, S., Kanamaluru, D., Tsang, S., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Veenstra, T.D., 2009. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab* 10, 392-404.
- Kim, D.H., Kim, J., Lee, J.W., 2011. Requirement for MLL3 in p53 regulation of hepatic expression of small heterodimer partner and bile acid homeostasis. *Mol Endocrinol* 25, 2076-2083.
- Kim, D.H., Lee, J., Lee, B., Lee, J.W., 2009. ASCOM controls farnesoid X receptor transactivation through its associated histone H3 lysine 4 methyltransferase activity. *Mol Endocrinol* 23, 1556-1562.
- Kim, I., Ahn, S.H., Inagaki, T., Choi, M., Ito, S., Guo, G.L., Kliewer, S.A., Gonzalez, F.J., 2007a. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J Lipid Res* 48, 2664-2672.
- Kim, I., Morimura, K., Shah, Y., Yang, Q., Ward, J.M., Gonzalez, F.J., 2007b. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28, 940-946.

- Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Kuribayashi, H., Miyata, M., Yamakawa, H., Yoshinari, K., Yamazoe, Y., 2012. Enterobacteria-mediated deconjugation of taurocholic acid enhances ileal farnesoid X receptor signaling. *European journal of pharmacology* 697, 132-138.
- Labhart, P., Morgan, G.T., 1998. Identification of novel genes encoding transcription elongation factor TFIIIS (TCEA) in vertebrates: conservation of three distinct TFIIIS isoforms in frog, mouse, and human. *Genomics* 52, 278-288.
- Laffitte, B.A., Kast, H.R., Nguyen, C.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D., Edwards, P.A., 2000. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem* 275, 10638-10647.
- Lagergren, J., Ye, W., Ekblom, A., 2001. Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology* 121, 542-547.
- Lai, E.C., Choi, T.K., Cheng, C.H., Mok, F.P., Fan, S.T., Tan, E.S., Wong, J., 1990. Doxorubicin for unresectable hepatocellular carcinoma. A prospective study on the addition of verapamil. *Cancer* 66, 1685-1687.
- Laible, M., Boonrod, K., 2009. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Landrier, J.F., Eloranta, J.J., Vavricka, S.R., Kullak-Ublick, G.A., 2006. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290, G476-485.
- Lecureur, V., Sun, D., Hargrove, P., Schuetz, E.G., Kim, R.B., Lan, L.B., Schuetz, J.D., 2000. Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 57, 24-35.
- Lee, F.Y., de Aguiar Vallim, T.Q., Chong, H.K., Zhang, Y., Liu, Y., Jones, S.A., Osborne, T.F., Edwards, P.A., 2010. Activation of the farnesoid X receptor provides protection against acetaminophen-induced hepatic toxicity. *Mol Endocrinol* 24, 1626-1636.
- Lee, F.Y., Kast-Woelbern, H.R., Chang, J., Luo, G., Jones, S.A., Fishbein, M.C., Edwards, P.A., 2005. Alpha-crystallin is a target gene of the farnesoid X-activated receptor in human livers. *J Biol Chem* 280, 31792-31800.
- Lee, H., Zhang, Y., Lee, F.Y., Nelson, S.F., Gonzalez, F.J., Edwards, P.A., 2006. FXR regulates organic solute transporters alpha and beta in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J Lipid Res* 47, 201-214.
- Lee, J., Seok, S., Yu, P., Kim, K., Smith, Z., Rivas-Astroza, M., Zhong, S., Kemper, J.K., 2012. Genomic analysis of hepatic farnesoid X receptor binding sites reveals altered binding in obesity and direct gene repression by farnesoid X receptor in mice. *Hepatology* 56, 108-117.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Staels, B., 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89, 147-191.

- Lew, J.L., Zhao, A., Yu, J., Huang, L., De Pedro, N., Pelaez, F., Wright, S.D., Cui, J., 2004. The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem* 279, 8856-8861.
- Lian, F., Xing, X., Yuan, G., Schafer, C., Rauser, S., Walch, A., Rocken, C., Ebeling, M., Wright, M.B., Schmid, R.M., Ebert, M.P., Burgermeister, E., 2011. Farnesoid X receptor protects human and murine gastric epithelial cells against inflammation-induced damage. *Biochem J* 438, 315-323.
- Liedtke, C., Lambertz, D., Schnepel, N., Trautwein, C., 2007. Molecular mechanism of Mitomycin C-dependent caspase-8 regulation: implications for apoptosis and synergism with interferon-alpha signalling. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12, 2259-2270.
- Liu, W.M., Gravett, A.M., Dalglish, A.G., 2011. The antimalarial agent artesunate possesses anticancer properties that can be enhanced by combination strategies. *Int J Cancer* 128, 1471-1480.
- Liu, Y., Binz, J., Numerick, M.J., Dennis, S., Luo, G., Desai, B., MacKenzie, K.I., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., Goodwin, B., Jones, S.A., 2003. Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest* 112, 1678-1687.
- Lo Sasso, G., Petruzzelli, M., Moschetta, A., 2008. A translational view on the biliary lipid secretory network. *Biochim Biophys Acta* 1781, 79-96.
- Lou, G., Li, Y., Chen, B., Chen, M., Chen, J., Liao, R., Zhang, Y., Wang, Y., Zhou, D., 2007. Functional analysis on the 5'-flanking region of human FXR gene in HepG2 cells. *Gene* 396, 358-368.
- Love, J.D., Gooch, J.T., Benko, S., Li, C., Nagy, L., Chatterjee, V.K., Evans, R.M., Schwabe, J.W., 2002. The structural basis for the specificity of retinoid-X receptor-selective agonists: new insights into the role of helix H12. *J Biol Chem* 277, 11385-11391.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., Mangelsdorf, D.J., 2000. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6, 507-515.
- Macias, R.I., Marin, J.J., Serrano, M.A., 2009. Excretion of biliary compounds during intrauterine life. *World J Gastroenterol* 15, 817-828.
- Maglich, J.M., Caravella, J.A., Lambert, M.H., Willson, T.M., Moore, J.T., Ramamurthy, L., 2003. The first completed genome sequence from a teleost fish (*Fugu rubripes*) adds significant diversity to the nuclear receptor superfamily. *Nucleic Acids Res* 31, 4051-4058.
- Makishima, M., Lu, T.T., Xie, W., Whitfield, G.K., Domoto, H., Evans, R.M., Haussler, M.R., Mangelsdorf, D.J., 2002. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296, 1313-1316.

- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., Shan, B., 1999. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362-1365.
- Maloney, P.R., Parks, D.J., Haffner, C.D., Fivush, A.M., Chandra, G., Plunket, K.D., Creech, K.L., Moore, L.B., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Jones, S.A., Willson, T.M., 2000. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem* 43, 2971-2974.
- Mansouri, A., Ridgway, L.D., Korapati, A.L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z.H., Mills, G.B., Claret, F.X., 2003. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 278, 19245-19256.
- Maran, R.R., Thomas, A., Roth, M., Sheng, Z., Esterly, N., Pinson, D., Gao, X., Zhang, Y., Ganapathy, V., Gonzalez, F.J., Guo, G.L., 2009. Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 469-477.
- Mariadason, J.M., Arango, D., Shi, Q., Wilson, A.J., Corner, G.A., Nicholas, C., Aranes, M.J., Lesser, M., Schwartz, E.L., Augenlicht, L.H., 2003. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res* 63, 8791-8812.
- Marin, J.J., Barbero, E.R., Herrera, M.C., Tabernero, A., Monte, M.J., 1993. Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* 18, 1182-1192.
- Marin, J.J., Romero, M.R., Briz, O., 2010. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem* 17, 709-740.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87, 206-210.
- Marschall, H.U., Wagner, M., Bodin, K., Zollner, G., Fickert, P., Gumhold, J., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Sjoval, J., Trauner, M., 2006. Fxr(-/-) mice adapt to biliary obstruction by enhanced phase I detoxification and renal elimination of bile acids. *J Lipid Res* 47, 582-592.
- Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J., 1995. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 5, 69-84.
- Martinez-Becerra, P., 2010. Estudios funcionales y de expresión de proteínas transportadoras hepáticas. Implicación en la etiología de la colestasis y la resistencia a la quimioterapia antitumoral. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Martinez-Fernandez, P., Hierro, L., Jara, P., Alvarez, L., 2009. Knockdown of ATP8B1 expression leads to specific downregulation of the bile acid sensor FXR in HepG2 cells: effect of the FXR agonist GW4064. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296, G1119-1129.

- Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Itadani, H., Tanaka, K., 2002. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 298, 714-719.
- Marzolini, C., Tirona, R.G., Gervasini, G., Poonkuzhali, B., Assem, M., Lee, W., Leake, B.F., Schuetz, J.D., Schuetz, E.G., Kim, R.B., 2007. A common polymorphism in the bile acid receptor farnesoid X receptor is associated with decreased hepatic target gene expression. *Mol Endocrinol* 21, 1769-1780.
- Mencarelli, A., Renga, B., Distrutti, E., Fiorucci, S., 2009. Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 296, H272-281.
- Mendoza, M.E., Monte, M.J., Serrano, M.A., Pastor-Anglada, M., Stieger, B., Meier, P.J., Medarde, M., Marin, J.J., 2003. Physiological characteristics of allo-cholic acid. *J Lipid Res* 44, 84-92.
- Meng, X., Dong, Y., Sun, Z., 1999. Mechanism of p53 downstream effectors p21 and Gadd45 in DNA damage surveillance. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences* 42, 427-434.
- Meyer, U., Costantino, G., Macchiarulo, A., Pellicciari, R., 2005. Is antagonism of E/Z-guggulsterone at the farnesoid X receptor mediated by a noncanonical binding site? A molecular modeling study. *J Med Chem* 48, 6948-6955.
- Meyer Zu Schwabedissen, H.E., Bottcher, K., Chaudhry, A., Kroemer, H.K., Schuetz, E.G., Kim, R.B., 2010. Liver X receptor alpha and farnesoid X receptor are major transcriptional regulators of OATP1B1. *Hepatology* 52, 1797-1807.
- Mi, L.Z., Devarakonda, S., Harp, J.M., Han, Q., Pellicciari, R., Willson, T.M., Khorasanizadeh, S., Rastinejad, F., 2003. Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol Cell* 11, 1093-1100.
- Miao, J., Fang, S., Lee, J., Comstock, C., Knudsen, K.E., Kemper, J.K., 2009. Functional specificities of Brm and Brg-1 Swi/Snf ATPases in the feedback regulation of hepatic bile acid biosynthesis. *Mol Cell Biol* 29, 6170-6181.
- Modica, S., Bellafante, E., Moschetta, A., 2009. Master regulation of bile acid and xenobiotic metabolism via the FXR, PXR and CAR trio. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 14, 4719-4745.
- Modica, S., Gadaleta, R.M., Moschetta, A., 2010. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nuclear receptor signaling* 8, e005.
- Modica, S., Murzilli, S., Salvatore, L., Schmidt, D.R., Moschetta, A., 2008. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 68, 9589-9594.
- Monte, I., 2010. Utilización de TLDAS en la determinación de genes implicados en la quimiorresistencia del Cáncer de Colon. Trabajo de Grado. Universidad de Salamanca.
- Monte, M.J., Rosales, R., Macias, R.I., Iannota, V., Martinez-Fernandez, A., Romero, M.R., Hofmann, A.F., Marin, J.J., 2008. Cytosol-nucleus traffic and colocalization with FXR of conjugated bile acids in rat hepatocytes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 295, G54-G62.

- Moraes, M.C., de Andrade, A.Q., Carvalho, H., Guecheva, T., Agnoletto, M.H., Henriques, J.A., Sarasin, A., Stary, A., Saffi, J., Menck, C.F., 2012. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer letters* 314, 108-118.
- Moschetta, A., Bookout, A.L., Mangelsdorf, D.J., 2004. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nature medicine* 10, 1352-1358.
- Moschetta, A., Xu, F., Hagey, L.R., van Berge-Henegouwen, G.P., van Erpecum, K.J., Brouwers, J.F., Cohen, J.C., Bierman, M., Hobbs, H.H., Steinbach, J.H., Hofmann, A.F., 2005. A phylogenetic survey of biliary lipids in vertebrates. *Journal of lipid research* 46, 2221-2232.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Nakagawa, M., Setchell, K.D., 1990. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res* 31, 1089-1098.
- Neimark, E., Chen, F., Li, X., Shneider, B.L., 2004. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* 40, 149-156.
- Nelson, S.D., 1990. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Seminars in liver disease* 10, 267-278.
- Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M.F., Mao, Q., 2010. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Current drug metabolism* 11, 603-617.
- Niesor, E.J., Flach, J., Lopes-Antoni, I., Perez, A., Bentzen, C.L., 2001. The nuclear receptors FXR and LXRalpha: potential targets for the development of drugs affecting lipid metabolism and neoplastic diseases. *Curr Pharm Des* 7, 231-259.
- Nishimaki-Mogami, T., Une, M., Fujino, T., Sato, Y., Tamehiro, N., Kawahara, Y., Shudo, K., Inoue, K., 2004. Identification of intermediates in the bile acid synthetic pathway as ligands for the farnesoid X receptor. *Journal of lipid research* 45, 1538-1545.
- Niu, Q., Wang, W., Li, Y., Ruden, D.M., Wang, F., Song, J., Zheng, K., 2012. Low molecular weight heparin ablates lung cancer cisplatin-resistance by inducing proteasome-mediated ABCG2 protein degradation. *PloS one* 7, e41035.
- Noh, K., Kim, Y.M., Kim, Y.W., Kim, S.G., 2011. Farnesoid X receptor activation by chenodeoxycholic acid induces detoxifying enzymes through AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of CCAAT/enhancer binding protein beta. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 39, 1451-1459.
- Nozawa, H., 2005. Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 754-761.
- Nudler, E., 1999. Transcription elongation: structural basis and mechanisms. *Journal of molecular biology* 288, 1-12.

- O'Reilly, E.M., Stuart, K.E., Sanz-Altamira, P.M., Schwartz, G.K., Steger, C.M., Raeburn, L., Kemeny, N.E., Kelsen, D.P., Saltz, L.B., 2001. A phase II study of irinotecan in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 91, 101-105.
- Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., Hirao, A., Saya, H., Taketo, M.M., Oshima, M., 2008. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *The EMBO journal* 27, 1671-1681.
- Ohno, M., Kunimoto, M., Nishizuka, M., Osada, S., Imagawa, M., 2009. Ku proteins function as corepressors to regulate farnesoid X receptor-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 738-742.
- Otte, K., Kranz, H., Kober, I., Thompson, P., Hoefler, M., Haubold, B., Remmel, B., Voss, H., Kaiser, C., Albers, M., Cheruvallath, Z., Jackson, D., Casari, G., Koegl, M., Paabo, S., Mous, J., Kremoser, C., Deuschle, U., 2003. Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol* 23, 864-872.
- Owatari, S., Akune, S., Komatsu, M., Ikeda, R., Firth, S.D., Che, X.F., Yamamoto, M., Tsujikawa, K., Kitazono, M., Ishizawa, T., Takeuchi, T., Aikou, T., Mercer, J.F., Akiyama, S., Furukawa, T., 2007. Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer. *Cancer Res* 67, 4860-4868.
- Palmer, D.H., Hussain, S.A., Johnson, P.J., 2004. Systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 13, 1555-1568.
- Palom, Y., Suresh Kumar, G., Tang, L.Q., Paz, M.M., Musser, S.M., Rockwell, S., Tomasz, M., 2002. Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C. *Chemical research in toxicology* 15, 1398-1406.
- Park, J.G., Lee, S.K., Hong, I.G., Kim, H.S., Lim, K.H., Choe, K.J., Kim, W.H., Kim, Y.I., Tsuruo, T., Gottesman, M.M., 1994. MDR1 gene expression: its effect on drug resistance to doxorubicin in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 86, 700-705.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
- Parks, D.J., Blanchard, S.G., Bledsoe, R.K., Chandra, G., Consler, T.G., Kliewer, S.A., Stimmel, J.B., Willson, T.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D., Lehmann, J.M., 1999. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284, 1365-1368.
- Paumgartner, G., Beuers, U., 2002. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 36, 525-531.
- Paz, M.M., Zhang, X., Lu, J., Holmgren, A., 2012. A new mechanism of action for the anticancer drug mitomycin C: mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase. *Chemical research in toxicology* 25, 1502-1511.
- Pellicciari, R., Fiorucci, S., Camaioni, E., Clerici, C., Costantino, G., Maloney, P.R., Morelli, A., Parks, D.J., Willson, T.M., 2002. 6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem* 45, 3569-3572.

- Pellicciari, R., Gioiello, A., Costantino, G., Sadeghpour, B.M., Rizzo, G., Meyer, U., Parks, D.J., Entrena-Guadix, A., Fiorucci, S., 2006. Back door modulation of the farnesoid X receptor: design, synthesis, and biological evaluation of a series of side chain modified chenodeoxycholic acid derivatives. *J Med Chem* 49, 4208-4215.
- Peng, Z., Raufman, J.P., Xie, G., 2012. Src-Mediated Cross-Talk between Farnesoid X and Epidermal Growth Factor Receptors Inhibits Human Intestinal Cell Proliferation and Tumorigenesis. *PLoS one* 7, e48461.
- Perez, M.J., Briz, O., 2009. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 15, 1677-1689.
- Petak, I., Tillman, D.M., Houghton, J.A., 2000. p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 4432-4441.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., Olivier, M., 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* 28, 622-629.
- Pineda Torra, I., Freedman, L.P., Garabedian, M.J., 2004. Identification of DRIP205 as a coactivator for the Farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 279, 36184-36191.
- Pircher, P.C., Kitto, J.L., Petrowski, M.L., Tangirala, R.K., Bischoff, E.D., Schulman, I.G., Westin, S.K., 2003. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem* 278, 27703-27711.
- Pompili, M., Francica, G., Rapaccini, G.L., 2008. Bridge treatments of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients submitted to liver transplantation. *Digestive diseases and sciences* 53, 2830-2831.
- Popescu, I.R., Helleboid-Chapman, A., Lucas, A., Vandewalle, B., Dumont, J., Bouchaert, E., Derudas, B., Kerr-Conte, J., Caron, S., Pattou, F., Staels, B., 2010. The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett* 584, 2845-2851.
- Pors, K., Patterson, L.H., 2005. DNA mismatch repair deficiency, resistance to cancer chemotherapy and the development of hypersensitive agents. *Current topics in medicinal chemistry* 5, 1133-1149.
- Portincasa, P., Di Ciaula, A., Wang, H.H., Moschetta, A., Wang, D.Q., 2009. Medicinal treatments of cholesterol gallstones: old, current and new perspectives. *Curr Med Chem* 16, 1531-1542.
- Portincasa, P., Moschetta, A., Palasciano, G., 2006. Cholesterol gallstone disease. *Lancet* 368, 230-239.
- Poupon, R., 2012. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 36 Suppl 1, S3-12.

- Powell, S.M., Petersen, G.M., Krush, A.J., Booker, S., Jen, J., Giardiello, F.M., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1993. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *The New England journal of medicine* 329, 1982-1987.
- Qadri, I., Iwahashi, M., Kullak-Ublick, G.A., Simon, F.R., 2006. Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 mediate hepatic multidrug resistance protein 2 up-regulation during hepatitis C virus gene expression. *Mol Pharmacol* 70, 627-636.
- Quist, R.G., Ton-Nu, H.T., Lillienau, J., Hofmann, A.F., Barrett, K.E., 1991. Activation of mast cells by bile acids. *Gastroenterology* 101, 446-456.
- Reddy, B.S., Hedges, A.R., Laakso, K., Wynder, E.L., 1978. Metabolic epidemiology of large bowel cancer: fecal bulk and constituents of high-risk North American and low-risk Finnish population. *Cancer* 42, 2832-2838.
- Renga, B., Mencarelli, A., Vavassori, P., Brancaleone, V., Fiorucci, S., 2010. The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochim Biophys Acta* 1802, 363-372.
- Renga, B., Migliorati, M., Mencarelli, A., Fiorucci, S., 2009. Reciprocal regulation of the bile acid-activated receptor FXR and the interferon-gamma-STAT-1 pathway in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1792, 564-573.
- Ricketts, M.L., Boekschoten, M.V., Kreeft, A.J., Hooiveld, G.J., Moen, C.J., Muller, M., Frants, R.R., Kananmoolib, S., Post, S.M., Princen, H.M., Porter, J.G., Katan, M.B., Hofker, M.H., Moore, D.D., 2007. The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane X receptors. *Mol Endocrinol* 21, 1603-1616.
- Ridlon, J.M., Kang, D.J., Hylemon, P.B., 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research* 47, 241-259.
- Rigalli, J.P., Ruiz, M.L., Perdomo, V.G., Villanueva, S.S., Mottino, A.D., Catania, V.A., 2011. Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells. *Toxicology* 285, 18-24.
- Rizzo, G., Renga, B., Antonelli, E., Passeri, D., Pellicciari, R., Fiorucci, S., 2005. The methyl transferase PRMT1 functions as co-activator of farnesoid X receptor (FXR)/9-cis retinoid X receptor and regulates transcription of FXR responsive genes. *Molecular pharmacology* 68, 551-558.
- Robertson, J.H., Sarkar, S., Yang, S.Y., Seifalian, A.M., Winslet, M.C., 2008. In vivo models for early development of colorectal liver metastasis. *International journal of experimental pathology* 89, 1-12.
- Roger, L., St Pyrek, J., Little, J.M., Adcock, E.W., 1983. What is meant by the term "bile acid"? *Am J Physiol* 244, G107-110.
- Rosales, R., Romero, M.R., Vaquero, J., Monte, M.J., Requena, P., Martinez-Augustin, O., Medina, F.S., Marin, J.J., 2013. FXR-dependent and -independent interaction of glucocorticoids with the regulatory pathways involved in the control of bile acid handling by the liver. *Biochem Pharmacol*.

- Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Pelli, M.A., Morozzi, G., 2008. Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur J Nutr* 47, 301-309.
- Rudic, J.S., Poropat, G., Krstic, M.N., Bjelakovic, G., Glud, C., 2012. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev* 12, CD000551.
- Russell, D.W., 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry* 72, 137-174.
- Salonga, D., Danenberg, K.D., Johnson, M., Metzger, R., Groshen, S., Tsao-Wei, D.D., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Leichman, L., Diasio, R.B., Danenberg, P.V., 2000. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 1322-1327.
- Sanyal, A.J., Hirsch, J.I., Moore, E.W., 1990. Premicellar taurocholate avidly binds ferrous (Fe⁺⁺) iron: a potential physiologic role for bile salts in iron absorption. *J Lab Clin Med* 116, 76-86.
- Sanyal, S., Bavner, A., Haroniti, A., Nilsson, L.M., Lundasen, T., Rehnmark, S., Witt, M.R., Einarsson, C., Talianidis, I., Gustafsson, J.A., Treuter, E., 2007. Involvement of corepressor complex subunit GPS2 in transcriptional pathways governing human bile acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15665-15670.
- Schote, A.B., Turner, J.D., Schiltz, J., Muller, C.P., 2007. Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations. *Mol Immunol* 44, 1436-1445.
- Schwartz, E.L., Baptiste, N., Wadler, S., Makower, D., 1995. Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil. *J Biol Chem* 270, 19073-19077.
- Seol, W., Choi, H.S., Moore, D.D., 1995. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* 9, 72-85.
- Setchell, K.D., Lawson, A.M., Tanida, N., Sjovall, J., 1983. General methods for the analysis of metabolic profiles of bile acids and related compounds in feces. *Journal of lipid research* 24, 1085-1100.
- Shaul, Y., 2000. c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell death and differentiation* 7, 10-16.
- Shibata, M., Morizane, T., Uchida, T., Yamagami, T., Onozuka, Y., Nakano, M., Mitamura, K., Ueno, Y., 1998. Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis-C-virus infection. *Lancet* 351, 1773-1777.
- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., van Roon, M.A., et al., 1993. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75, 451-462.
- Song, C.S., Echchgadda, I., Baek, B.S., Ahn, S.C., Oh, T., Roy, A.K., Chatterjee, B., 2001. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 276, 42549-42556.

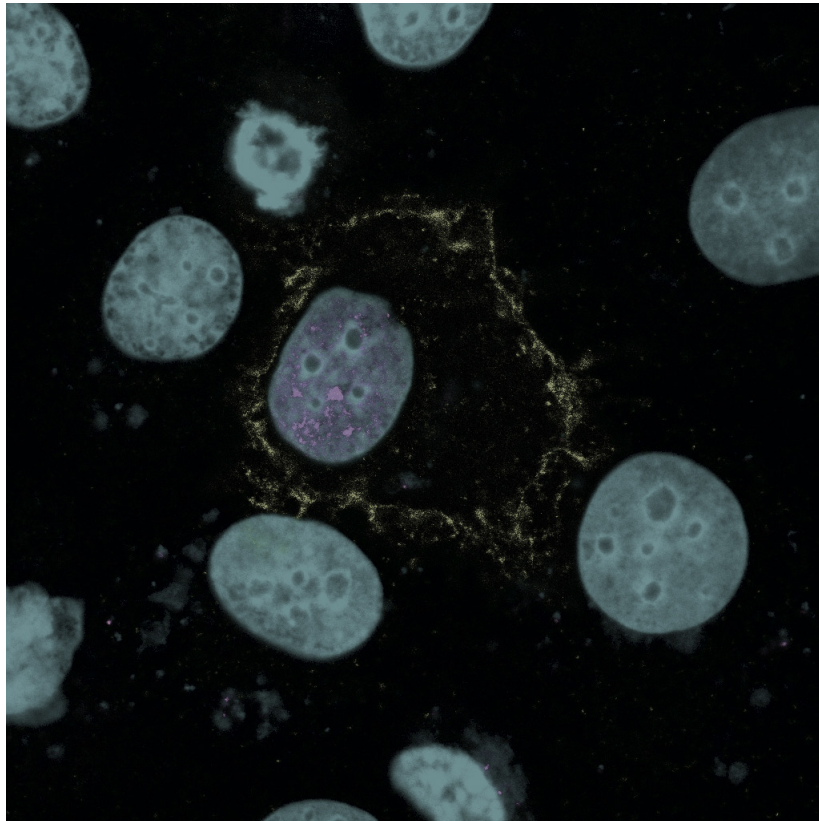
- Spencer, D.M., Bilardi, R.A., Koch, T.H., Post, G.C., Nafie, J.W., Kimura, K., Cutts, S.M., Phillips, D.R., 2008. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation research* 638, 110-121.
- Starkel, P., Shindano, T., Horsmans, Y., Gigot, J.F., Fernandez-Tagarro, M., Marin, J.J., Monte, M.J., 2009. Foetal 'flat' bile acids reappear during human liver regeneration after surgery. *European journal of clinical investigation* 39, 58-64.
- Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., Willson, T.M., Koller, B.H., Kliewer, S.A., 2001. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3369-3374.
- Stedman, C., Liddle, C., Coulter, S., Sonoda, J., Alvarez, J.G., Evans, R.M., Downes, M., 2006. Benefit of farnesoid X receptor inhibition in obstructive cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11323-11328.
- Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N.B., Gardiner, R.M., Thompson, R.J., 1998. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature genetics* 20, 233-238.
- Suino, K., Peng, L., Reynolds, R., Li, Y., Cha, J.Y., Repa, J.J., Kliewer, S.A., Xu, H.E., 2004. The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization. *Mol Cell* 16, 893-905.
- Suzuki, K., Matsubara, H., 2011. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 978312.
- Svoboda, M., Wlcek, K., Taferner, B., Hering, S., Stieger, B., Tong, D., Zeillinger, R., Thalhammer, T., Jager, W., 2011. Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 in ovarian cancer cells: relevance for paclitaxel transport. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedicine & pharmacotherapie* 65, 417-426.
- Swales, K.E., Korbonits, M., Carpenter, R., Walsh, D.T., Warner, T.D., Bishop-Bailey, D., 2006. The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression. *Cancer Res* 66, 10120-10126.
- Taira, Y., Kubo, T., Natori, S., 1998. Molecular cloning of cDNA and tissue-specific expression of the gene for SII-K1, a novel transcription elongation factor SII. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 3, 289-296.
- Thomas, A.M., Hart, S.N., Kong, B., Fang, J., Zhong, X.B., Guo, G.L., 2010. Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology* 51, 1410-1419.
- Thornborrow, E.C., Patel, S., Mastropietro, A.E., Schwartzfarb, E.M., Manfredi, J.J., 2002. A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes. *Oncogene* 21, 990-999.

- To, K.K., Yu, L., Liu, S., Fu, J., Cho, C.H., 2012. Constitutive AhR activation leads to concomitant ABCG2-mediated multidrug resistance in cisplatin-resistant esophageal carcinoma cells. *Molecular carcinogenesis* 51, 449-464.
- Tomasz, M., 1995. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & biology* 2, 575-579.
- Tomasz, M., Palom, Y., 1997. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacology & therapeutics* 76, 73-87.
- Tornaletti, S., Patrick, S.M., Turchi, J.J., Hanawalt, P.C., 2003. Behavior of T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II at site-specific cisplatin adducts in the template DNA. *J Biol Chem* 278, 35791-35797.
- Trauner, M., Boyer, J.L., 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83, 633-671.
- Turchi, J.J., Henkels, K., 1996. Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 13861-13867.
- Ueno, Y., Moriyama, M., Uchida, T., Arakawa, Y., 2001. Irregular regeneration of hepatocytes is an important factor in the hepatocarcinogenesis of liver disease. *Hepatology* 33, 357-362.
- Umehara, T., Kida, S., Yamamoto, T., Horikoshi, M., 1995. Isolation and characterization of a cDNA encoding a new type of human transcription elongation factor S-II. *Gene* 167, 297-302.
- Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S., 2005. TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 933-938.
- Urizar, N.L., Liverman, A.B., Dodds, D.T., Silva, F.V., Ordentlich, P., Yan, Y., Gonzalez, F.J., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Moore, D.D., 2002. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. *Science* 296, 1703-1706.
- Urizar, N.L., Moore, D.D., 2003. GUGULIPID: a natural cholesterol-lowering agent. *Annu Rev Nutr* 23, 303-313.
- Van Mil, S.W., Milona, A., Dixon, P.H., Mullenbach, R., Geenes, V.L., Chambers, J., Shevchuk, V., Moore, G.E., Lammert, F., Glantz, A.G., Mattsson, L.A., Whittaker, J., Parker, M.G., White, R., Williamson, C., 2007. Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* 133, 507-516.
- Vaquero, J., 2007. Desarrollo de un modelo experimental para la evaluación in vitro de la captación hepática por oatp1b1 de fármacos antivirales y de su actividad frente al virus de la hepatitis C. Universidad de Salamanca.
- Vavassori, P., Mencarelli, A., Renga, B., Distrutti, E., Fiorucci, S., 2009. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol* 183, 6251-6261.

- Wallace, S.L., 1974. Colchicine. *Seminars in arthritis and rheumatism* 3, 369-381.
- Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L.C., Forman, B.M., 1999a. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 3, 543-553.
- Wang, L.G., Liu, X.M., Kreis, W., Budman, D.R., 1999b. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 44, 355-361.
- Wang, Q., Wu, L.M., Zhao, Y., Zhang, X.L., Wang, N.P., 2002. [The anticancer effect of artesunate and its mechanism]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 37, 477-478.
- Wang, Y., Chen, Q., Jin, S., Deng, W., Li, S., Tong, Q., Chen, Y., 2012. Up-regulation of P-glycoprotein is involved in the increased paclitaxel resistance in human esophageal cancer radioresistant cells. *Scandinavian journal of gastroenterology* 47, 802-808.
- Watanuki, A., Ohwada, S., Fukusato, T., Makita, F., Yamada, T., Kikuchi, A., Morishita, Y., 2002. Prognostic significance of DNA topoisomerase II α expression in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer research* 22, 1113-1119.
- Weller, M., 1998. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell and tissue research* 292, 435-445.
- Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R.A., Schwartz, B., Simantov, R., Kelley, S., 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 835-844.
- Williams, J.A., Thomas, A.M., Li, G., Kong, B., Zhan, L., Inaba, Y., Xie, W., Ding, W.X., Guo, G.L., 2012. Tissue specific induction of p62/Sqstm1 by farnesoid X receptor. *PLoS one* 7, e43961.
- Willson, T.M., Jones, S.A., Moore, J.T., Kliewer, S.A., 2001. Chemical genomics: functional analysis of orphan nuclear receptors in the regulation of bile acid metabolism. *Medicinal research reviews* 21, 513-522.
- Wind, M., Reines, D., 2000. Transcription elongation factor SII. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22, 327-336.
- Wise, S.S., Holmes, A.L., Wise, J.P., Sr., 2008. Hexavalent chromium-induced DNA damage and repair mechanisms. *Reviews on environmental health* 23, 39-57.
- Witmer, C., Faria, E., Park, H.S., Sadrieh, N., Yurkow, E., O'Connell, S., Sirak, A., Schleyer, H., 1994. In vivo effects of chromium. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 3, 169-176.
- Wu, J., Xia, C., Meier, J., Li, S., Hu, X., Lala, D.S., 2002. The hypolipidemic natural product guggulsterone acts as an antagonist of the bile acid receptor. *Mol Endocrinol* 16, 1590-1597.
- Xu, Q., Nakanishi, T., Sekimizu, K., Natori, S., 1994. Cloning and identification of testis-specific transcription elongation factor S-II. *J Biol Chem* 269, 3100-3103.
- Yang, F., Huang, X., Yi, T., Yen, Y., Moore, D.D., Huang, W., 2007. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* 67, 863-867.

- Ye, L., Liu, S., Wang, M., Shao, Y., Ding, M., 2007. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 860, 10-17.
- Yonezawa, A., Masuda, S., Yokoo, S., Katsura, T., Inui, K., 2006. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther* 319, 879-886.
- Yu, J., Lo, J.L., Huang, L., Zhao, A., Metzger, E., Adams, A., Meinke, P.T., Wright, S.D., Cui, J., 2002. Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J Biol Chem* 277, 31441-31447.
- Zavacki, A.M., Lehmann, J.M., Seol, W., Willson, T.M., Kliewer, S.A., Moore, D.D., 1997. Activation of the orphan receptor RIP14 by retinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7909-7914.
- Zecevic, A., Hagan, E., Reynolds, M., Poage, G., Johnston, T., Zhitkovich, A., 2010. XPA impacts formation but not proteasome-sensitive repair of DNA-protein cross-links induced by chromate. *Mutagenesis* 25, 381-388.
- Zecevic, A., Menard, H., Gurel, V., Hagan, E., DeCaro, R., Zhitkovich, A., 2009. WRN helicase promotes repair of DNA double-strand breaks caused by aberrant mismatch repair of chromium-DNA adducts. *Cell Cycle* 8, 2769-2778.
- Zeman, S.M., Phillips, D.R., Crothers, D.M., 1998. Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11561-11565.
- Zhan, Q., Kontny, U., Iglesias, M., Alamo, I., Jr., Yu, K., Hollander, M.C., Woodworth, C.D., Fornace, A.J., Jr., 1999. Inhibitory effect of Bcl-2 on p53-mediated transactivation following genotoxic stress. *Oncogene* 18, 297-304.
- Zhang, L., Li, T., Yu, D., Forman, B.M., Huang, W., 2012. FXR protects lung from lipopolysaccharide-induced acute injury. *Mol Endocrinol* 26, 27-36.
- Zhang, M., Chiang, J.Y., 2001. Transcriptional regulation of the human sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 α in mediating bile acid repression. *J Biol Chem* 276, 41690-41699.
- Zhang, Y., Castellani, L.W., Sinal, C.J., Gonzalez, F.J., Edwards, P.A., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α (PGC-1 α) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* 18, 157-169.
- Zhang, Y., Edwards, P.A., 2008. FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett* 582, 10-18.
- Zhang, Y., Kast-Woelbern, H.R., Edwards, P.A., 2003. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem* 278, 104-110.
- Zimmerman, M.A., Ghobrial, R.M., Tong, M.J., Hiatt, J.R., Cameron, A.M., Hong, J., Busuttill, R.W., 2008. Recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation: a review of preoperative and postoperative prognostic indicators. *Arch Surg* 143, 182-188; discussion 188.

Zollner, G., Marschall, H.U., Wagner, M., Trauner, M., 2006. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Molecular pharmaceutics* 3, 231-251.



*“All truths are easy to understand once they are discovered;
the point is to discover them”*

Galileo Galilei

7. English Summary

7.1- OBJECTIVES

The finding of specific membrane receptors, such as TGR5, and nuclear receptors, such as “Farnesoid X Receptor” (FXR), able to respond to the activation by bile acids has led to reconsider the physiological role of these steroids not only as digestive detergents but also as signaling molecules involved in the control of several aspects of metabolism.

In animal species with different degree of evolution, from bony fish to mammals, the expression of FXR orthologs and the presence of different transcripts of these genes have been described. More precisely, in humans there are four FXR isoforms, whose expression pattern varies among tissues. However, the differential physiological role of these isoforms is poorly understood.

Since the discovery of its ability to respond to activation by bile acids, FXR has been considered as a specific bile acid sensor involved in the control of bile acid homeostasis. However, a role of FXR in the control of lipid and glucose metabolism has been described, and more recently, FXR has also been associated with the prevention of hepatic and intestinal carcinogenesis, liver regeneration, the barrier function of the intestine, attenuation of the adverse effects of cholestasis and the prevention of gallstone formation. To carry out some of these functions, FXR regulates the expression of genes involved in several mechanisms of chemoresistance, which implies a potential role of FXR in the handling of toxic xenobiotic compounds.

Therefore we consider as the **global objective** of this Doctoral Thesis to further study the role of FXR signaling pathway and the isoforms of this nuclear receptor in the mechanisms of regulation of genes involved in the development of chemoresistance. To achieve this goal the project was divided into the following partial objectives:

First objective: To characterize several physiological aspects of the four human FXR isoforms, such as their expression in tissues exposed to major ABs, their subcellular localization, their response to agonists and the phenotypic consequences of their activation.

Second objective: To investigate the effect of variations in the steroid nucleus and in the state of side chain conjugation with glycine or taurine on the ability of different molecular species of BAs to behave as agonists of the different FXR isoforms.

Third objective: To analyze the role in liver and intestinal cells of FXR and its signaling pathway in the activation of defense mechanisms against the toxicity of different endogenous and xenobiotic agents.

Fourth objective: To investigate the role of FXR and its isoforms in the high chemoresistance which is characteristic of liver and intestinal tumors of epithelial origin.

7.2- RESULTS

7.2.1- Functional characteristics and physiological importance of FXR isoforms

The discovery that bile acids (BAs) reach the nucleus of liver cells, where they are localized in regions of high rate of transcription (Monte et al., 2008), and that they are able of interacting with several nuclear and membrane receptors, has led to the recognition that these steroids are not merely detergent molecules necessary in the digestive process of dietary fats, but they contribute as signaling molecules in the control of lipid and glucose metabolism (Claudel et al., 2005).

The most important receptor of these molecules is the FXR nuclear receptor, which is expressed primarily in liver and intestine, but also in other tissues (Huber et al., 2002). When activated, FXR triggers several mechanisms leading to changes in the expression of genes involved in the transport and metabolism of cholesterol and BAs. Moreover, new and surprising functions for this receptor have been described in the past recent years, such as its role in atherosclerosis (Mencarelli et al., 2009) and in the release of insulin by the beta cells of the pancreatic islets (Renga et al., 2009). Thus, further investigation of FXR functions is necessary in order to develop new therapies that might be useful in the treatment of several illnesses related to lipid and glucose metabolism, such as cholestasis, atherosclerosis or diabetes mellitus.

The presence of different isoforms of this nuclear receptor is not a recent event in evolutionary terms, as evidenced by the appearance of two isoforms with different amino-terminal ends in *Oryzias latipes* (Howarth et al., 2010), a teleost fish. The presence of several isoforms of FXR has been also described in pig (Gray et al., 2010), hamster, rat, mouse (Zhang et al., 2003) and humans (Huber et al., 2002). In humans, FXR is expressed as four isoforms with relative tissue/cell specificity (Huber et al., 2002). Up to now, these isoforms have been classified using inconsistent nomenclatures. Here we have termed them as FXR α 1(+), FXR α 1(-), FXR α 2(+) and FXR α 2(-) according to their difference in the initial region (exons 1–3) of mRNA (α 1 and α 2) resulting in different initial amino acid sequences and the presence (+) or absence (-) of a 12 base pair insert (amino acid sequence: MYTG) at the end of exon 5. Despite the fact that they have been described in different organisms, the functional differences of FXR isoforms are poorly understood.

Thus, the aim of this part of the study was to investigate different aspects of the physiological role of FXR isoforms, such as their differential expression in tissues involved in BA handling, their subcellular localization, their ability to be activated by different molecular species of BAs and their specific role in the biological functions regulated by this nuclear receptor.

The results obtained in this section of the Doctoral Thesis have been used to write the following manuscript entitled: "Characterization of the tissue and subcellular distribution, and differential sensitivity to activation by bile acid species of human FXR isoforms"; which is not yet published.

Claudiel, T., Staels, B., Kuipers, F., 2005. The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 2020-2030.

Gray, M.A., Pollock, C.B., Schook, L.B., Squires, E.J., 2010. Characterization of porcine pregnane X receptor, farnesoid X receptor and their splice variants. *Exp Biol Med (Maywood)* 235, 718-736.

Howarth, D.L., Hagey, L.R., Law, S.H., Ai, N., Krasowski, M.D., Ekins, S., Moore, J.T., Kollitz, E.M., Hinton, D.E., Kullman, S.W., 2010. Two farnesoid X receptor alpha isoforms in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) are differentially activated in vitro. *Aquat Toxicol* 98, 245-255.

Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rupa, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., Hollis, G.F., Young, P.R., Mukherjee, R., Burn, T.C., 2002. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290, 35-43.

Mencarelli, A., Renga, B., Distrutti, E., Fiorucci, S., 2009. Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 296, H272-281.

Monte, M.J., Rosales, R., Macias, R.I., Iannota, V., Martinez-Fernandez, A., Romero, M.R., Hofmann, A.F., Marin, J.J., 2008. Cytosol-nucleus traffic and colocalization with FXR of conjugated bile acids in rat hepatocytes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 295, G54-G62.

Renga, B., Migliorati, M., Mencarelli, A., Fiorucci, S., 2009. Reciprocal regulation of the bile acid-activated receptor FXR and the interferon-gamma-STAT-1 pathway in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1792, 564-573.

Zhang, Y., Kast-Woelbern, H.R., Edwards, P.A., 2003. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem* 278, 104-110.

Characterization of the tissue and subcellular distribution, and differential sensitivity to activation by bile acid species of human FXR isoforms

J. Vaquero¹, M.J. Monte^{1,2}, J. Muntané³, J.J.G. Marin^{1,2}

(¹) Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain.

(²) National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Spain.

(³) Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), University Hospital Virgen del Rocío, CSIC, University of Seville, Seville, Spain.

Short Title: Differential properties of FXR isoforms

Key Words: Glycoconjugated bile acids; Tauroconjugated bile acids; Ileum; Liver; Nuclear receptor; Isoforms

Contact Information:

Jose J. G. Marin
Department of Physiology and Pharmacology
University of Salamanca
Campus Miguel de Unamuno E.I.D. S-09
37007-Salamanca, Spain
Telephone: +34-923-294674
Fax: +34-923-294669
E-mail: jjgmarin@usal.es

Abbreviations:

Bile Acid (BA), CDCA (chenodeoxycholic), GCDCA (glycochenodeoxycholic), TCDCA (taurochenodeoxycholic), deoxycholic acid (DCA), cholic acid (CA), ursodeoxycholic acid (UDCA), lithocholic acid (LCA) and allo-cholic acid (ACA), BSEP (Bile Salt Export Pump), SHP (Small Heterodimer Partner), OST (Organic Solute Transporter), FGF (Fibroblast Growth Factor), IBABP (Ileal Bile Acid Binding Protein), FXR (Farnesoid X Receptor), RXR (Retinoid X Receptor), OATP (Organic Anion Transporter Polipeptide).

Financial Support:

This study was supported in part by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant SAF2010-15517); the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grant PI11/0337) and the Junta de Castilla y Leon (Grants SA023A11-2, SA070A11-2 and Biomedicina-2011), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant BFU2007-30688-E/BFI) and belongs to the CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas), Instituto de Salud Carlos III, Spain. Javier Vaquero is recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educacion, Spain (grant AP2007–00105).

Conflict of Interest

The authors do not have any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the work submitted that could inappropriately influence their work.

Acknowledgements

The authors thank revision of the English spelling, grammar and style of the manuscript by N. Skinner.

ABSTRACT

The farnesoid X receptor (FXR) is involved in bile acid homeostasis, lipoprotein and glucose metabolism, liver regeneration, intestinal bacterial growth and the hepatic response to toxic compounds. Although four human FXR isoforms have been identified, the physiological role of this diversity is poorly understood. Here we have investigated FXR isoforms regarding their agonist sensitivity and ability to stimulate the expression of FXR target genes. Determination of FXR mRNA in tissues involved in bile acid handling revealed that liver predominantly expresses FXR α 1(+/-) isoforms, whereas FXR α 2(+/-) were the most abundant isoforms in kidney and intestine. The amount of mRNA for isoforms with (+) or without (-) 12 bp insert was approximately 50% in all cases. Different isoform-dependent magnitude of the up-regulation of FXR target genes in response to either GW4064 or bile acids was found in hepatic and intestinal cells transfected with FXR isoforms. FXR α 1(-) was the isoform with strongest activity in all cell types. Marked differences among bile acids species regarding their ability to activate FXR were found. This differential sensitivity was similar for all FXR isoforms. Human hepatocytes and cells lines with endogenous expression of FXR were able to respond to conjugated and unconjugated bile acids. In contrast, in FXR-deficient cells that were transfected with this nuclear receptor conjugation abolished the ability of bile acids to activate FXR. These results indicate that tissue-specific patterns of FXR isoforms do not determine the overall sensitivity to FXR agonists, although it may differentially affect the change in the expression of different FXR target genes. Moreover, they suggest that conjugated BAs may require some extra components of the cell machinery to exert their effects on FXR activation, which could be lost by dedifferentiation of tumor cells.

1. INTRODUCTION

Bile acids (BAs) are amphipathic molecules with a steroid backbone that are synthesized from cholesterol exclusively in hepatocytes. These compounds are secreted into bile and secreted into the intestinal lumen upon ingestion of a meal to facilitate the digestion and absorption from the small intestine of dietary lipids and fat-soluble vitamins. Traditionally, BA research focused mainly on the specific physicochemical characteristics of these detergents, which are determined by the number and the orientation of the substituents on the steroid nucleus, and influenced by the conjugation profile. However, in late 90s these compounds were identified as the natural ligands of the farnesoid X receptor (FXR, gen symbol *NR1H4*) [1-3].

A few years later, four transcripts from the human gene *NR1H4*, which codify four different isoforms of FXR, were identified [4]. Up to now, these isoforms have been classified using inconsistent nomenclatures. We have termed them as FXR α 1(+), FXR α 1(-), FXR α 2(+) and FXR α 2(-) according to their difference in the start point of mRNA transcription, i.e., exons 1 or 3 for FXR α 1 and FXR α 2 isoforms, respectively, resulting in different initial amino acid sequence, and the presence (+) or absence (-) of a 12 base pair insert (amino acid sequence: MYTG) at the end of exon 5. The expression of FXR has been reported at high levels in the liver, intestine, kidney, and adrenal glands [4]. In the same study, differential expression of isoforms FXR α 1 and FXR α 2 was reported among these tissues. Nevertheless, there are no data about the expression of FXR(+)/FXR(-) isoforms in most human tissues and cell lines.

To activate the transcription of its target genes, FXR heterodimerizes with the retinoid X receptor α (RXR α) and, upon activation by specific agonists, binds to FXR response elements (FXREs), mainly IR-1 (inverted repeats separated by 1 nucleotide) [5]. Among these targets are encompassed most of the proteins involved in BA metabolism and transport. However, additional target genes have been recently described as involved in FXR-mediated response in several unexpected biological functions such as prevention of hepatic and intestinal carcinogenesis [6, 7], liver regeneration [8], barrier function of the intestine [9], attenuation of adverse effects of cholestasis [10], prevention of gallstone formation [11], and chemoprotection of intestinal cells [12].

The discovery that BAs can bind and activate FXR uncovered a new set of functions of these compounds. The earliest reports on FXR binding properties of different molecular species of BAs [1-3], were carried out on experimental models that mixed rodent and human FXR forms, together with cell lines and reporter genes from different species. Afterwards, there have been few new studies concerning ligand properties of BAs. In

particular, a recent study established a new role for conjugation on the ability of BAs to activate ileal FXR in mice [13]. Moreover, despite the clear differences in the expression of FXR isoforms among tissues, their functional differences and significance are poorly understood, even under physiological circumstances.

Accordingly, the aim of this study was to analyze the expression of FXR isoforms in human tissues involved in BA handling and elucidate whether there are differences in the functionality of these isoforms regarding their sensitivity to the synthetic FXR agonist GW4064 and the different molecular species of their endogenous agonists, i.e., BAs.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

Allo-cholic acid was synthesized previously in our laboratory [14]. Other bile acids (BAs) used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). GW4064 was obtained from Santa Cruz (Heidelberg, Germany). According to the suppliers, the purity of these compounds was $\geq 97\%$. All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Cloning

FXR $\alpha 1(-/+)$ isoforms (transcription start point at exon 1), FXR $\alpha 2(-/+)$ isoforms (transcription start point at exon 3) [4] and RXR α , were cloned by Gateway® technology. The coding sequences were amplified by PCR from DNA obtained from HepG2 cells (FXR $\alpha 1(-/+)$), human liver (FXR $\alpha 2(-/+)$) or Jeg-3 cells (RXR α) using the high fidelity AccuPrime Pfx DNA polymerase and gene specific primers containing attB adapters (Supplementary Table 1). The attB-flanked PCR products were cloned into a pGEMT Easy vector (Promega, Madrid, Spain) and used to separate isoforms (FXR $\alpha(-)$ and FXR $\alpha(+)$) by using home-made site-directed mutagenesis of the whole plasmid [15]. pGEMT-FXR vectors were then recombined with the attP-containing pDONR207 vector (Invitrogen) to generate entry plasmids, which were further recombined with the pcDNA6.2-V5 destination vector (Invitrogen), to generate the expression vectors. The pGL4.28[Luc2CP]/IR-1 plasmid was cloned as previously described [16]. The exact nucleotide sequence of all constructs was confirmed by gel-electrophoresis-based sequencing.

2.3. Cell cultures

Caco-2 (HTB-37), COLO 205 (CCL-222) and LS 174T (CL-188) cell lines, derived from human colorectal adenocarcinoma, HepG2 cells (HB-8065), from human hepatoblastoma, Alexander cells (PLC/PRF/5, CRL-8024), from human hepatoma, SK-Hep-1 cells (HTB-52) from hepatocarcinoma, JAr (HTB-144) and Jeg-3 (HTB-36) cell lines, from human choriocarcinoma, HEK-293 (CLR-1573) and HK-2 (CRL-2190) cell lines, from human kidney, K562 cells (CCL-243), from human chronic myeloid leukemia, and CHO-K1 (CCL-61), from Chinese hamster ovary, were purchased from the ATCC by way of LGC Standards (Barcelona, Spain). BeWo cells (86082803), from human choriocarcinoma, and COR-L23 cells (92031919) from human large-cell lung carcinoma, were purchased from the ECACC (Health Protection Agency, Salisbury, UK). EGI-1 (ACC-385) and TFK-1 (ACC-344) cell lines from human cholangiocarcinoma were purchased from the DSMZ (Braunschweig, Germany). HuH-

7 cells, from human hepatocarcinoma, were kindly provided by Dr. Pedro Majano (University Hospital La Princesa, Madrid, Spain). HuH-28 cells, from human cholangiocarcinoma, were kindly provided by Dr. Juan Francisco Medina (University of Navarra, Pamplona, Spain). MUM2C cells from human melanoma, were kindly provided by Dr. Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque Escribano (Pfizer-University of Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Granada, Spain). CCA 10402 and CCA 10417 cell lines, from human cholangiocarcinoma, and NHC-2 cells, from human immortalized cholangiocytes, were kindly provided by Dr. Jesus Banales (Hospital de Donostia, San Sebastian, Spain). All cell lines were cultured as recommended by the supplier. Using healthy liver tissue obtained from surgical interventions for primary or secondary liver tumor resections after written consent of the patient at the Reina Sofia Hospital (Cordoba, Spain), hepatocytes were isolated and cultured as previously described [17]. The hepatocytes were treated with 100 μ M of chenodeoxycholic acid (CDCA), and its glycoconjugated (GCDCA) and tauroconjugated (TCDCA) forms, for 24 h before determining gene expression and BA content.

2.4. Cell transfection assays

Transient transfection of Alexander, Caco-2 and LS 174T cells was carried out with Lipofectamine LTX and PLUS reagents (Invitrogen). Cells were transfected with plasmids containing FXR isoforms and RXR α , or an empty vector (mock), alone or in combination with a plasmid containing OATP1B1 followed by the V5 epitope. In luciferase assays an extra plasmid containing an IR-1 response element upstream of a minimal promoter (minPr) and the destabilized firefly luciferase (*luc2CP*) gene was transfected (pGL4.28[Luc2CP]/IR-1). 48 h after transfection, cells were incubated with different concentrations of BAs, 1 μ M GW4064, or the vehicle (DMSO) during 24 h before mRNA levels, luciferase activity or the BA content, were measured.

2.5. Measurement of luciferase activity

Analysis of promoter activation was carried out by determining changes in the luciferase activity, measured with the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) in a LAS-4000 image reader (FujiFilm; TDI, Madrid, Spain). The intensity of the signal was expressed as arbitrary units of luminescence (light emission/5 min).

2.6. Western blot analyses

Cells were washed with ice-cold PBS and lysed by incubation for 30 min in ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA; 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium

deoxycholate, and 0.1% SDS dissolved in PBS) supplemented with protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Protein concentrations were determined using a modification of the Lowry method [18]. Cell lysates (100 µg protein) were boiled for 5 min. Immunoblotting analyses were carried out in SDS-PAGE gels, which were then transferred onto nitrocellulose membranes. Blots were probed with primary monoclonal antibodies against FXR (clone ab56902) from Abcam (Cambridge, United Kingdom) and α -actinin (clone MAB1682) from Chemicon International (Temecula, CA, EE.UU.). The appropriate horseradish peroxidase linked secondary antibodies were from Invitrogen. An enhanced chemiluminescence detection system (Hybond ECL; GE Healthcare) was used to visualize the bands.

2.7. Measurement of steady-state mRNA levels

Total RNA was isolated using RNeasy spin columns (GE Healthcare, Madrid, Spain), treated with RNase-free DNase I (GE Healthcare), and determined fluorimetrically with the RiboGreen RNA-Quantitation kit (Invitrogen, Barcelona, Spain). Retrotranscription (RT) was carried out using the “SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit” (Invitrogen, Barcelona, Spain). To determine the relative abundance of FXR target genes, real time quantitative PCR (QPCR) was performed using AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Madrid, Spain) in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were as follows: single cycles at 50 °C for 2 min and at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 60 s. Detection of the amplification products was carried out using SYBR Green I. The mRNA abundance of target genes in each sample was normalized on the basis of its GAPDH content. To carry out the absolute determination of the number of mRNA copies of FXR isoforms and GAPDH, each cDNA was obtained by high-fidelity RT, cloned into a pGEMT Easy vector (Promega, Madrid, Spain), and sequenced. This construct was amplified in *Escherichia coli* and used as a template to obtain by PCR, followed by gel electrophoresis, different amounts of a purified fragment to build the standard curves required for the absolute determination of mRNA by QPCR. Oligonucleotide sequences of primers for FXR target genes (Supplementary Table 2) and FXR isoforms (Supplementary Table 3) were designed with the assistance of Primer Express software (Applied Biosystems).

2.8. Protein detection by immunofluorescence

Alexander transfected cells were fixed and permeabilized in ice-cold methanol, and nonspecific binding sites were blocked by incubation with 5% fetal calf serum. Before the addition of primary antibodies, samples were washed twice with phosphate-

buffered saline. Preparations were incubated at room temperature for 1 h with the primary antibody from Invitrogen (anti-V5 against FXR-V5 or OATP1B1-V5 diluted 1:500, H130 anti-FXR diluted 1:200) and then for 1 h with a 1:1000 dilution of the appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibody, and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to stain nuclei. Fluorescence staining was visualized using a Leica TCS SP2 confocal microscope.

2.9. Bile acid analysis

Cell lysates were analyzed using an adaptation [19] of a previously described method for BA measurement by HPLC–MS/MS [20] in a 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

2.10. Statistical methods

Results were expressed as means±S.D. from at least three different cultures carried out in triplicate. To calculate the statistical significance of the differences between groups, the paired or unpaired *t*-tests or the Bonferroni method for multiple-range testing were used, as appropriate.

3. RESULTS

3.1. Expression of FXR isoforms in human tissues and cell lines

The determination of the total abundance of FXR mRNA (in copies/1000 copies of GAPDH) in human tissue samples revealed that this nuclear receptor is expressed at higher levels in ileum (9653 copies), followed by liver (4270 copies), duodenum/jejunum (1917 copies), kidney (758 copies) and colon (655 copies), whereas placenta (2 copies) has negligible expression of FXR (Figure 1A). Regarding cell lines, only HuH-7 (5728 copies) and HepG2 (3837 copies) cells, derived from hepatocarcinoma and hepatoblastoma respectively, expressed FXR at high levels, similar to those of liver (Figure 1A). CCA 10402 (1858 copies) and NHC2 (889 copies), derived from cholangiocarcinoma and healthy immortalized cholangiocytes, respectively, expressed medium levels, similar to duodenum/jejunum and kidney. Other cell lines analyzed expressed very low levels of FXR (less than 150 copies) (Figure 1A).

Analysis of FXR α 1/FXR α 2 isoforms confirmed a pronounced difference in the pattern of expression among the tissues and cell lines derived from them. Liver and hepatic cell lines expressed mostly FXR α 1, while intestine and kidney expressed the FXR α 2 isoform (Figure 1B). Interestingly, the isoform expressed by cholangiocarcinoma derived cell lines changed depending on the precedence of the cells. CCA 10402, CCA 10417, HuH-28 and NHC2 cells, from intrahepatic cholangiocytes, expressed FXR α 1, whereas EGI-1 and TFK-1, from extrahepatic cholangiocytes, expressed the FXR α 2 isoform. Surprisingly, the isoform found in HK-2 cells was the opposite of that its parent tissue, kidney (Figure 1B).

Finally, expression levels of isoforms FXR α (+)/FXR α (-) showed a proportion close to 50% of each isoform in almost all tissues and cells assayed (Figure 1C). Only COLO205 cells showed a deviation in the proportion in favor of isoforms FXR α (+) (Figure 1C).

3.2. Activation of FXR by BAs in human hepatocytes

To elucidate the role of chemical structure on the ability of BAs to activate FXR, human hepatocytes were used first because they express all the machinery necessary for FXR function, including uptake transporters for its ligands. Treatment for 24 h with 100 μ M chenodeoxycholic acid (CDCA), the most potent endogenous ligand of human FXR, and its conjugates with glycine and taurine (GCDCA and TCDCA, respectively), showed a gene-specific potency of activation of these compounds. BSEP and SHP were up-regulated at the same levels by both free and conjugated BAs (Figure 2A),

whereas OST α , OST β and TCEA2 (a recently discovered FXR target gene [21]) were induced by GCDCA and TCDCA with half the potency of CDCA (Figure 2A).

Differences in the ability to activate FXR between free and conjugated BAs have been previously observed and attributed to differences in their different uptake by the cells [3]. To investigate this question, we have measured in the same experiment both BA content of hepatocytes and mRNA of FXR target genes. Total levels of BAs were similar in cells treated with either BA species (Figure 2B), and undetectable in those treated with the vehicle (DMSO) (data not shown). However, these cells were able to conjugate most of CDCA into GCDCA and TCDCA (Figure 2B).

3.3. Activation of FXR by BAs in hepatic cell lines

Next, we wondered whether the ability of CDCA to activate the expression of FXR target genes would be enhanced in the absence of conjugation. To analyze this question, three hepatic cell lines with constitutive (HuH-7 and HepG2) and absent (Alexander) FXR expression (Figure 1) and unable to conjugate BAs were used. Preliminary experiments performed in HepG2 cells showed that uptake of free BAs was higher than that of their conjugated forms (data not shown). Thus, cells were incubated with 50 μ M CDCA and 100 μ M GCDCA or TCDCA in order to reach similar levels inside the cells regardless the BA added to the incubation medium.

In HuH-7 free and conjugated BAs activated the expression of BSEP, SHP and both OSTs with the same efficiency (Figure 3A). However, in HepG2 cells the up-regulation of SHP and both OSTs were significantly lower in cells exposed to GCDCA in comparison with CDCA and TCDCA treated cells (Figure 3B). BSEP expression was not up-regulated in any case in HepG2 cells. Interestingly, in both cell lines, TCEA2 up-regulation was significantly higher in cells incubated with TCDCA (Figure 3A-B).

Finally, experiments were performed in Alexander cells transfected with FXR α 1(-), RXR α and OATP1B1 48 h prior to their exposure to BAs for another 24 h. 48 h was the time necessary for the maximum expression and correct subcellular localization of transfected proteins (Supplementary Figure 1A-B). RXR α was transfected because of the low expression of this nuclear receptor in Alexander cells (<4% of human liver). OATP1B1 was used in this set of experiments to increase BA uptake that showed to be lower in Alexander than in HuH-7 and HepG2 cells (Supplementary Figure 1C). Surprisingly, GCDCA and TCDCA showed very low (BSEP) or no activity (SHP, OST β and TCEA2) on up-regulation of FXR target genes in these cells, whereas CDCA was able to significantly increase the expression of all target genes assayed (Figure 3C). As

OST α did not respond to FXR activation in previous experiments (data not shown), it was excluded from the analysis. Next, we determined the expression of luciferase, whose ORF was preceded by an IR-1 response element in the construct used to co-transfect the cells together with OATP1B1/FXR/RXR α . Luciferase expression was significantly stimulated in presence of the free BA, but not by its conjugated forms (Figure 3C).

HPLC-MS/MS analysis confirmed the absence of BA conjugation in these cell lines, and only the untransformed BA added to the culture was present in any case. As shown in Figure 3D, intracellular levels of both free and conjugated BAs were similar in HepG2 cells, whereas in HuH-7 cells contents of conjugated BAs were higher. GCDCA level was lower than those of CDCA and TCDCA in Alexander cells, but not enough to explain the marked differences found in mRNA expression of FXR target genes. In all cases BA levels were undetectable in cells treated with the vehicle (DMSO).

Since in Alexander cells, BA conjugation reduced their ability to activate FXR, we investigated whether this effect was shared by other BAs. Alexander transfected cells were then exposed to a set of BAs that included: CDCA, GCDCA, TCDCA, deoxycholic acid (DCA) and its conjugates (GDCA and TCDA), cholic acid (CA) and its conjugates (GCA and TCA), ursodeoxycholic acid (UDCA), lithocholic acid (LCA) and allo-cholic acid (ACA). UDCA and LCA were used to confirm previous reports by other groups on their ability to activate FXR [1-3], ACA was included because in previous studies by our group it was found that this typically fetal BA reappears in adults during⁰⁰⁰⁰ hepatocarcinogenesis and liver regeneration [22, 23], two processes in which FXR plays an important role. Since differences in BA uptake were not enough to explain the differences in the activity of BAs (at least in this experimental model) a 50 μ M concentration was chosen to compare the activity of different BAs. Moreover, we added 1 μ M of GW4064 as a positive control.

The expression of three specific FXR target genes (BSEP, SHP and OST β) was up-regulated only by GW4064, CDCA, DCA, ACA and LCA (Figure 4). These results confirm that conjugated BAs lack the ability to activate FXR in Alexander cells. Moreover, as previously reported [1, 24], CDCA was the most potent endogenous ligand of human FXR, whereas CA and UDCA were unable to up-regulate the expression of FXR target genes. DCA, ACA and LCA showed similar efficiency to induce FXR target gene expression, but lower than CDCA (Figure 4).

3.4. Agonist activity of BAs on FXR isoforms in Alexander cells

Since human hepatocytes, HuH-7 and HepG2 cells expressed a mixture of FXR isoforms (Figure 1), but Alexander cells were transfected only with FXR α 1(-), we wondered whether the differences among different experimental models found were derived from the type of endogenous isoform present in the cells.

Supplementary Figure 1 shows that FXR α 1(-) was located in the nucleus, as previously described [25]. We wanted to analyze whether the rest of FXR isoforms were also able to translocate into the nucleus and whether this happens in all tissues that express FXR. Transfection of HepG2, Alexander, LS 174T (from colon adenocarcinoma), HEK-293 (from human embryonic kidney), MUM2C (from melanoma) and CHO-K1 (from Chinese hamster ovary) showed that regardless the original tissue from where the cell line was obtained all isoforms presented a nuclear subcellular localization (Figure 5).

To investigate the sensitivity of FXR isoforms to molecular species of BAs and in order to prevent any interference due to endogenous FXR, Alexander cells were used in the following experiments. These cells were transfected with one of the four FXR isoform together with RXR α , but not OATP1B1 in order to minimize the competition of cell machinery by plasmid promoters and to get a similar expression of all FXR isoforms (Supplementary Figure 2). Alexander cells were treated with 1 μ M GW4064, 50 μ M CDCA, GCDCA, TCDCA, DCA, ACA, CA or UDCA, or the vehicle (DMSO). LCA and conjugated forms of DCA and CA were not included in this part of the study because their toxicity or lack of effect on FXR revealed in the previous set of experiments. Treatment with DMSO, UDCA, CA, GCDCA and TCDCA had no effect on FXR target gene expression in any of the experimental conditions. On the contrary, GW4064, CDCA, DCA and ACA were able to up-regulate BSEP, SHP and OST β expression but, as expected, only in the presence of FXR (Figure 5). They displayed the same order regarding the degree of FXR α 1(-) stimulation found in previous experiments, i.e., GW4064>CDCA>DCA \approx ACA (Figure 5). However, different patterns of gene up-regulation of different FXR isoforms could be distinguished. For BSEP expression the order of stimulation was FXR α 1(-)>FXR α 2(-)>FXR α 1(+)>FXR α 2(+) (Figure 5A); for SHP this was FXR α 1(-)=FXR α 2(-)>FXR α 1(+)=FXR α 2(+) (Figure 5B); whereas, for OST β the four isoforms displayed similar efficiency in stimulating its expression (Figure 5C). No difference in the up-regulation patterns among isoforms were observed in cells exposed to GW4064, CDCA, DCA and ACA (Figure 5 and Supplementary Figure 3).

3.5. Agonist activity of BAs on FXR isoforms in intestinal cells

The observation that in a hepatic cell line FXR α 1(-) exhibits the highest overall ability to stimulate gene expression has led us to wonder whether FXR α 2(-), the predominant isoform in the gut (Figure 1), is also the most efficient isoform when expressed in intestinal cells. As a first approach we treated Caco-2 cells during 24 h with 1 μ M GW4064, 50 μ M CDCA or the vehicle (DMSO), 48 h after transfection with each FXR isoform or an empty vector (Mock). Caco-2 cells present higher expression levels of RXR α (\approx 20% of human liver) than Alexander cells. Accordingly, they were not transfected with this nuclear receptor (Supplementary Figure 4A).

GW4064 was able to up-regulate FGF19, SHP and IBABP under these conditions, whereas treatment with CDCA poorly induced IBABP expression. Both ligands activated the expression of these genes only in presence of FXR α (-) isoforms, but not of FXR α (+) (Figure 7A). Moreover, in these cells FXR α 1(-) was again the most efficient isoform in up-regulating FXR target genes.

To rule out a model dependent artifact, we decided to investigate this question in another intestinal cell line. Thus, LS 174T cells were transfected with RXR α plus FXR isoforms to ensure the proper environment for FXR function. 48 h after transfection, when FXR/RXR α levels peaked (Supplementary Figure 4B), the cells were exposed to 1 μ M GW4064, 50 μ M CDCA or the vehicle (DMSO) during an additional 24 h period. Both FXR α (-) and FXR α (+) isoforms were able to activate the expression of FXR target genes after exposure to GW4064, although FXR α (-) were significantly more efficient than FXR α (+) isoforms. Moreover, FXR α 1(-) still was the most potent isoform (Figure 7B). Regarding CDCA, this BA up-regulated the expression of FGF19 and IBABP, but not SHP.

When results obtained in Caco-2 and LS 174T were compared, similar patterns of target gene activation among isoforms were observed. FGF19 and IBABP were up-regulated by FXR isoforms in a similar way to BSEP in Alexander cells (Figure 6A), although in this case FXR α 1(+) and FXR α 2(+) seemed to display the same potency, i.e., the order of activation was FXR α 1(-)>FXR α 2(-)>FXR α 1(+)=FXR α 2(+) (Figure 7). Moreover, SHP also showed similar pattern of activation, although less evident, to this observed in Alexander cells, i.e., FXR α 1(-)=FXR α 2(-)>FXR α 1(+)=FXR α 2(+) (Figure 6B), probably due to the poorer response of SHP in intestinal cells (Figure 7).

3.6. Agonistic activity on FXR of free and conjugated BAs in LS 174T cells

Finally, we wanted to investigate whether in intestinal cells conjugated BAs lack the FXR agonist activity that has been previously described in mice in vivo [13]. LS 174T cells, that showed the best response to CDCA in previous experiments (Figure 7), were transfected with OATP1B1, plus RXR α and FXR α 1(-) or FXR α 2(-) isoforms, to mimic the experiments showed in Figure 3C. 48 h after transfection cells were exposed to 50 μ M CDCA, 100 μ M GCDCA and 100 μ M TCDCA for 24 h.

In the presence of either FXR α 1(-) (Figure 8A) or FXR α 2(-) (Figure 8B) only CDCA induced a significant increase in the expression of the five FXR target genes analyzed (FGF19, IBABP, OST α , OST β and TCEA2), whereas conjugated BAs showed very low (FGF19, OST β and TCEA2) or no effect (IBABP and OST α) on their expression levels (Figure 8A-B). As expected, BAs were not biotransformed by these cells and their intracellular levels were similar in all treated cells (Figure 8C), but higher than in Alexander cells, in spite of their lower levels of OATP1B1 expression (Supplementary Figure 5).

4. DISCUSSION

The present study provides new interesting information about the presence and biological properties of the four human FXR isoforms in different cells involved in BA handling and their differential activation by molecular species of these steroids.

Determination of total abundance of FXR in human tissues indicates that the liver is not the organ with the highest expression of FXR. Ileum, which carries out BA reabsorption, expressed higher levels of this nuclear receptor. This supports the important role of ileal FXR in BA synthesis regulation, through FGF19-FGFR4 pathway [26]. However, human placenta lacks FXR expression, which is surprising because this organ is responsible for handling BA between mother and fetus [27].

Analysis of the proportions of FXR isoform expressed in each cell type revealed profound differences between FXR α 1 and FXR α 2. However, in contrast to previous reports [28], we have observed that in spite that all tissues expressed mainly one type, the other was always present, although in lower proportion. Our data, together with studies by others [4, 29, 30], support the idea that FXR α 1 isoforms are expressed mostly in tissues with steroid metabolic activity, such as liver and adrenal glands, while FXR α 2 are the predominant transcripts in different parts of the gastrointestinal tract. The exact transcription factors that regulate promoters upstream of the initial exons of isoforms FXR α 1/FXR α 2, and therefore are responsible for these differences, still remain unknown.

Determination of FXR α (+)/FXR(-) expression showed no differences among the tissues and cell lines analyzed. Splicing of exons 5-6 of FXR mRNA leads to the presence or absence of the 12 pair base insert at the end of exon 5. The splicing process occurs through the recognition of specific sequences previously described as GU at the 5' end and AG at the 3' end of the intron [31]. The presence of two GU sequences surrounding the 12 pair base insert at the 5' end of the intron, and the 50% of each FXR α (+)/FXR(-) isoforms found in all samples, opens the possibility that the presence or absence of the insert in FXR isoforms is a random process determined by the spliceosoma. Thus, a mutation of one of GU sequences in one allele could explain the 75%/25% proportion of these isoforms found in COLO 205 cells. Nevertheless, further investigation is needed to find out the precise mechanism that regulate FXR α (+)/FXR(-) isoform expression.

It has been reported that the phosphorylation of a threonine located in the AF2 domain (shared by all FXR isoforms) determines the nuclear localization of this nuclear

receptor [25]. Thus, as expected, all four isoforms exhibit nuclear localization in transfection assays. Our results suggest that this mechanism is tissue- and species-independent, since all isoforms showed nuclear localization even in MUM2C, derived from human melanoma, a BA unrelated tissue, and CHO-K1 cells, derived from hamster. However, we cannot rule out the existence of additional mechanisms that regulate subcellular localization of FXR.

Regarding up-regulation of target genes by FXR isoforms, interesting facts were found. The exact mechanism by which target genes show different up-regulation [32, 33] by FXR isoforms is not known yet. Previous reports attributed the differences in the activity of FXR isoforms with or without the 12 base pair insert to differences in the ability of these proteins to bind specific DNA sequences in the promoter region of FXR target genes [34]. However, our results in Alexander cells showed that all FXR isoforms induce the same increment in the expression of OST β after exposure to different agonists. Thus, the DNA binding differences among isoforms should be gene-specific or dependent on the species, since the study above was carried out in mice.

Moreover, we found that FXR α 1(-), characteristic of human liver (Figure 1) is more efficient promoting the up-regulation of FXR target genes in all three cell lines assayed (one hepatic and two from intestine) in response to GW4064 and several BAs. Our results indicate that the agonist activity of FXR ligands is independent of the isoform. Thus, the binding properties of FXR isoforms to DNA and the affinity for cofactors of the transcription complex should be responsible for differences in the activity among FXR isoforms. Additionally, two of the cell lines used to compare isoform activity derive from colon adenocarcinoma, which express mostly FXR α 2 isoforms. This suggests that the differences in FXR expression found among the tissues analyzed (Figure 1) are not explained by isoform activity. Thus, there must be extra factors specific from liver and other FXR expressing tissues that explain those differences. It is possible that the existence of DNA sequences or cofactors specific for each tissue determines the binding of FXR tissue-specific isoforms to certain groups of genes. The differences in the affinity for protein cofactors would be determined by the amino-terminal characteristic region of isoforms FXR α 1 and FXR α 2. This concept is supported by a study performed in mice [35] which shows that liver and intestinal FXR bind different sets of genes in these animals, although some of them are shared by both tissues. Moreover, a recent report suggests that the DNA binding properties of FXR can be modified in pathologies such as obesity [36].

Regarding the agonist activity of BAs used in this study, very interesting data were found. On one hand, our results confirm that CDCA is the most potent endogenous ligand of human FXR up to now, as CA, which lacks activity in our experiments, is its counterpart in mice [24]. DCA and LCA showed lower activity on FXR activation than CDCA, which can be explained by the different disposition of hydroxyl groups in the hydrophilic face of these BAs, as other groups reported before [37]. Moreover, ACA, a fetal BA, was able to activate FXR in a similar way to DCA and LCA. This was surprising due to the “flat” structure of this BA, which differs from the tridimensional structure of most BA species with one hydrophobic concave face and other hydrophilic convex face [37]. However, previous reports showed that synthetic compounds with different tridimensional structure than BAs, like fexaramine, are able to accommodate themselves in the ligand binding domain of FXR [38]. Moreover, in a recent study we have shown that glucocorticoids, also compounds with a plane steroid ring, are able to directly activate FXR [16]. In the other hand, it has been reported that different FXR ligands, such as CDCA, GW4064, and fexaramine, are able to activate different groups of genes in human hepatocytes [38]. This may suggest that ACA, which reappears in adults in hepatocarcinogenesis [22] and liver regeneration [23], two situations with high proliferation of hepatocytes, may activate a panel of genes that explain the role of FXR in those particular situations.

Finally, the present study indicates the existence of differences among free and conjugated BAs regarding FXR activation. Taking into account our data and the recent work performed in mice [13] it seems that conjugated BA are able to activate FXR in hepatic but not in intestinal cells. However, further investigation is needed to ensure that these compounds lack FXR agonist activity in human healthy intestinal cells, such as ileocytes and colonocytes. The differences on FXR activation by conjugated BAs found among HuH-7 and HepG2 cells, and especially those found in cells more dedifferentiated, such as Alexander cells [39], suggest the existence of an additional mechanism, either a postraductional modification of FXR or a cofactor of the transcription complex, that allows conjugated BAs to activate this nuclear receptor. The results obtained in hepatocytes, that start a dedifferentiation process when they are cultured, support this hypothesis. Moreover, the lack of response of transfected FXR to conjugated BAs in cells without endogenous expression of FXR, such as Alexander and LS 174T cells indicates that this additional factor could be lost in a parallel to FXR expression. This is consistent with the fact that HuH-7 cells, with higher FXR expression than liver, respond in a similar way to conjugated and free BAs, while HepG2, with lower levels than liver, do not. Regarding its pathological significance, this

characteristic may play an important role in situations of reduced FXR expression or altered BA conjugation profile, like cancer [40, 41] or glucocorticoid treatment [16]. Moreover, if it is true that intestinal FXR cannot respond to conjugated BAs in humans, this may suppose a new mechanism to detect an increase of intestinal bacterial proliferation.

In conclusion, our results indicate the presence of additional mechanisms involved in conjugated, but not free, BA agonist activity on FXR. This characteristic is present, at least, in human hepatic cells and disappears in the dedifferentiation process associated with tumorigenesis. Moreover, this mechanism seems to be independent of FXR isoforms, among which FXR α 1(-) showed to be the most potent isoform regarding the up-regulation of FXR well known target genes in hepatic and intestinal human cell lines.

REFERENCES

1. Parks, D.J., et al., *Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1365-8.
2. Makishima, M., et al., *Identification of a nuclear receptor for bile acids*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1362-5.
3. Wang, H., et al., *Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR*. Molecular cell, 1999. **3**(5): p. 543-53.
4. Huber, R.M., et al., *Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters*. Gene, 2002. **290**(1-2): p. 35-43.
5. Chong, H.K., et al., *Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(18): p. 6007-17.
6. Kim, I., et al., *Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice*. Carcinogenesis, 2007. **28**(5): p. 940-6.
7. Modica, S., et al., *Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis*. Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9589-94.
8. Chen, W.D., et al., *Farnesoid X receptor alleviates age-related proliferation defects in regenerating mouse livers by activating forkhead box m1b transcription*. Hepatology, 2010. **51**(3): p. 953-62.
9. Inagaki, T., et al., *Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3920-5.
10. Stedman, C., et al., *Benefit of farnesoid X receptor inhibition in obstructive cholestasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11323-8.
11. Moschetta, A., A.L. Bookout, and D.J. Mangelsdorf, *Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1352-8.
12. Herraez, E., et al., *Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins*. Mol Pharm, 2012. **9**(9): p. 2565-76.
13. Kuribayashi, H., et al., *Enterobacteria-mediated deconjugation of taurocholic acid enhances ileal farnesoid X receptor signaling*. Eur J Pharmacol, 2012. **697**(1-3): p. 132-8.
14. Mendoza, M.E., et al., *Physiological characteristics of allo-cholic acid*. J Lipid Res, 2003. **44**(1): p. 84-92.
15. Laible, M. and K. Boonrod, *Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids*. J Vis Exp, 2009(27).
16. Rosales, R., et al., *FXR-dependent and -independent interaction of glucocorticoids with the regulatory pathways involved in the control of bile acid handling by the liver*. Biochem Pharmacol, 2013.
17. Gonzalez, R., et al., *Nitric oxide mimics transcriptional and post-translational regulation during alpha-tocopherol cytoprotection against glycochenodeoxycholate-induced cell death in hepatocytes*. J Hepatol, 2011. **55**(1): p. 133-44.
18. Markwell, M.A., et al., *A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples*. Anal Biochem, 1978. **87**(1): p. 206-10.
19. Nytofte, N.S., et al., *A homozygous nonsense mutation (c.214C->A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis*. J Med Genet, 2011. **48**(4): p. 219-25.
20. Ye, L., et al., *High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **860**(1): p. 10-7.
21. Cuesta, E.P., et al., *Transcription elongation factor TFIIS.1 gene is regulated by farnesoid X receptor*. FEBS J, 2012. **279**(1): p. 276.

22. El-Mir, M.Y., et al., *Increased levels of typically fetal bile acid species in patients with hepatocellular carcinoma*. Clinical science, 2001. **100**(5): p. 499-508.
23. Starkel, P., et al., *Foetal 'flat' bile acids reappear during human liver regeneration after surgery*. Eur J Clin Invest, 2009. **39**(1): p. 58-64.
24. Cui, J., et al., *The amino acid residues asparagine 354 and isoleucine 372 of human farnesoid X receptor confer the receptor with high sensitivity to chenodeoxycholate*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(29): p. 25963-9.
25. Frankenberg, T., et al., *The membrane protein ATPase class I type 8B member 1 signals through protein kinase C zeta to activate the farnesoid X receptor*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1896-905.
26. Inagaki, T., et al., *Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis*. Cell metabolism, 2005. **2**(4): p. 217-25.
27. Macias, R.I., J.J. Marin, and M.A. Serrano, *Excretion of biliary compounds during intrauterine life*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(7): p. 817-28.
28. Chen, Y., et al., *Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid x receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma tissues*. Hepatology, 2012.
29. Lee, H., et al., *FXR regulates organic solute transporters alpha and beta in the adrenal gland, kidney, and intestine*. J Lipid Res, 2006. **47**(1): p. 201-14.
30. Lian, F., et al., *Farnesoid X receptor protects human and murine gastric epithelial cells against inflammation-induced damage*. The Biochemical journal, 2011. **438**(2): p. 315-23.
31. De Conti, L., M. Baralle, and E. Buratti, *Exon and intron definition in pre-mRNA splicing*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(1): p. 49-60.
32. Anisfeld, A.M., et al., *Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(22): p. 20420-8.
33. Lee, F.Y., et al., *Alpha-crystallin is a target gene of the farnesoid X-activated receptor in human livers*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(36): p. 31792-800.
34. Zhang, Y., H.R. Kast-Woelbern, and P.A. Edwards, *Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(1): p. 104-10.
35. Thomas, A.M., et al., *Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1410-9.
36. Lee, J., et al., *Genomic analysis of hepatic farnesoid X receptor binding sites reveals altered binding in obesity and direct gene repression by farnesoid X receptor in mice*. Hepatology, 2012. **56**(1): p. 108-17.
37. Mi, L.Z., et al., *Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR*. Molecular cell, 2003. **11**(4): p. 1093-100.
38. Downes, M., et al., *A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR*. Molecular cell, 2003. **11**(4): p. 1079-92.
39. Ishiyama, T., et al., *Expression of HNFs and C/EBP alpha is correlated with immunocytochemical differentiation of cell lines derived from human hepatocellular carcinomas, hepatoblastomas and immortalized hepatocytes*. Cancer Sci, 2003. **94**(9): p. 757-63.
40. Martinez-Becerra, P., et al., *Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy*. Pharmacol Res, 2012. **66**(5): p. 419-27.
41. Martinez-Becerra, P., et al., *No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors*. Mol Pharm, 2012. **9**(6): p. 1693-704.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Absolute abundance of FXR mRNA (A) and relative proportions of FXR isoforms classified according to the difference in the initial region (exons 1–3) of mRNA ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) (B) and the presence (+) or absence (–) of a 12 base pairs insert in exon 5 (C). Samples were collected from healthy livers (n = 13), duodenum/jejunum (n = 3), ileums (n = 3), colons (n = 18), kidneys (n = 3) and placentas (n = 3). Samples of the indicated cell lines are at least from 3 different cultures. Values are expressed as mean \pm SEM. *, $p < 0.05$, on comparing with liver total levels (A) or comparing levels of FXR $\alpha 1/2$ (B) o FXR $\alpha(+/-)$ (C) isoforms among them.

Figure 2. A. Effect of free and conjugate bile acids (BAs) on the expression of BSEP, SHP, OST α , OST β and TCEA2 in human hepatocytes in primary culture. Cells were treated with 100 μ M CDCA, GCDCA, or TCDCA or the vehicle (DMSO) 24 h before gene expression was measured by RT-QPCR. Results, expressed as fold induction by comparing with cells treated with DMSO, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells treated with the vehicle (DMSO). **B.** BA total content of the same cells determined by HPLC-MS/MS 24 h after BA exposure. Results are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, on comparing cells treated with conjugated BA with cells treated with free BA.

Figure 3. A-C. Effect of free and conjugated bile acids (BAs) on the expression of BSEP, SHP, OST α , OST β and TCEA2 in HuH-7 (A), HepG2 (B) and Alexander (C) cells. Alexander cells were transfected with FXR $\alpha 1(-)$, RXR α and OATP1B1 and, when necessary, with a plasmid containing an IR-1 response element controlling the expression of the destabilized firefly luciferase (luc2CP), 48 h before adding the compounds. Cells were treated with 50 μ M CDCA, 100 μ M GCDCA or TCDCA or the vehicle (DMSO) 24 h before gene expression was measured by RT-QPCR. Results, expressed as fold induction by comparing with cells treated with DMSO, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells treated with the vehicle (DMSO). **D.** BA total content of the same cells determined by HPLC-MS/MS 24 h after BA exposure. Results are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, on comparing cells treated with conjugated BA with cells treated with free BA.

Figure 4. Effect of GW4064 and bile acids (BAs) on the expression of BSEP (A), SHP (B) and OST β (C) in human hepatoma Alexander cells transfected with FXR α 1(-), RXR α and OATP1B1 48 h before adding the compounds. Cells were treated with 1 μ M GW4064, 50 μ M of the indicated BA or the vehicle (DMSO) 24 h before gene expression was measured by RT-QPCR. Results, expressed as fold induction by comparing with cells treated with DMSO, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells treated with the vehicle (DMSO).

Figure 5. Representative fluorescence confocal microscopy photographs of cell lines derived from human liver (HepG2 and Alexander), intestine (LS 174T), kidney (HEK-293), melanoma (MUM2C) and a hamster cell line derived from ovary (CHO-K1), transfected with V5-tagged FXR isoforms (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue).

Figure 6. Effect of GW4064 and bile acids (BAs) on the expression of BSEP (A), SHP (B) and OST β (C) in human hepatoma Alexander cells transfected with one FXR isoform and RXR α , or an empty vector (Mock) 48 h before adding the compounds. Cells were treated with 1 μ M GW4064, 50 μ M of the indicated BA or the vehicle (DMSO) 24 h before gene expression was measured by RT-QPCR. Results, expressed as fold induction by comparing with Mock cells treated with DMSO, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with Mock cells treated with the same compound.

Figure 7. Effect of GW4064 and bile acids (BAs) on the expression of FGF19, SHP and IBABP in human colon adenocarcinoma Caco-2 (A) and LS 174T (B) cells transfected with one FXR isoform alone (Caco-2), in combination with RXR α (LS 174T) or an empty vector (Mock) 48 h before adding the compounds. Cells were treated with 1 μ M GW4064, 50 μ M CDCA or the vehicle (DMSO) 24 h before gene expression was measured by RT-QPCR. Results, expressed as fold induction by comparing with Mock cells treated with DMSO, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with Mock cells treated with the same compound.

Figure 8. A-B. Effect of free and conjugated bile acids (BAs) on the expression of FGF19, IBABP, OST α , OST β and TCEA2 in human colon adenocarcinoma LS 174T cells transfected with either FXR α 1(-) (A) or FXR α 2(-) (B) + RXR α and OATP1B1 48 h before adding the compounds. Cells were treated with 50 μ M CDCA, 100 μ M GCDCA or TCDCA or the vehicle (DMSO) 24 h before gene expression was measured by RT-QPCR. Results, expressed as fold induction by comparing with cells treated with DMSO, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells treated with the vehicle (DMSO). **C.** BA total content of the same cells determined by HPLC-MS/MS 24 h after BA exposure. Results are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, on comparing cells treated with conjugated BA with cells treated with free BA.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Figure 1. A. Representative fluorescence confocal microscopy photographs of human hepatoma Alexander cells transfected with V5-tagged OATP1B1 (green), FXR α 1(-) (red) and RXR α . Nuclei were counterstained with DAPI (blue). **B.** Expression levels of transfected genes in human hepatoma Alexander cells. Cells were transfected with FXR α 1(-), RXR α and OATP1B1 or an empty vector (Mock), 48 h before gene expression was measured by RT-QPCR. The amount of mRNA was determined after treatment with the *DpnI* restriction enzyme to digest the remnant plasmids. Results, expressed as percentage of human liver, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with Mock cells. **C.** Bile acid (BA) content of the same cells 24 h after exposure to 50 μ M CDCA, GCDCA or TCDCA or the vehicle (DMSO). Results are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with Mock cells.

Supplemental Figure 2. A. Representative image of Western blot analysis of FXR carried out with lysates of human hepatoma Alexander cells transfected with FXR α 1(-) and RXR α or an empty vector (Mock), 48 h before protein expression was measured. **B-C.** Expression levels of FXR (B) and RXR α (C) in cells transfected with one FXR isoform and RXR α , or an empty vector (Mock) 48 h before gene expression was measured by RT-QPCR. The amount of mRNA was determined after treatment with the *DpnI* restriction enzyme to digest the remnant plasmids. Results, expressed as percentage of human liver, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells transfected with FXR α 1(-) isoform.

Supplemental Figure 3. Effect of GW4064, CDCA, DCA and ACA on the expression of BSEP (A), SHP (B) and OST β (C) in human hepatoma Alexander cells transfected with one FXR isoform and RXR α , or an empty vector (Mock) 48 h before adding the compounds. Cells were treated with 1 μ M GW4064 or 50 μ M of the indicated BA 24 h before gene expression was measured by RT-QPCR. Results, expressed as percentage of those found in cells transfected with FXR α 1(-), are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells transfected with FXR α 1(-) isoform.

Supplemental Figure 4. Expression levels of transfected genes in human colon adenocarcinoma Caco-2 (A) and LS 174T (B) cells. Cells were transfected with one FXR isoform and RXR α , or an empty vector (Mock) 48 h before gene expression was measured by RT-QPCR. The amount of mRNA was determined after treatment with the *DpnI* restriction enzyme to digest the remnant plasmids. Results, expressed as percentage of human liver, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells transfected with FXR α 1(-) isoform.

Supplemental Figure 5. Expression levels of transfected genes in human colon adenocarcinoma LS 174T cells. Cells were transfected with either FXR α 1(-) or FXR α 2(-), plus RXR α and OATP1B1, or an empty vector (Mock), 48 h before gene expression was measured by RT-QPCR. The amount of mRNA was determined after treatment with the *DpnI* restriction enzyme to digest the remnant plasmids. Results, expressed as percentage of human liver, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells transfected with FXR α 1(-) isoform.

Supplementary Table 1. Oligonucleotide sequences of primers used in Gateway cloning.

Cloned cDNA	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
FXR α 1/V5	ATGGGATCAAAAAATGAATCTCATTGAACATTCCC	CTGCACGTCACAGATTTCCACAGAG
FXR α 2/V5	GATGGTAATGCAGTTTCAGGGGTTAGAAAATC	CTGCACGTCACAGATTTCCACAGAG
FXR α 1/STOP	ATGGGATCAAAAAATGAATCTCATTGAACATTCCC	CTACTGCACGTCCCAGATTTCCACAGAG
FXR α 1/STOP	GATGGTAATGCAGTTTCAGGGGTTAGAAAATC	CTACTGCACGTCCCAGATTTCCACAGAG
RXR α	ATGGACACCAAAACATTTCTGCGCGCT	CTAAGTCATTTGGTGGCGGCGCCT

Supplementary Table 2. Oligonucleotide sequence of primers used to determine the expression levels of human genes by RT-QPCR.

Gene	Protein	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amplicon size (bp)	Accession Number
ABCB1/1	BSEP	GTGAAGGAATGGTGACCGTGGA	TCCTTGGCAGCTTGGACTATGTCT	178	NM_003742
FGF19	FGF19	GCGCACAGTTTCTGGAGATCA	AGTCTTCTCCGAGTACTGAAGCAG	134	NM_005117
GAPDH	GAPDH	TGAGCCCGCAGCCTCC	TACGACCAAAATCCGTTGACTCC	138	NM_002046
FABP6	IBABP	GTTCAAGGCCACTGTGCAGAT	CTGCTTAGGCCAGTCTCTTGCT	155	DQ132786
NR0B2	SHP	GGCTTCAATGCTGTCTGGAGT	CTGGCACATCGGGGTTGAAGA	99	NM_021969
NR1H4	FXR	ACAGAACAAAGTGGCAGGTC	CTGAAGAAACCTTTACACCCCTC	368	NM_005123
NR2B1	RXR α	GACCCTGTCAACAACATTTGCCA	GATGACGCTCATTCCAGCCT	144	NM_002957
OST α	OST α	TTCCAGGTTCTCCTCATCTGCAC	CAATTATCATTGAGACCTGGTTTT	122	NM_152872
OST β	OST β	TGGCAGCTGTGGTGGTCATT	TGGTGGCTGCATCGTTTCTT	83	NM_178859
SLCO1B1	OATP1B1	TGCAATGGATTGAAGATGTTCTTGGCA	CAACCTTTTCCCACTATCTCAGG	416	NM_006446
TCEA2	TFIIS	TCGACTCCGAGGATCACCACATTT	CACGTGGTTCATGGTCCGCTCT	115	NM_001469

Supplementary Table 3. Oligonucleotide sequence of primers used to determine the absolute abundance of FXR isoforms by RT-QPCR.

Gene	Protein	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amplicon size (bp)	Accession Number
NR1H4	FXR	ACAGAACAAAGTGGCAGGTC	CTGAAGAAACCTTTACACCCCTC	368	NM_005123
NR1H4	FXR α 1	TTGAACATTCACATTTACCTACCAC	CTGAAGAAACCTTTACACCCCTC	433	NM_005123
NR1H4	FXR α 2	TATGAAGCCCGCGAAAGG	CTGAAGAAACCTTTACACCCCTC	393	NM_001206993
NR1H4	FXR α (-)	ACAGAACAAAGTGGCAGGTC	TCAGTTAAACAAGCATTACGCCA	512	NM_005123
NR1H4	FXR α (+)	ACAGAACAAAGTGGCAGGTC	TGAATTCAGTTAAACAAGCCTGTATACATA	530	NM_001206993

FXR isoforms are classified according to the difference in the initial region (exons 1-3) of mRNA (α 1 and α 2) and the presence (+) or absence (-) of a 12 base pairs insert in exon 5.

Figure 1

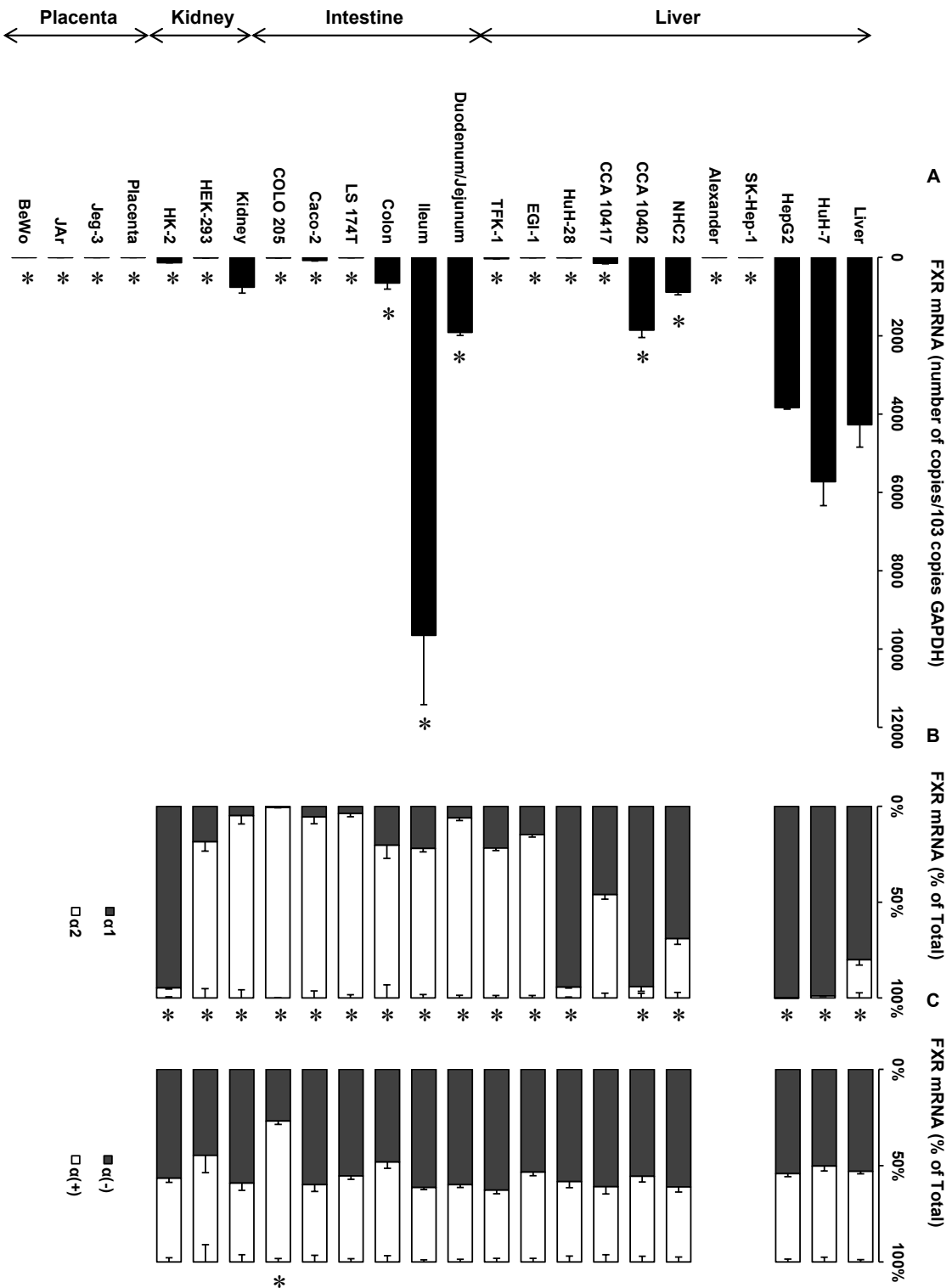


Figure 2

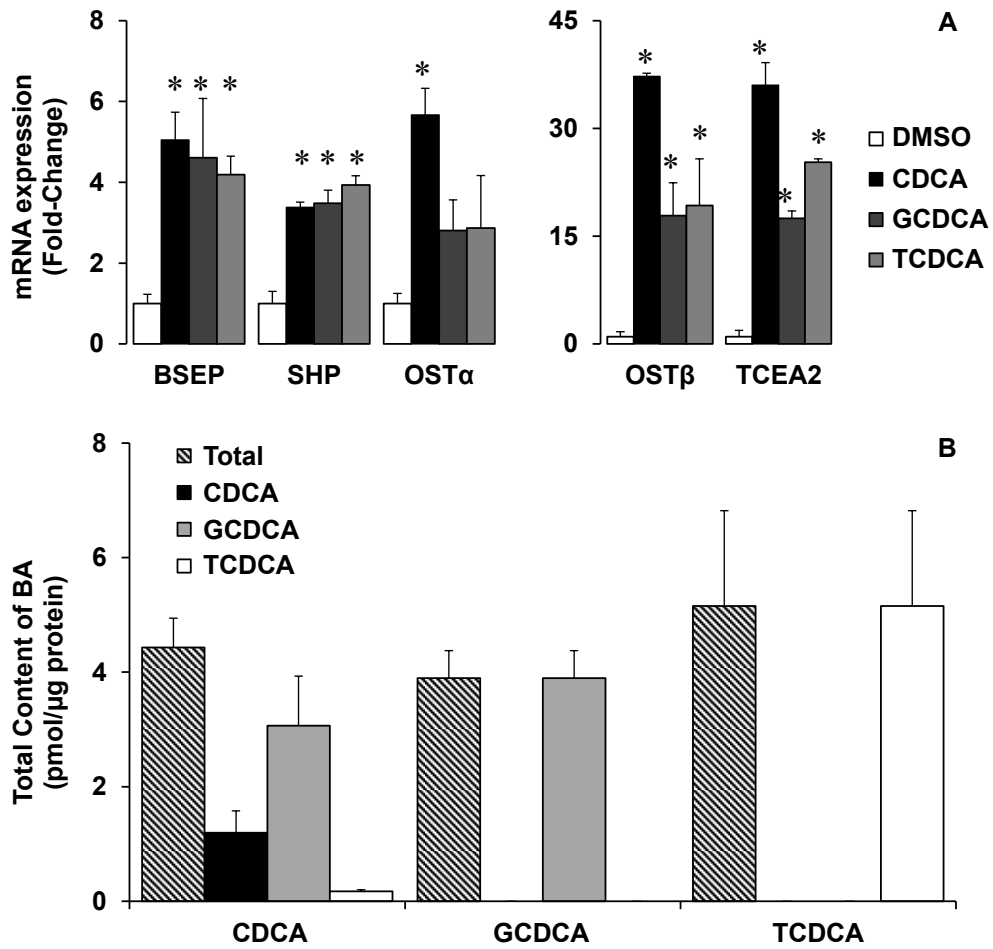


Figure 3

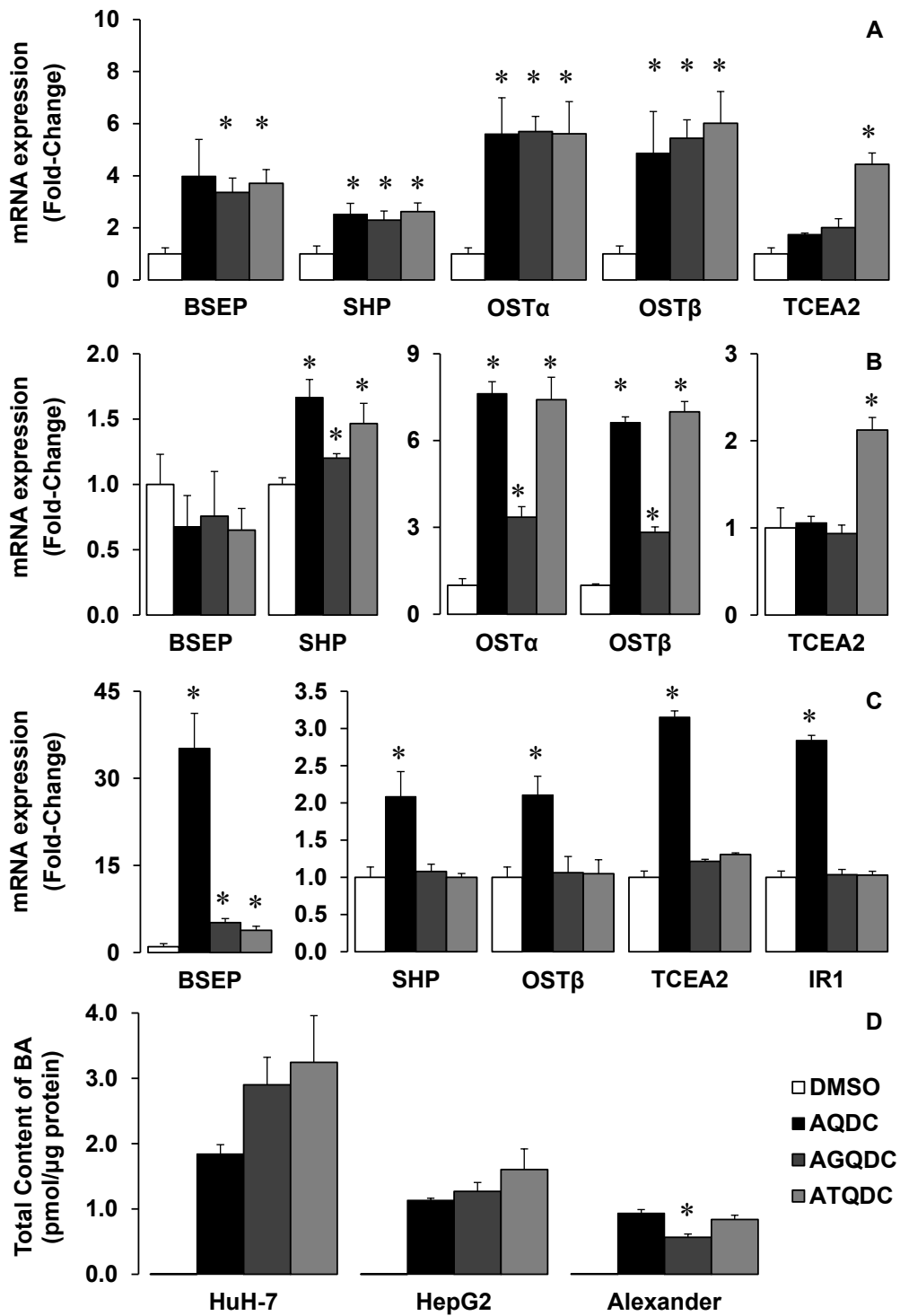


Figure 4

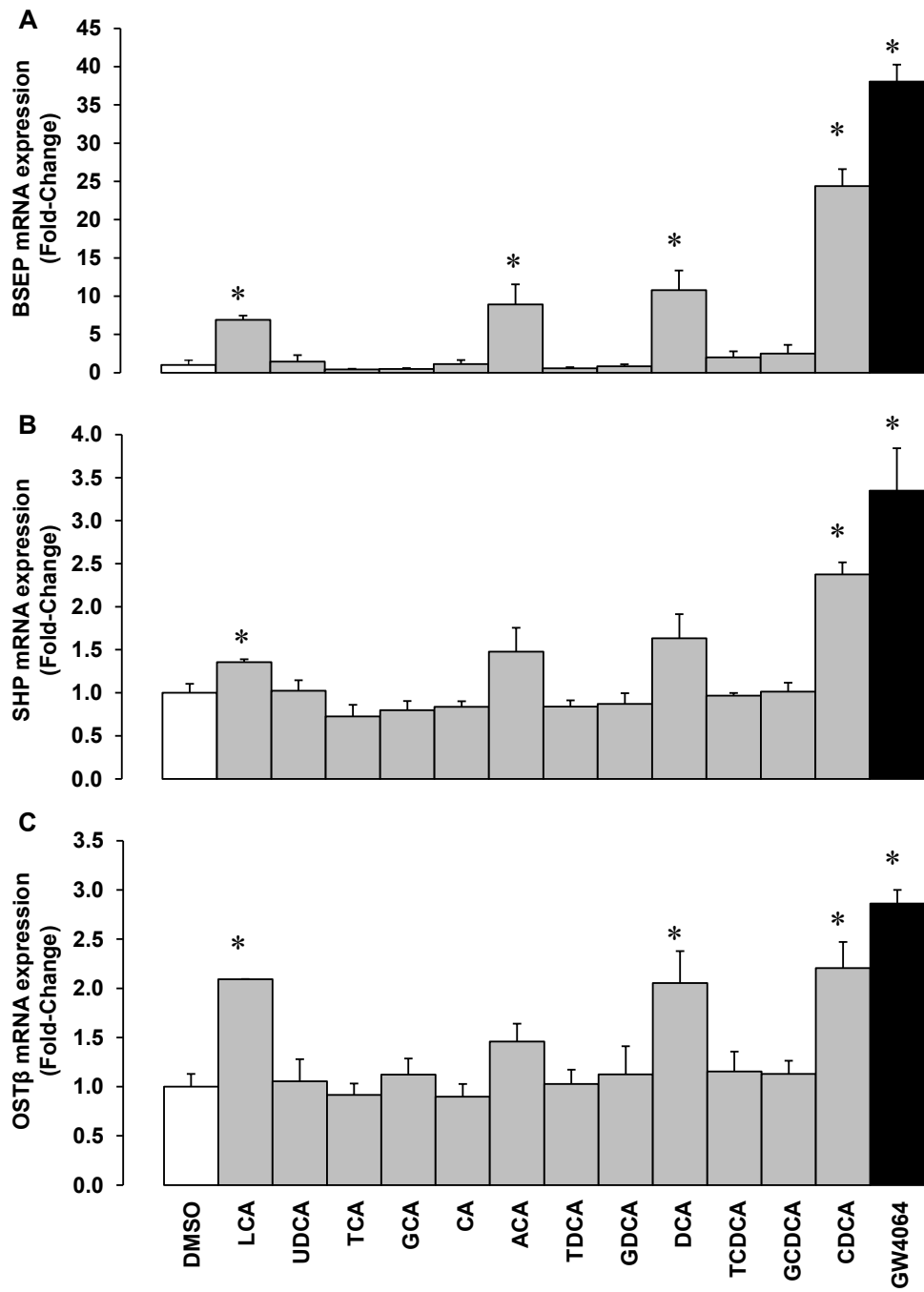


Figure 5

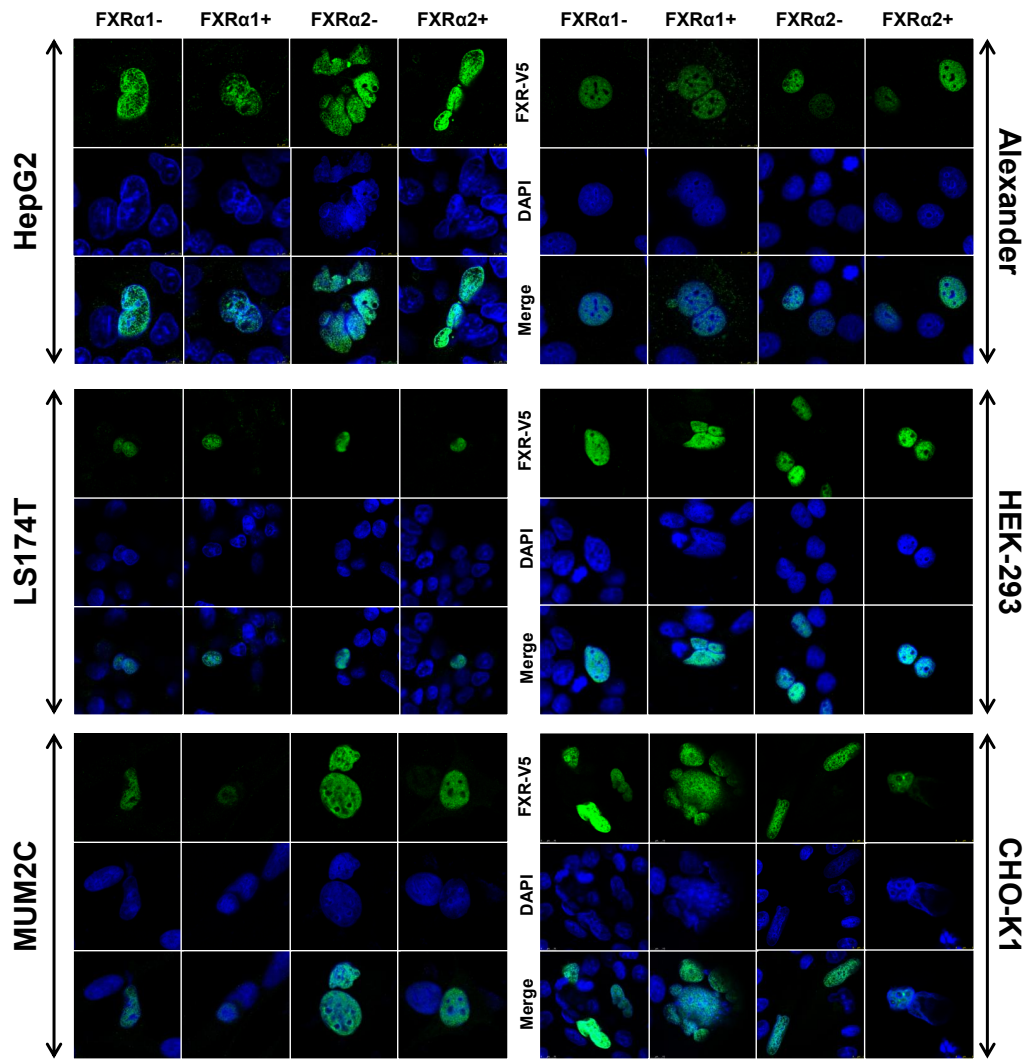


Figure 6

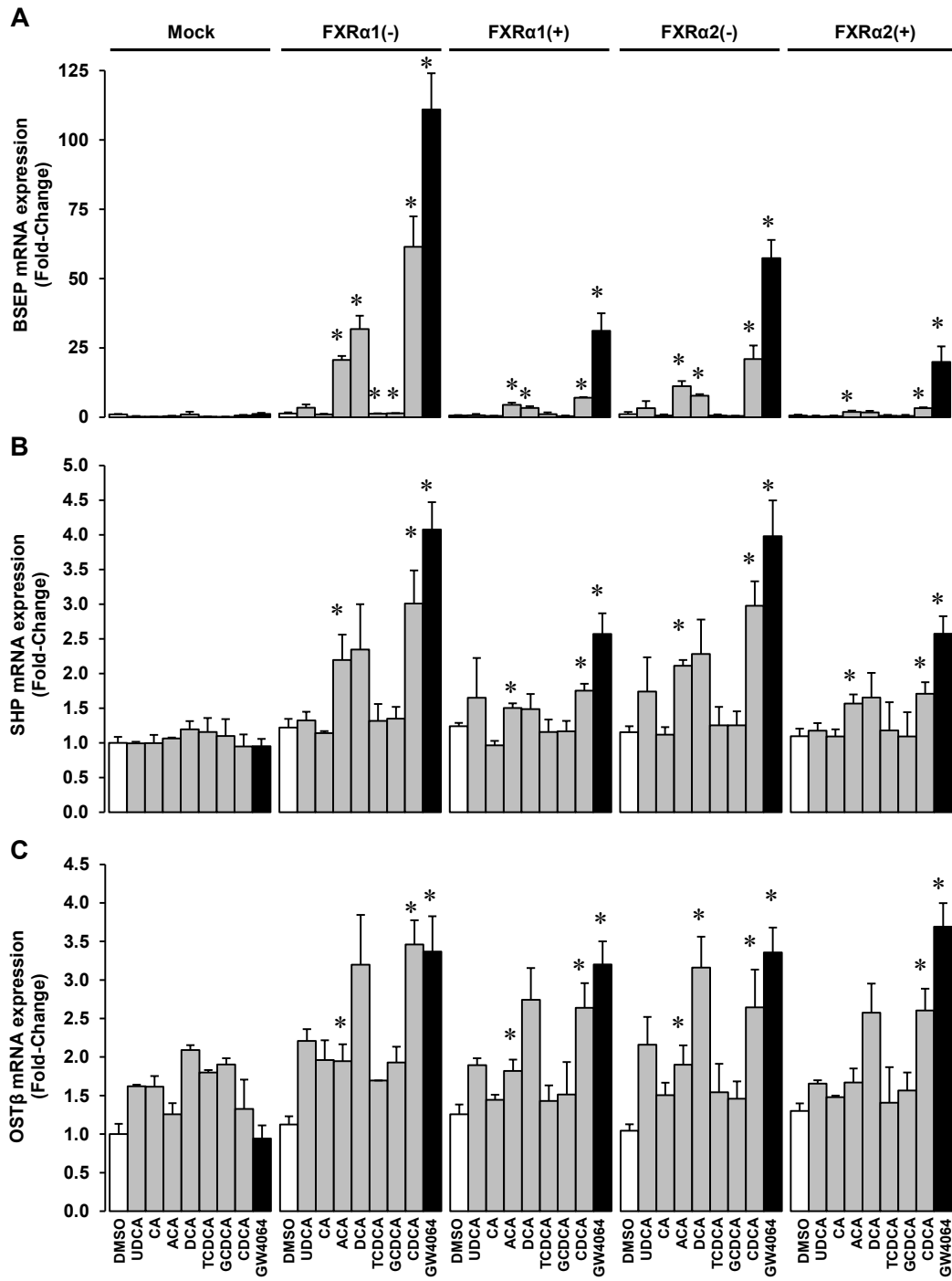


Figure 7

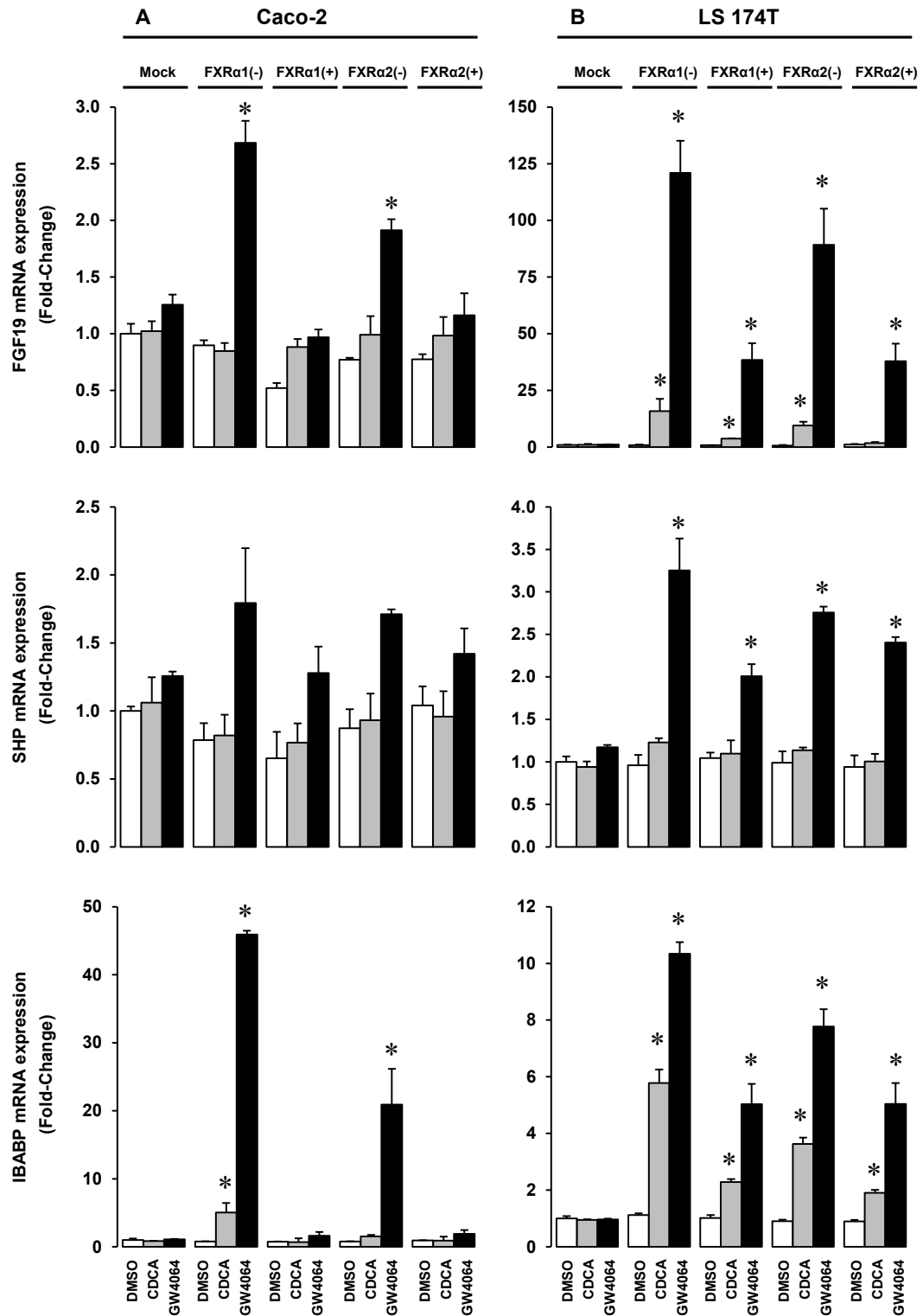
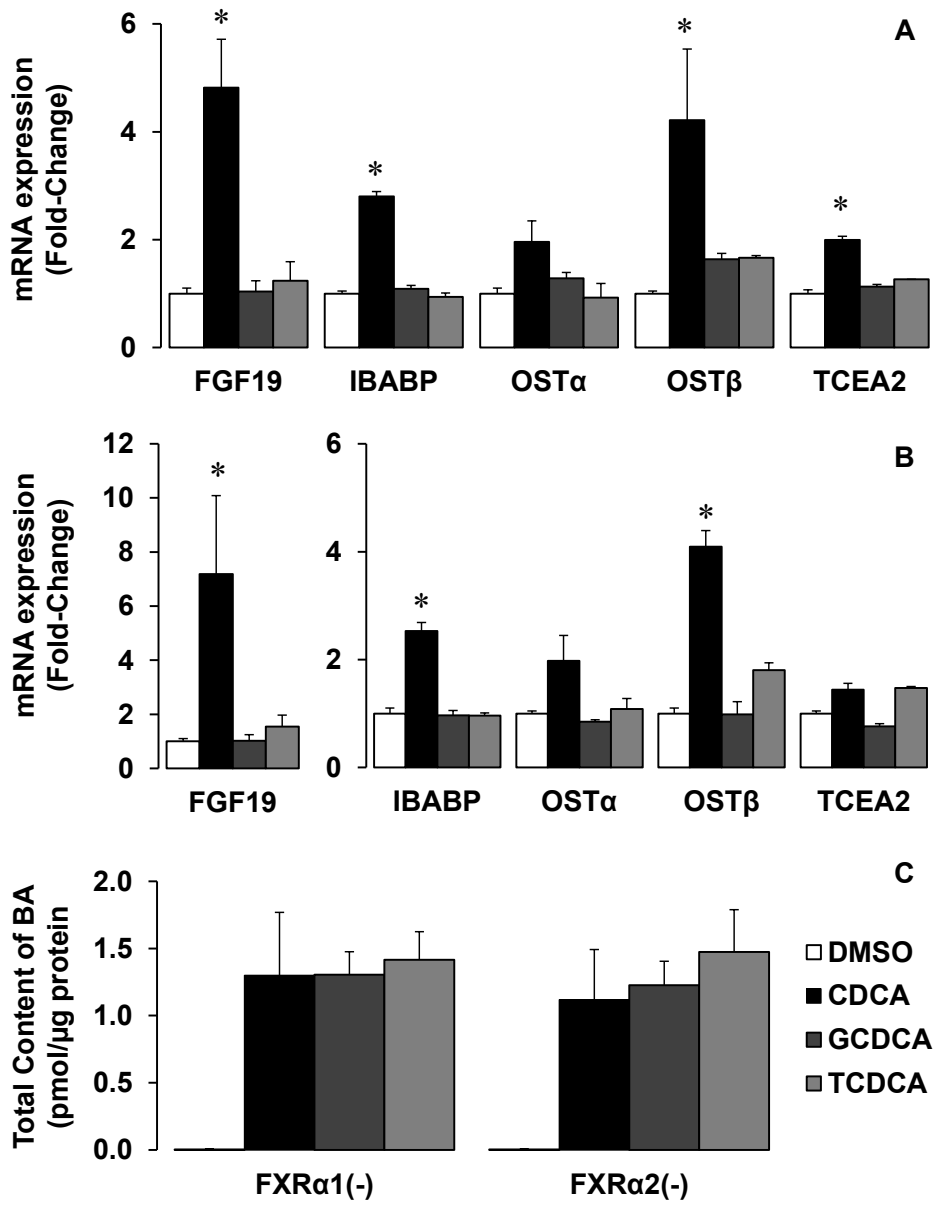
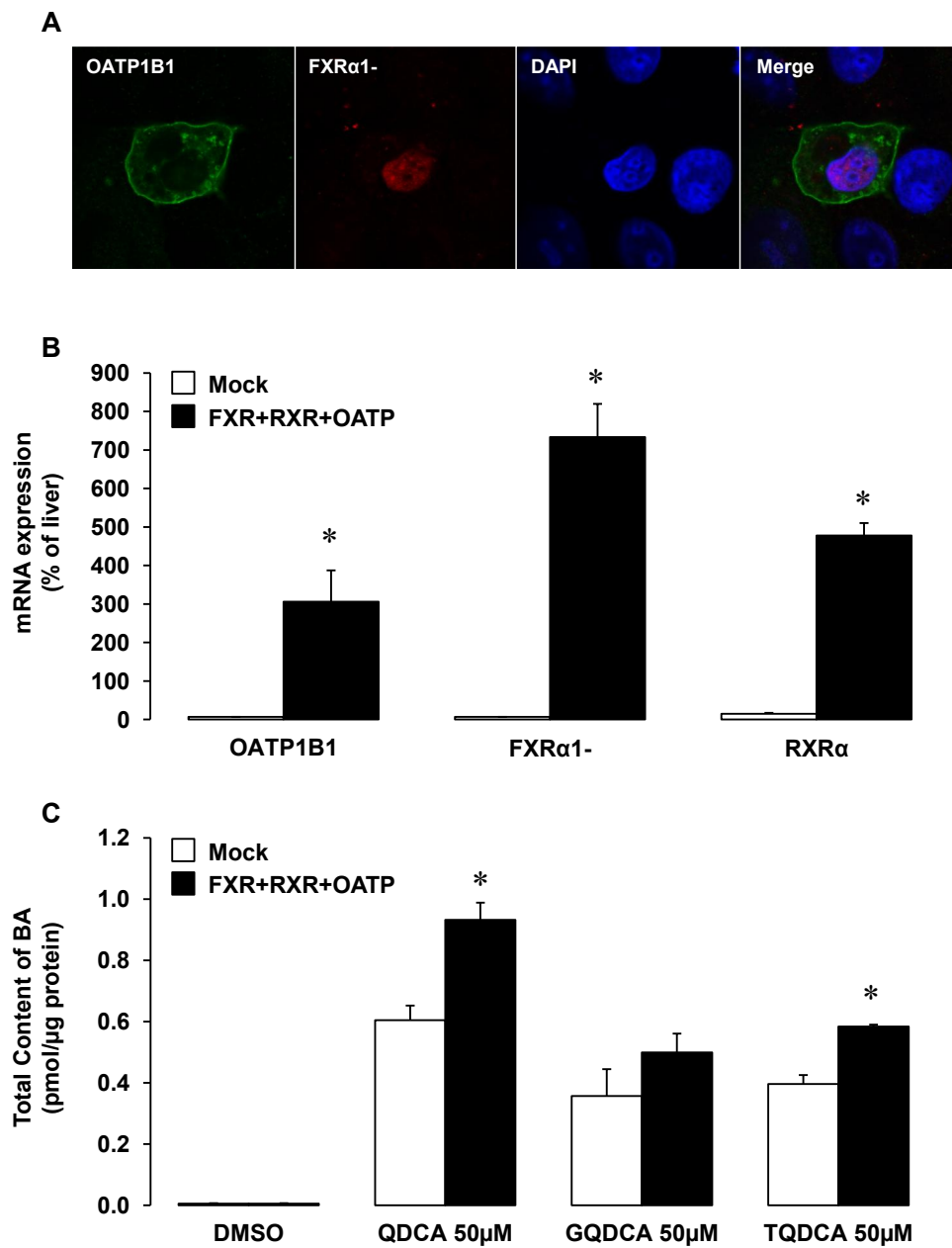


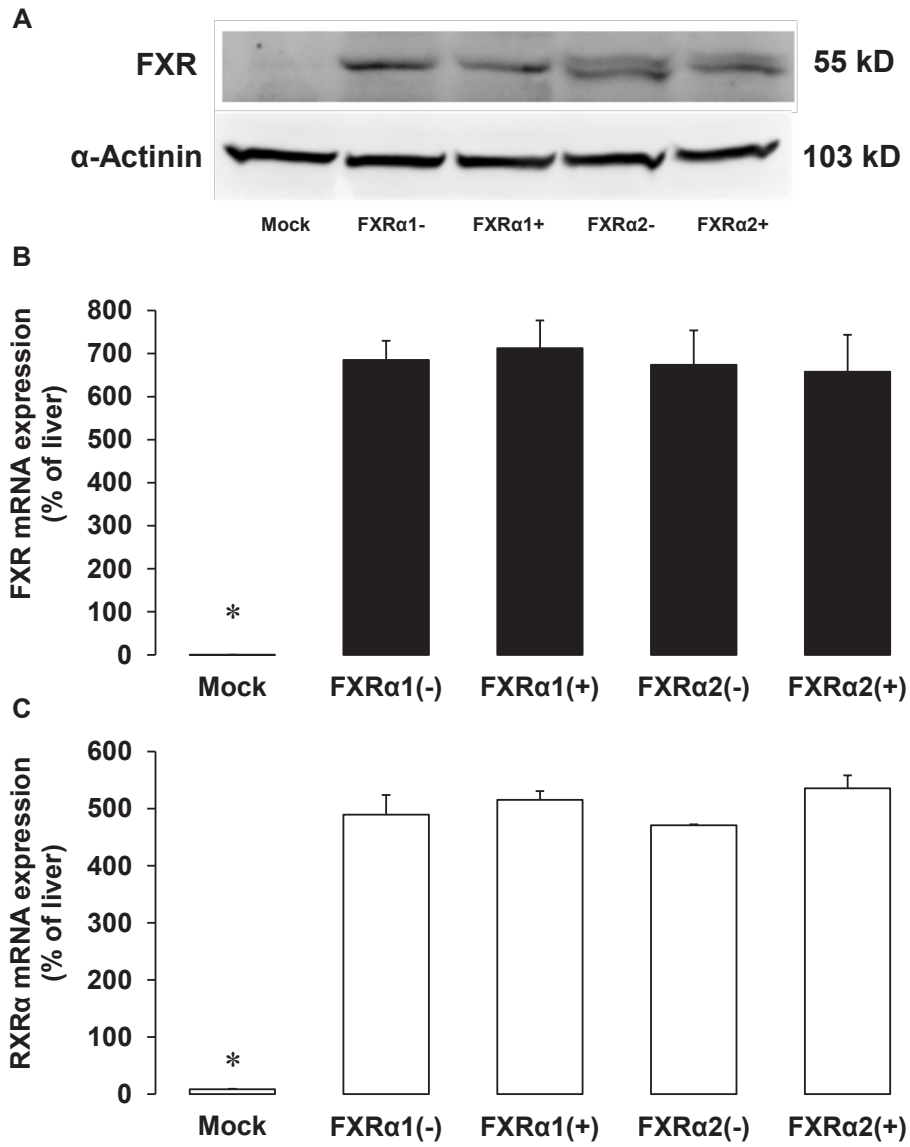
Figure 8



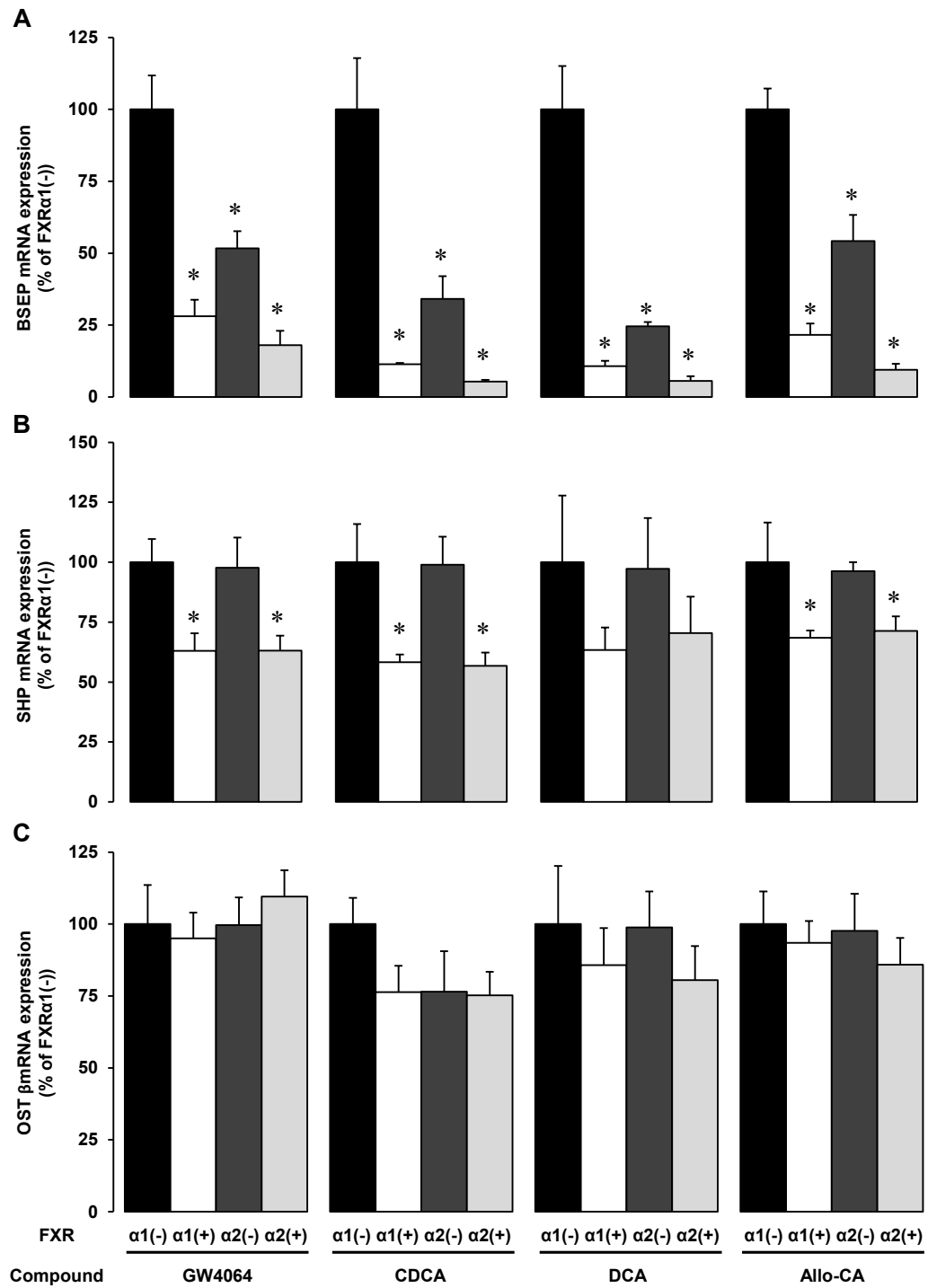
Supplementary Figure 1



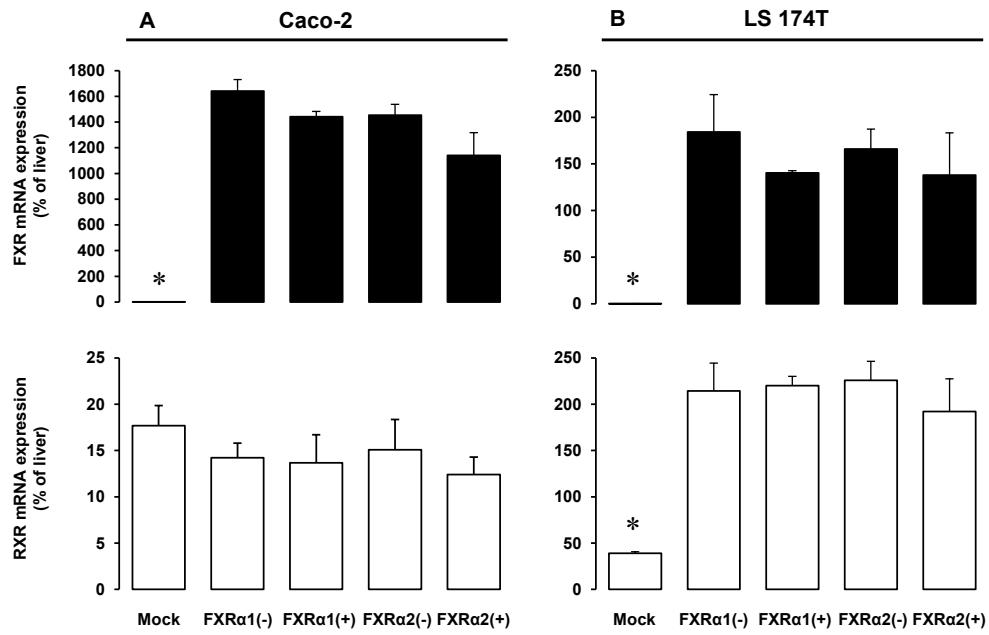
Supplementary Figure 2



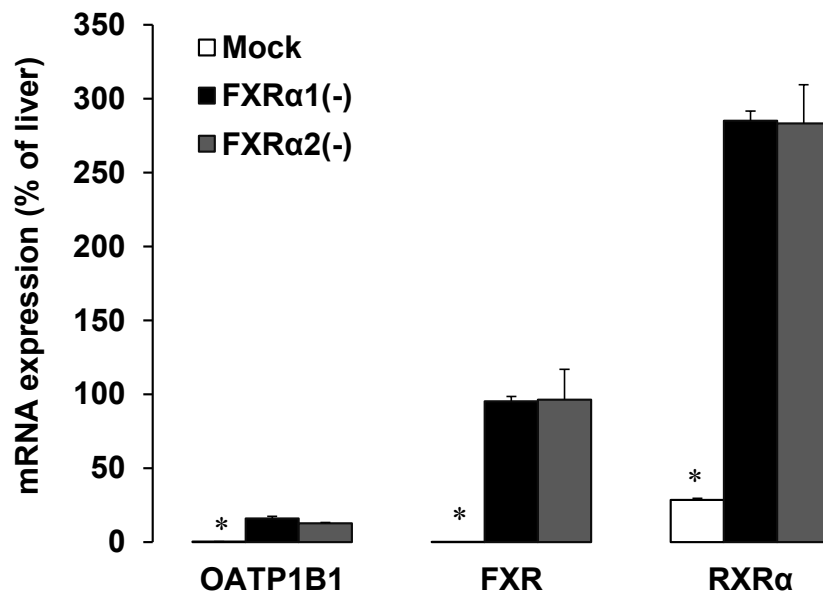
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



7.2.2- Role of FXR in mechanisms of chemoresistance associated to enterohepatic tumors

Enterohepatic tumors are among the most common cancers worldwide and only lung cancer is ahead regarding mortality rate (Ferlay et al., 2007; Ferlay et al., 2010). Independently of their hepatic or intestinal origin, the first therapeutic option for the treatment of these tumors is a surgical resection. However, there are clinical situations in which these tumors are not operable and pharmacological therapy must be used. In this regard, the major problem is the development by the tumor of resistance to treatment with these drugs. Sometimes the tumor develops resistance during the therapeutic process, while in other cases the chemoresistance is present even before the treatment had started. This resistance is due in part to changes in the expression of genes belonging to mechanisms of chemoresistance (MOCs) (Marin et al., 2010). The proteins encoded by these genes are present in normal tissues, as part of cellular defense mechanisms against toxicity induced by endogenous and xenobiotic compounds, as well as in tumor cells, where they may disturb the antitumor effect of chemotherapeutic drugs.

FXR has been traditionally considered as a specific receptor for bile acids (BAs), involved in controlling the expression of genes responsible for maintaining lipid and glucose homeostasis (Lefebvre et al., 2009; Zhang y Edwards, 2008). However, its role in other processes such as the prevention of liver and intestinal tumorigenesis (Kim et al., 2007; Modica et al., 2008), liver regeneration (Chen et al., 2010), the protection of intestinal barrier integrity (Inagaki et al., 2006), the attenuation of cholestasis (Stedman et al., 2006) and the prevention of gallstone formation (Moschetta et al., 2004) has been recently reported. To carry out these functions, this nuclear receptor regulates the expression of several genes including those encoding oxidation enzymes of phase I (CYP3A4) (Gnerre et al., 2004), conjugation enzymes of phase II (UGT2B4 and SULT2A1) (Barbier et al., 2003; Song et al., 2001) and phase III transporters (MRP2 and MDR3) (Huang et al., 2003; Kast et al., 2002). This may suggest a possible role of FXR in the metabolism of xenobiotic compounds. In fact, it has been recently reported that this nuclear receptor may protect cells against toxicity induced by certain xenobiotics (Lee et al., 2010; Noh et al., 2011; Williams et al., 2012).

Since enterohepatic tissues expressed high levels of FXR, and some of its target genes, involved in detoxification, have been associated with MOCs, the aim of this section was to determine whether there exist changes in FXR expression among liver/intestinal tumors and the corresponding healthy tissue, and whether these changes were related to the expression of genes involved in MOCs. Furthermore, due to the different distribution of these isoforms and their differences regarding the up-regulation of FXR target genes found in section 1, we wanted to investigate the expression of FXR isoforms in these tumors and their relationship with MOCs.

The results obtained in this section of the Doctoral Thesis have been published in the two following articles. These results correspond to:

- Figure 1 and Table 1 of the article entitled: “No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors”.
- Figures 2, 5, 6 and 7 of the article entitled: “Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy”.

Barbier, O., Torra, I.P., Sirvent, A., Claudel, T., Blanquart, C., Duran-Sandoval, D., Kuipers, F., Kosykh, V., Fruchart, J.C., Staels, B., 2003. FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* 124, 1926-1940.

Chen, W.D., Wang, Y.D., Zhang, L., Shiah, S., Wang, M., Yang, F., Yu, D., Forman, B.M., Huang, W., 2010. Farnesoid X receptor alleviates age-related proliferation defects in regenerating mouse livers by activating forkhead box m1b transcription. *Hepatology* 51, 953-962.

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P., 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18, 581-592.

Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127, 2893-2917.

Gnerre, C., Blattler, S., Kaufmann, M.R., Looser, R., Meyer, U.A., 2004. Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* 14, 635-645.

Huang, L., Zhao, A., Lew, J.L., Zhang, T., Hrywna, Y., Thompson, J.R., de Pedro, N., Royo, I., Blevins, R.A., Pelaez, F., Wright, S.D., Cui, J., 2003. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem* 278, 51085-51090.

Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R.T., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2006. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3920-3925.

Kast, H.R., Goodwin, B., Tarr, P.T., Jones, S.A., Anisfeld, A.M., Stoltz, C.M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T.M., Edwards, P.A., 2002. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277, 2908-2915.

Kim, I., Morimura, K., Shah, Y., Yang, Q., Ward, J.M., Gonzalez, F.J., 2007. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28, 940-946.

Lee, F.Y., de Aguiar Vallim, T.Q., Chong, H.K., Zhang, Y., Liu, Y., Jones, S.A., Osborne, T.F., Edwards, P.A., 2010. Activation of the farnesoid X receptor provides protection against acetaminophen-induced hepatic toxicity. *Mol Endocrinol* 24, 1626-1636.

Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Staels, B., 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89, 147-191.

Marin, J.J., Romero, M.R., Briz, O., 2010. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr Med Chem* 17, 709-740.

Modica, S., Murzilli, S., Salvatore, L., Schmidt, D.R., Moschetta, A., 2008. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 68, 9589-9594.

Moschetta, A., Bookout, A.L., Mangelsdorf, D.J., 2004. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nature medicine* 10, 1352-1358.

Noh, K., Kim, Y.M., Kim, Y.W., Kim, S.G., 2011. Farnesoid X receptor activation by chenodeoxycholic acid induces detoxifying enzymes through AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of CCAAT/enhancer binding protein beta. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 39, 1451-1459.

Song, C.S., Echchgadda, I., Baek, B.S., Ahn, S.C., Oh, T., Roy, A.K., Chatterjee, B., 2001. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 276, 42549-42556.

Stedman, C., Liddle, C., Coulter, S., Sonoda, J., Alvarez, J.G., Evans, R.M., Downes, M., 2006. Benefit of farnesoid X receptor inhibition in obstructive cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11323-11328.

Williams, J.A., Thomas, A.M., Li, G., Kong, B., Zhan, L., Inaba, Y., Xie, W., Ding, W.X., Guo, G.L., 2012. Tissue specific induction of p62/Sqstm1 by farnesoid X receptor. *PloS one* 7, e43961.

Zhang, Y., Edwards, P.A., 2008. FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett* 582, 10-18.

No Correlation between the Expression of FXR and Genes Involved in Multidrug Resistance Phenotype of Primary Liver Tumors

P. Martínez-Becerra,[†] J. Vaquero,[†] M. R. Romero,^{†,‡} E. Lozano,[†] C. Anadon,[†] R. I. R. Macias,^{†,‡} M. A. Serrano,^{†,‡} N. Grañé-Boladeras,^{‡,§} L. Muñoz-Bellvis,^{||} L. Alvarez,[⊥] B. Sangro,^{‡,#} M. Pastor-Anglada,^{‡,§} and J. J. G. Marin^{*,†,‡}

[†]Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Spain

[§]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^{||}Hepatobiliary and Pancreatic Surgery and Transplant Unit, Salamanca University Hospital, Salamanca, Spain

[⊥]Research Unit, La Paz University Hospital-IdiPAZ, Madrid, Spain

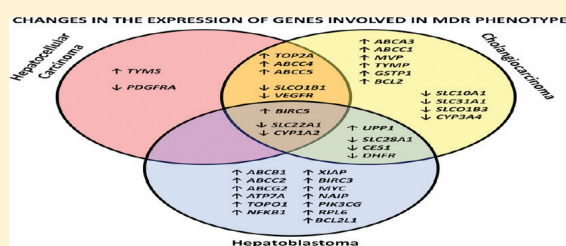
[#]Liver Unit, Clinica Universidad de Navarra, and Division of Hepatology and Gene Therapy, CIMA, Pamplona, Spain

^{*}National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Farnesoid X receptor (FXR) has been recently reported to enhance chemoresistance through bile acid-independent mechanisms. Thus, FXR transfection plus activation with GW4064 resulted in reduced sensitivity to cisplatin-induced toxicity. This is interesting because primary tumors of the liver, an organ where FXR is expressed, exhibit marked refractoriness to pharmacological treatment. Here we have determined whether FXR is upregulated in hepatocellular carcinoma (HCC), cholangiocarcinoma (CGC) and hepatoblastoma (HPB) and whether this is related with the expression of genes involved in mechanisms of chemoresistance. Using RT-QPCR and Taqman low density arrays we have analyzed biopsies from healthy livers or surgically removed tumors from naive patients and cell lines derived from HCC (SK-HEP-1, Alexander and Huh7), CGC (TFK1) and HPB (HepG2), before and after exposure to cisplatin at IC50 for 72 h. In liver tumors FXR expression was not enhanced but significantly decreased (healthy liver > HCC > HPB ≈ CGC). Except for CGC, this was not accompanied by changes in the proportions of FXR isoforms. Changes in 36 genes involved in drug uptake/efflux and metabolism, expression/function of molecular targets, and survival/apoptosis balance were found. Changes affecting *SLC22A1*, *CYP2A1* and *BIRC5* were shared by HCC, CGC and HPB. Similarity in gene expression profiles between cell lines and parent tumors was found. Pharmacological challenge with cisplatin induced changes that increased this resemblance. This was not dependent upon FXR expression. Thus, although FXR may play a role in inducing chemoresistance under certain circumstances, its upregulation does not seem to be involved in the multidrug resistance phenotype characteristic of HCC, CGC and HPB.

KEYWORDS: apoptosis, cancer, drug, metabolism, mutation, pharmacology, refractoriness, transport



INTRODUCTION

Primary liver cancers, which include hepatocellular carcinoma (HCC) and hepatoblastoma (HPB) from hepatocyte-related cells and cholangiocarcinoma (CGC) from cholangiocyte-related cells, together with other less frequent tumors derived from nonepithelial cells, constitute an important cause of death worldwide. The therapy of choice for these tumors is the use of surgery. However, this is not always feasible, and, in these cases, the alternatives are scarce because the efficacy of chemotherapy is very low. Sometimes, tumors develop resistance during the pharmacological treatment by upregulation of genes involved in a variety of mechanisms of chemoresistance (MOC), whereas on many other occasions, chemoresistance is present even before the treatment has begun.

The failure arising from using standard treatments instead of individually adjusted regimens is therefore due in part to our poor knowledge of MOC together with the absence of appropriate tools for predicting this characteristic in each tumor and the lack of efficient drugs for the treatment of these tumors.¹ New efforts to overcome this problem, such as the identification of the actual mechanisms that determine the lack of response to each kind of antitumor drug and the determination of the genetic profile of each tumor before initiating treatment,

Received: January 14, 2012

Revised: March 27, 2012

Accepted: April 23, 2012

Published: April 23, 2012

Molecular Pharmaceutics

as well as the development of more effective anticancer drugs and chemosensitizing agents, are needed.²

The farnesoid X receptor (FXR, gene symbol *NR1H4*), also known as the bile acid receptor (BAR) because it has been considered a specific bile acid sensor, plays a key role in the control of the expression of genes accounting for lipid homeostasis.³ However, we have recently reported that bile acid-independent activation of FXR can be triggered by exposure of liver cells to some toxic compounds, such as cisplatin.⁴ Thus, an interesting question arises as to whether overactivation of this FXR-mediated pathway might be involved in the phenotype of multidrug resistance that is characteristic of HCC, HBP and CGC. FXR is expressed as four isoforms with relative tissue/cell specificity.⁵ Up to now, these isoforms have been classified using inconsistent nomenclatures. Here we have termed them as FXR α 1+, FXR α 1-, FXR α 2+ and FXR α 2- according to their difference in the initial region (exons 1–3) of mRNA (α 1 and α 2) resulting in different initial amino acid sequence (α 1, MGSKMNLIEHSHLPTTDEFSENL; α 2, MVMQFQ-GLENPIQIHPHCSCCTPSGFFMEMMSMKPAK) and the presence (+) or absence (-) of a 12 base pair insert (amino acid sequence: MYTG) at the end of exon 5. Even under physiological circumstances, the functional differences of FXR isoforms are poorly understood. Thus, their role in inducing chemoresistance is completely unknown. Accordingly, the aim of this study was to determine whether FXR and its isoforms are upregulated in HCC, HBP and CGC and whether this is related to the expression of genes involved in MOC of these primary liver cancers.

This is important because the refractoriness to pharmacological treatment of cancer partly depends on the levels of expression of genes involved in MOC, which have been classified according to their potential role in drug uptake (MOC-Ia) or efflux (MOC-Ib), intracellular metabolism affecting prodrug activation or drug inactivation (MOC-II), changes in the expression/functionality of molecular targets (MOC-III), DNA repair machinery (MOC-IV), and reduced activation of apoptosis (MOC-Va) and enhanced expression/activity of antiapoptotic genes (MOC-Vb).¹ To determine gene expression profiles, an alternative to microarrays, which are expensive and generate results difficult to interpret, the use of Taqman low density arrays (TLDA) is becoming popular. This is a modified version of QPCR, in which all the components needed to carry out the reactions are contained in 384 individualized wells. This system enables the design of custom-made plates, depending on the needs of each study, in addition to being a sensitive, reliable, reduced-cost and very fast method. To carry out the present study, 135 genes previously reported to play a role in MOC¹ were analyzed in liver tissue. Based on preliminary studies, 44 genes with expression were omitted due to their negligible expression in liver tissue (data not shown) and 91 genes whose mRNA was detectable were selected (Supplementary Table 1 in the Supporting Information). These together with three normalizers (*18S rRNA*, *GAPDH* and *ACTB*) were included in the design of a novel TLDA able to evaluate the gene expression profiles involved in the lack of response to chemotherapy of HCC, HBP and CGC. In addition to its usefulness for main aim of the present study, the use of TLDA to measure the expression of genes involved in MOC could be an interesting prognostic tool to predict the failure of anticancer pharmacological treatment in the future, when more effective drugs against primary liver tumors could be developed. This issue is

clinically relevant because, on one hand, anticancer drugs have important side effects, and, on the other hand, treatment with noneffective drugs could favor selection of the most chemoresistant clones.

METHODS

Human Samples. Tumor samples from HCC, CGC or HPB were obtained for therapeutic/diagnostic/prognostic purposes from surgically removed tumors or biopsies. The patients had not yet received any antitumor treatment at the time of sample collection. The research protocol, which conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki, was reviewed and approved by the Human Subjects Committee of the University of Salamanca, and written consent was obtained in all cases. Fresh tissue specimens collected in the operating room were immediately immersed in RNAlater solution (Ambion, Life Technologies, Madrid, Spain). In some patients with HCC, biopsies of cirrhotic tissue from the margin of the tumor (CTM) were also analyzed. Biopsies with a confirmed diagnosis of the absence of any liver disease were used as healthy liver tissue for comparative purposes. Approximately the same proportion of males and females was included in all groups.

Cell Cultures. The following human cell lines were used: SK-HEP-1 (HCC), Alexander (HCC), Huh7 (HCC) and HepG2 (HPB) from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA); and TFK1 (CGC) from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). They were cultured with appropriate media in a humidified CO₂:air (5:95%) atmosphere at 37 °C. To calculate the IC50 for cisplatin, approximately 5 × 10³ or 15 × 10³ cells/well (depending on the cell line) were seeded in 96-well plates. To determine cell viability in order to calculate IC50 from dose-response curves, formazan formation from the tetrazolium salt (Thiazolyl Blue tetrazolium bromide, MTT, from Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain) by living cells was used after long-term (72 h) exposure to cisplatin. Cells incubated without or with cisplatin at concentrations close to IC50 (HepG2, 5 μM; Huh7 and TFK1, 25 μM; Alexander and SK-HEP-1, 50 μM) for 72 h at subconfluence were analyzed using TLDA to characterize their expression profiles. Experiments were carried out in triplicate in at least three different cultures per cell line.

Measurement of mRNA Levels. Total RNA extraction from human liver samples and cultured cells was performed as previously described.⁶ Retrotranscription was carried out using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen Barcelona, Spain). QPCR using Ampliqaq Gold polymerase was performed using SYBR Green I detection in an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Madrid, Spain) for single reactions to determine FXR mRNA, or using Taqman low density arrays (TLDA) in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) to analyze expression of MOC. In all cases the following thermal conditions were used: a single cycle of 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. The primer oligonucleotides for FXR and its isoforms (Supplementary Table 2 in the Supporting Information) and for MOC genes together with their appropriate Taqman probes to be included in the microfluidic cards were designed and validated by us (FXR) or by Applied Biosystems (TLDA) (data not shown). As housekeeping genes, *18S rRNA*, *ACTB* and *GAPDH* were included in the TLDA. *18S rRNA* was used as a quality control check among samples and groups. Since the Ct values for *ACTB* and *GAPDH* were closer to those of the target genes,

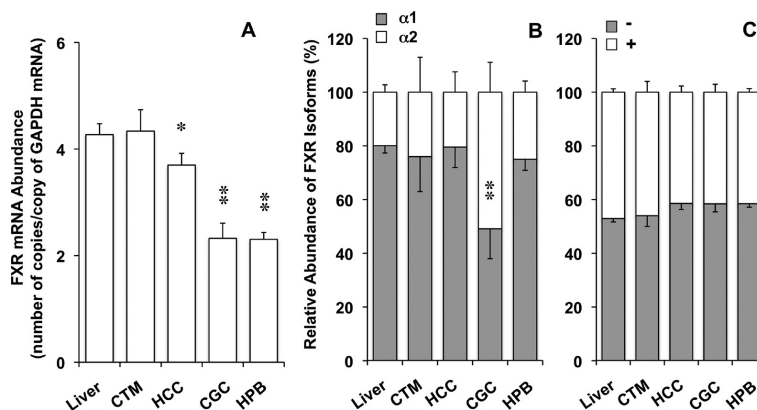


Figure 1. Absolute abundance of FXR mRNA (A) and relative proportions of FXR isoforms classified according to the difference in the initial region (exons 1–3) of mRNA ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) (B) and the presence (+) or absence (–) of a 12 base pairs insert in exon 5 (C). Samples were collected from healthy livers ($n = 13$), hepatocellular carcinomas (HCC, $n = 12$) and their cirrhotic tumor margins (CTM, $n = 5$), cholangiocarcinomas (CGC, $n = 12$) and hepatoblastomas (HPB, $n = 12$). Values are expressed as mean \pm SEM (SD in the case of proportions). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, as compared to healthy livers.

double normalization of the results in each sample was carried out with values obtained for these two genes. Expression levels were calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where ΔCt was the difference of Ct in each sample between the target gene and the normalizer. This was used to calculate $\Delta\Delta Ct$ as the difference in this value between control RNA and that from the experimental groups. In these cases, as control human liver RNA, a pool of more than 10 samples from healthy liver specimens stored in our RNA bank, was used. To carry out absolute determination of the number of mRNA copies of FXR isoforms and GAPDH, each cDNA was obtained by high-fidelity RT, cloned into a pGEMT Easy vector (Promega, Madrid, Spain) and sequenced. This construct was amplified in *Escherichia coli* and used as template to obtain by PCR followed by gel electrophoresis different amounts of a purified fragment to build the standard curves required for absolute determination of mRNA by QPCR.

Statistical Analysis. Comparisons between data regarding FXR expression were carried out by the Bonferroni method of multiple range testing (tumors) or paired *t*-test (cells). To carry out hierarchical clustering, one-way ANOVA was carried out, and to calculate the statistical significance of the differences by the significance analysis of microarrays (SAM) method,⁷ Multi Experiment Viewer software (MeV_4_5, v10.2 for Mac; Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA) was used.⁸

RESULTS

The determination of the abundance of FXR mRNA in HCC, CGC and HPB revealed that this nuclear receptor was not upregulated in these tumors. Instead a significant downregulation was observed (Figure 1A). When FXR isoforms were analyzed, no change in the proportion of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms in HCC and HPB was observed (Figure 1B). However, an increased in the proportion of $\alpha 2$ isoforms in CGC was found. This is consistent with the fact that FXR $\alpha 2$ (\pm) are the predominant isoforms in cells of cholangiocyte lineage, such as in TFK1 cells (Table 1). Regarding the presence of the 4 amino acid insert in FXR, the abundance of + and – isoforms was approximately 50% in healthy liver and this was not changed in any type of tumor (Figure 1C). Regarding total FXR mRNA

Table 1. Expression of FXR and Proportions of Its Isoforms in Liver Cancer Cell Lines^a

	HCC		CGC	HPB	
	SK-HEP-1	Alexander	Huh7	TFK1	HepG2
total FXR mRNA ^b	1	1	5728	34	3837
proportion of isoforms (%)					
$\alpha 1$	ND	ND	99	22	100
$\alpha 2$	ND	ND	1	78	0
–	ND	ND	50	65	54
+	ND	ND	50	35	46

^aValues are average data of absolute mRNA levels in three different cultures measured in triplicate and normalized by the number of copies of GAPDH mRNA. ND, not detected. FXR isoforms are classified according to the difference in the initial region (exons 1–3) of mRNA ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) and the presence (+) or absence (–) of a 12 base pair insert in exon 5. HCC, hepatocellular carcinoma; CGC, cholangiocarcinoma; HPB, hepatoblastoma. ^bCopies/ 10^3 copies GAPDH.

and the distribution of isoforms in CTM, no difference with healthy liver was found (Figure 1C).

Analysis of gene expression profiles in HCC revealed the downregulation of 10 genes and the upregulation of another 11 ones (Figure 2A). Among these 21 changes, only 10 could be associated with enhanced chemoresistance (Figure 2B). These include the downregulation of uptake transporters (*SLC22A1* and *SLCO1B1*), the upregulation of export pumps (*ABCC4* and *ABCC5*), a decreased expression of *CYP1A2*, which is involved in prodrug activation, changes in the expression of molecular targets, such as *TOP2A*, *PDGFRA*, *VEGFR* and *TYMS*, and a marked upregulation of the antiapoptotic gene *BIRC5*. In CGC, the number of genes with significantly different expression patterns as compared with healthy liver was higher, including the upregulation of 16 genes and the downregulation of another 17 genes (Figure 3A). Only 22 of these 33 changes may enhance chemoresistance. These consisted of genes included in MOC-I, -II, -III and -V. As in HCC none of them was involved in DNA repair (MOC-IV) (Figure 3B). Regarding HPB, analysis of gene expression profiles revealed the existence of 25 genes whose expression was significantly different from those found in healthy liver, either up- (17 genes) or downregulated (8 genes) (Figure 4A).

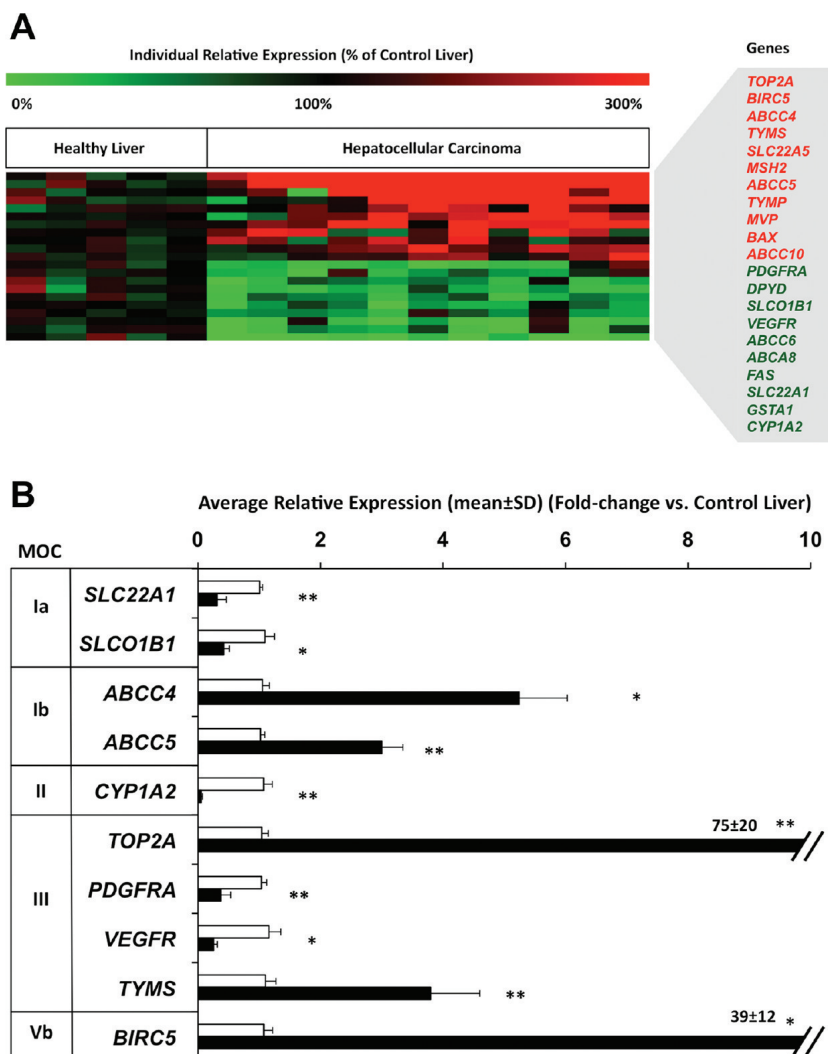


Figure 2. (A) Heat map of the mRNA abundance of the genes involved in resistance to chemotherapy as determined by TLDA in individual healthy livers and hepatocellular carcinomas. Only the genes whose expression levels were significantly different ($p < 0.05$) from those of control livers are depicted. (B) Average values (mean \pm SD) of fold-change in mRNA abundance in healthy livers (open bars, $n = 5$) and hepatocellular carcinomas (closed bars, $n = 11$) versus control liver RNA used as a calibrator. Only the genes whose change in expression levels may determine an increase in chemoresistance are included in the graph. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, tumors versus healthy livers.

Among these changes, only 19 of them were consistent with enhanced chemoresistance in HPB. These genes belonged to MOC-I, -II, -III and -V. As observed in CGC and HCC, the expression of genes involved in DNA repair (MOC-IV) was not significantly affected (Figure 4B).

Three changes described above were shared among HCC, CGC and HPB (Figure 5): the upregulation of *BIRC5*, encoding the antiapoptotic protein survivin, and the downregulation of *SLC22A1* and *CYP1A2*, encoding the organic cation transporter OCT1 and the phase 1 enzyme CYP1A2, respectively. Some changes were only shared by HCC and CGC (the upregulation of *TOP2A*, *ABCC4* and *ABCC5* and the downregulation of *SLCO1B1* and *VEGFR*) or CGC and HPB (the upregulation of *UPP1* and the downregulation of *SLC28A1*, *CES1* and *DHFR*). Changes in gene expression

affecting only HCC and HPB but not CGC were not found. In addition, several changes were characteristic of each tumor (Figure 5).

Since HCC often appears in cirrhotic liver, we investigated whether changes observed in HCC were also present in CTM. The heat map in Figure 6A depicts only genes whose expression in cirrhotic tissue was significantly different from that of healthy livers. Changes affecting *SLC28A3*, *GSTA1* and *BAX* are not expected to induce enhanced chemoresistance because the upregulation of *SLC28A3* and *BAX* presumably determines enhanced drug uptake and activation of apoptosis, respectively, whereas the downregulation of *GSTA1* is consistent with decreased conjugation with glutathione and hence lower drug inactivation. In contrast, the downregulation of *SLC29A1* and *VEGFR* together with the upregulation of *BIRC5* (Figure 6B)

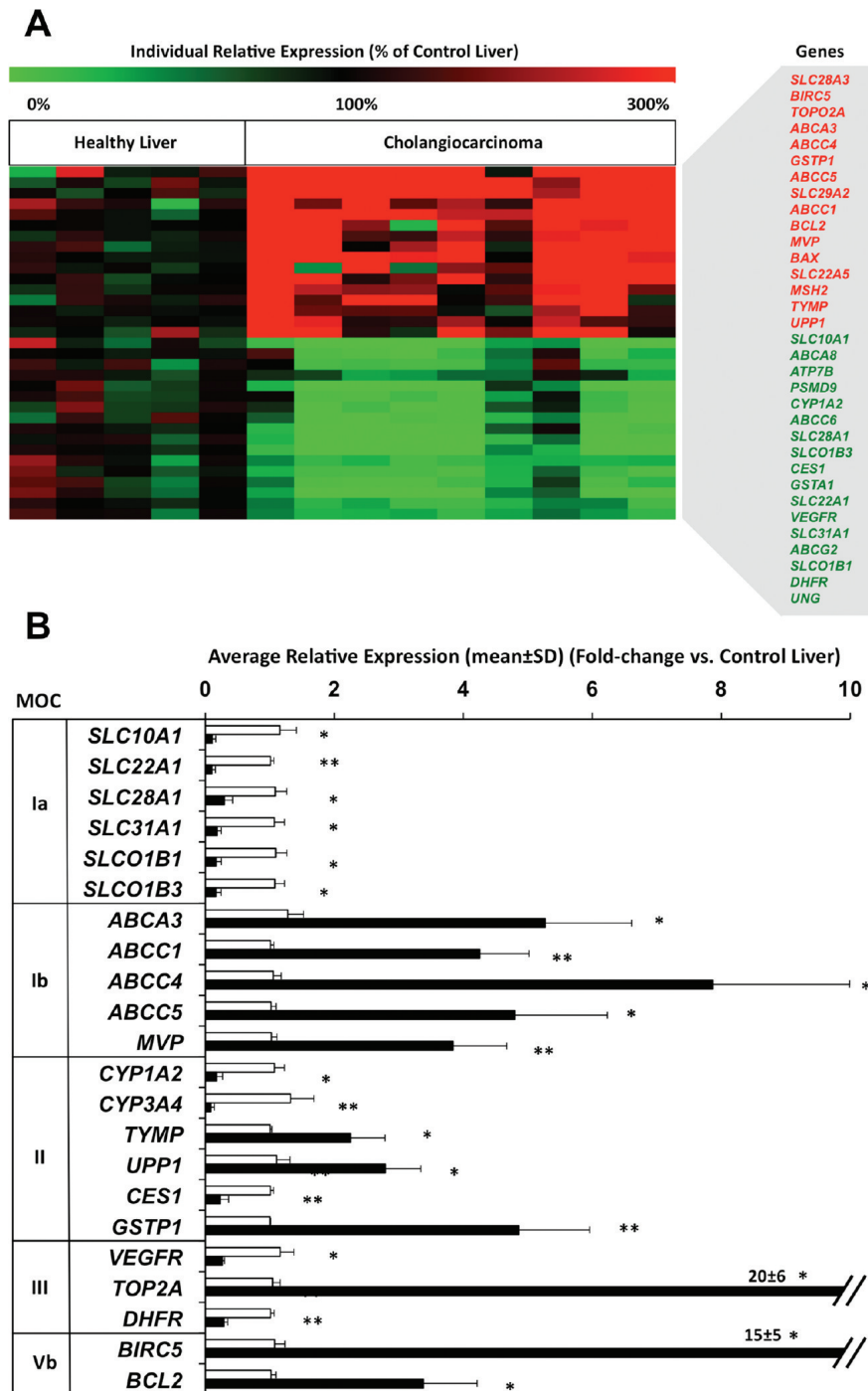


Figure 3. (A) Heat map of the mRNA abundance of the genes involved in resistance to chemotherapy as determined by TLDA in individual healthy livers and cholangiocarcinomas. Only the genes whose expression levels were significantly different ($p < 0.05$) from those of control livers are depicted. (B) Average values (mean \pm SD) of fold-change in mRNA abundance in healthy livers (open bars, $n = 5$) and cholangiocarcinomas (closed bars, $n = 9$) versus control liver RNA used as a calibrator. Only the genes whose change in expression levels may determine an increase in chemoresistance are included in the graph. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, tumors versus healthy livers.

could result in enhanced chemoresistance. Changes in *BIRC5* and *VEGFR* were also observed in HCC.

When gene expression profiles in cells derived from these liver tumors were analyzed and compared with the average

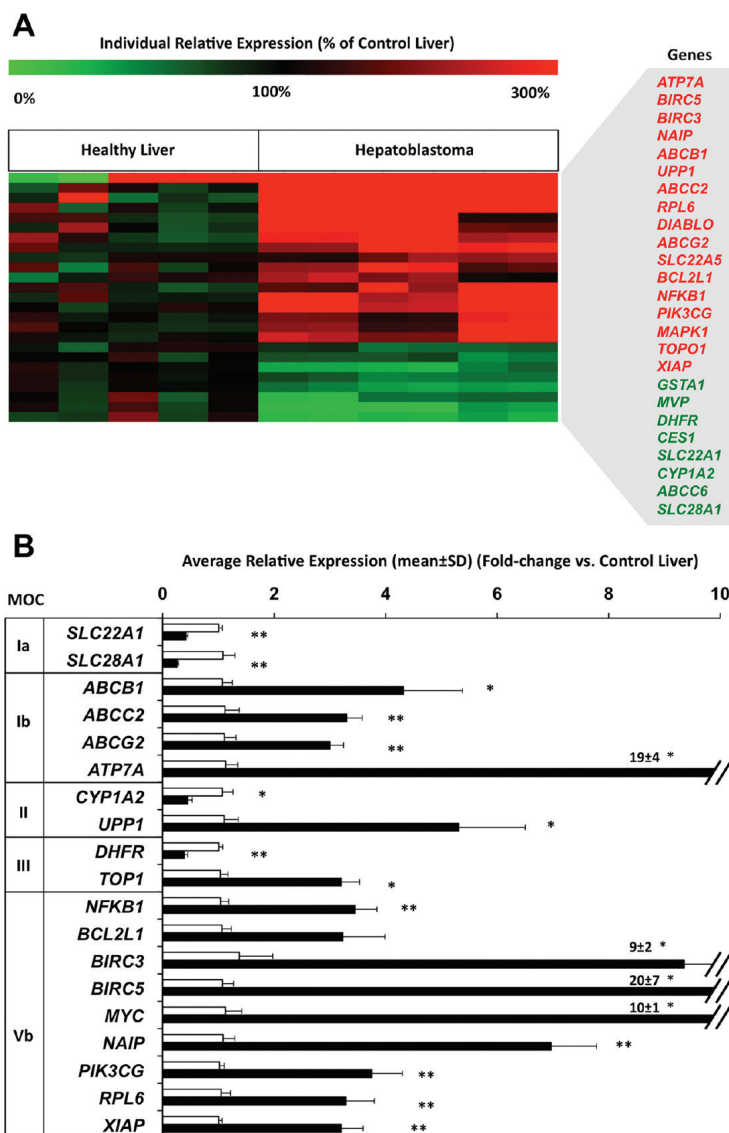


Figure 4. (A) Heat map of the mRNA abundance of the genes involved in resistance to chemotherapy as determined by TLDA in individual healthy livers and hepatoblastomas. Only the genes whose expression levels were significantly different ($p < 0.05$) from those of control livers are depicted. (B) Average values (mean \pm SD) of fold-change in mRNA abundance in healthy livers (open bars, $n = 5$) and hepatoblastomas (closed bars, $n = 6$) versus control liver RNA used as a calibrator. Only the genes whose change in expression levels may determine an increase in chemoresistance are included in the graph. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, tumors versus healthy livers.

values found in clinical samples, a certain similarity with the parent tumor was found (Figure 7). Surprisingly, cell lines with negligible expression of FXR (Table 1), such as SK-HEP-1 and Alexander, displayed higher similarity with their parent tumors than cell lines with high levels of FXR expression, such as Huh7 and HepG2 (Table 1). Regarding FXR isoforms, in cells from hepatocyte lineage (Huh7 and HepG2) FXR α 1(\pm) isoforms were predominant with similar proportion of + and - isoforms, whereas FXR α 2(\pm) isoforms were the most abundant in TFK1 with lower proportion of + isoforms (Table 1).

To investigate changes in the expression profiles regarding MOC after pharmacological challenge, these cells were treated

with cisplatin. This drug was chosen regardless of its actual usefulness in the management of patients with liver cancer because this is a well-known inducer of chemoresistance in most types of tumors assayed. Values of IC₅₀ for each cell line were calculated from dose-response curves (Supplementary Figure 1 in the Supporting Information). Incubation with cisplatin at approximately IC₅₀ for 72 h led to an enhanced expression of several genes and the downregulation of others (Tables 2 and 3). In general, cisplatin-induced pharmacological challenge resulted in expression profiles with increased similarity to those of the parent tumors (Figure 7). Heat maps revealed that SK-HEP-1 and HepG2 had the most marked shift from wild-type phenotype

Molecular Pharmaceutics

Article

CHANGES IN THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN MDR PHENOTYPE

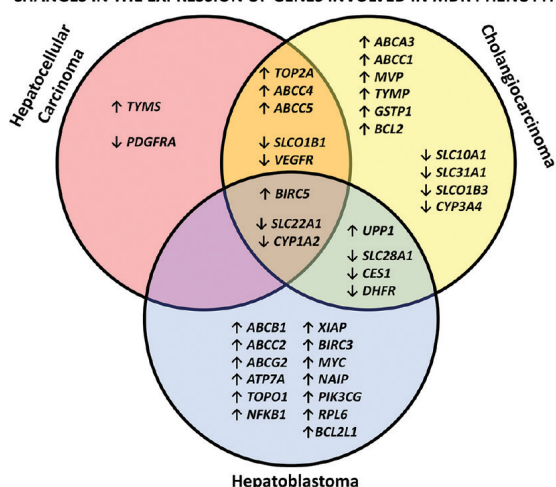


Figure 5. Intersectional scheme of gene expression profiles in hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma and hepatoblastoma, indicating with arrows the statistically significant changes ($p < 0.05$) in the genes involved in enhanced resistance to chemotherapy.

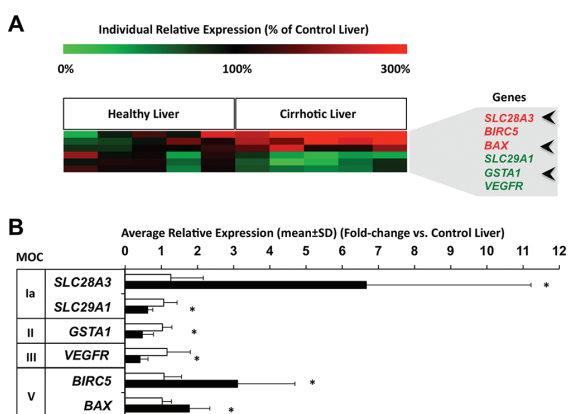


Figure 6. (A) Heat map of the mRNA abundance of the genes involved in resistance to chemotherapy as determined by TLDAs in individual healthy and cirrhotic livers. Only the genes whose expression levels were significantly different ($p < 0.05$) from those of control livers are depicted. (B) Average values (mean \pm SD) of fold-change in mRNA abundance in healthy (open bars, $n = 5$) and cirrhotic livers (closed bars, $n = 5$) versus control liver RNA used as a calibrator. Arrowheads indicate the genes whose observed change in expression is not expected to determine an increase in chemoresistance. *, $p < 0.05$ cirrhotic versus healthy livers.

toward the characteristic expression profile of the parent tumor (HCC and HPB, respectively). Treatment with cisplatin induced more than 10-fold upregulation in 35 genes of SK-HEP-1 cells, 18 in HepG2 cells, 8 in Alexander cells, 5 in TFK1 cells and only 1 in Huh7 cells (Tables 2 and 3).

DISCUSSION

The main findings of this study were as follows: (i) In primary liver cancers and derived cell lines changes in the expression of several genes involved in multidrug resistance phenotype occurred in spite of a significant reduction in the expression of

FXR. (ii) No important change in the balance of expression among FXR isoforms that might justify an increased overall responsiveness of the pathways activated by this nuclear receptor was found. (iii) Moreover, tumor cells responded to pharmacological challenge by activating MOC regardless of the expression of FXR. (iv) Another interesting observation was the considerable heterogeneity in the genetic signatures regarding MOC among the different individuals. This justifies the interest for this type of analysis on an individual basis and even during different stages of the pharmacological treatment of the same tumor. (iv) However, this study also revealed the existence in each group of tumors of some trends toward the upregulation or downregulation of certain genes, as will be discussed below.

Genes included in MOC-Ia belong to the SLC superfamily of transporters that mediate the uptake of a large variety of substrates, including antitumor drugs.⁹ We have found that a shared characteristic of HCC, CGC and HPB was the decreased expression of OCT1 (*SLC22A1*), which is an important carrier in antitumor pharmacology because it is involved in the uptake of tyrosine kinase inhibitors (TKIs), platinum derivatives and probably also anthracyclines.¹⁰ In agreement with previous reports,^{11,12} we observed that an important drug transporter in the liver, OATP1B1, was downregulated in HCC and CGC. Our data provide evidence for a similar tendency in HCC for another member of this family: OATP1B3 (data not shown). This transporter was poorly expressed in CGC, which could be due to the displacement of hepatocytes by tumor cells derived from cholangiocytes that do not express OATP1B3. Both OATP1B1 and OATP1B3 are probably involved in the uptake of some platinum derivatives.¹⁰ CNT1 has been reported to be downregulated in HCC,¹³ and a relationship between a low expression of CNT1, and a reduced uptake of nucleoside derivatives, such as gemcitabine, has been reported.^{13,14} Owing to the high variability in CNT1 expression levels among HCC samples analyzed here the observed trend to downregulation of this transporter was not statistically significant. In contrast, this change was very consistent and statistically significant in both CGC and HPB. The expression of CTR1 (*SLC31A1* gene), which is involved in the uptake of platinum-derived drugs,¹⁵ was only significantly modified in CGC.

The genes included in MOC-Ib encode several members of the superfamily of ABC proteins involved in the efflux of large variety of anticancer drugs from tumor cells.¹⁶ The poor response of HCC to chemotherapy has been correlated with a high expression of MDR1 (*ABCB1*),¹⁷ which is able to export TKIs, anthracyclines, camptothecins, podophyllotoxins and antiestrogenic drugs.¹⁰ In the present study, the expression of MDR1 was similar in HCC, CGC and healthy liver but was markedly elevated in HPB. Although with marked interindividual variability, the enhanced expression of MRP3 (*ABCC3*) in HCC has been described.¹³ Here we have found that other members of the same family were upregulated in primary liver cancers (MRP4 and MRP5 in HCC, MRP1, MRP4 and MRP5 in CGC, and MRP2 in HPB). MRP1 is able to export anthracyclines, camptothecins and podophyllotoxins. MRP2 is particularly important in chemoresistance to platinum derivatives.¹⁰ Some of these substrates could be also transported by MRP4 and MRP5, which would add their particular contribution to the export of TKIs (MRP4) and nucleoside derivatives (MRP5).¹⁰ The breast cancer resistance protein (BCRP, gene symbol *ABCG2*) plays an important role in the

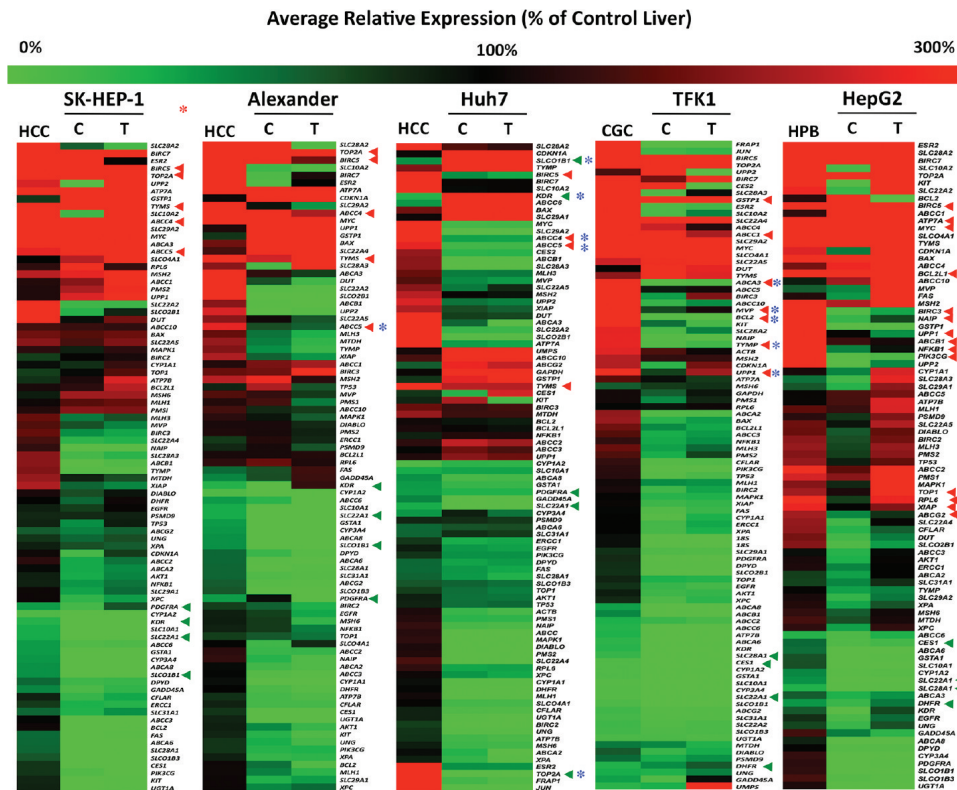


Figure 7. Heat map of the mRNA abundance of the genes involved in resistance to chemotherapy as determined by TLDA in liver cancer cell lines cultured under control conditions (C) and after treatment with cisplatin (at IC50 for each cell line) for 72 h (T). Expression levels in cell lines were compared with the average values found in the type of tumor from which the cells were derived: SK-HEP-1, Alexander and Huh7 cells from hepatocellular carcinoma (HCC), TFK1 cells from cholangiocarcinoma (CGC), and HepG2 from hepatoblastoma (HPB). Average values from three different cultures carried out in duplicate are expressed as mean fold-change in mRNA abundance versus control liver used as a calibrator. Arrowheads indicate genes whose expression was significantly upregulated (red arrowheads) or downregulated (green arrowheads) in the parent tumor as compared with healthy liver. An asterisk is depicted when a similar change was not present in the cell line.

resistance to TKIs, anthracyclines and camptothecins.¹⁰ This pump was expressed but not upregulated in all tumors except HPB where an increased expression was observed. Menkes (ATP7A) and Wilson (ATP7B) proteins, which do not belong to the ABC superfamily, are able to export platinum-derived drugs.¹⁸ Our results are in agreement with previous studies reporting the upregulation of these pumps in cell lines and tumors chronically exposed to cisplatin.^{19,20} As expected, the expression of *ATP7B* in the liver was higher than that of *ATP7A* (data not shown). Whereas the expression of both genes in HCC and CGC remained unchanged, the expression of *ATP7A* in HPB was enhanced. Lung resistance-related protein (LRP) or major vault protein (MVP) is not a membrane transporter but it is able to reduce the intracellular amount of active drugs, such as anthracyclines, through a mechanism of sequestration.²¹ Our results indicate that the expression of MVP was relatively low in healthy liver and that it remained unchanged in HCC and HPB but was enhanced in CGC.

MOC-II includes enzymes involved in intracellular drug metabolism, playing a role in drug detoxification or in the biotransformation of prodrugs into their active forms. Owing to the importance of cytochrome P450 in phase I detoxification, it is important to note that the expression of genes encoding these enzymes, mainly *CYP1A2*, was decreased in all tumors

studied here. These findings were consistent with a previous report on *CYP3A4* downregulation in HCC.²² It should be taken into account that the activity of cytochrome P450 enzymes is determined not only by their expression levels but also by the existence of polymorphisms that strongly influences their enzymatic activity.²³ This is the case of *CYP1A1* and *CYP1A2*, which are involved in the metabolism of TKIs.¹⁰ Glutathione *S*-transferases are involved in phase II detoxification of many antitumor drugs, such as platinum derivatives and anthracyclines.¹⁰ *GSTA* is the most abundant isoform in healthy liver. However, several studies have suggested that *GSTp* may become the predominant isoform in HCC.²⁴ This has been confirmed in experimental models of HCC.²⁵ In all types of primary liver cancer examined here, a downregulation of *GSTA* was found, whereas upregulation of *GSTp* was observed only in CGC. Dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPYD*) and subunits 1 and 2 of uridine phosphorylase (*UPP1* and *UPP2*) are involved in nucleotide metabolism and play a role in biotransformation reactions affecting the activity of nucleoside analogues. A tendency toward a lower expression in HCC as compared to healthy liver was found (data not shown). In contrast, the expression of *UPP1* was enhanced in HCC and HPB. These enzymes determine the efficacy of drugs such as 5'-deoxy-5-fluorouridine, which needs to be activated by

Table 2. Cisplatin Treatment-Induced Change in the Expression Levels of the Genes Involved in Mechanisms of Chemoresistance (MOC) I, II and III in Liver Cancer Cell Lines^a

MOC	genes	HCC			CGC	HPB
		SK-HEP-1	Alexander	Huh7	TFK1	HepG2
Ia	SLC10A1	++++	++++			++++
Ia	SLC10A2	++++	++		+	++++
Ia	SLCO1B1	++++	+		-	
Ia	SLCO1B3	++++	+			-
Ia	SLCO2B1	++++	+			+
Ia	SLCO4A1	+	+			
Ia	SLC22A1	++++			++	+
Ia	SLC22A2	++			+	++++
Ia	SLC22A4	-			+	+
Ia	SLC22A5	+				+
Ia	SLC28A1	++	+		+	
Ia	SLC28A2	++++	-		+	++
Ia	SLC28A3	+	+		++	++
Ia	SLC29A1					+
Ia	SLC29A2	++	-			+
Ia	SLC31A1	++				
Ib	ABCA2	++				
Ib	ABCA3	+	+		+	
Ib	ABCA6	++++	+			++
Ib	ABCA8	++++	++			
Ib	ABCB1	++++	++++			
Ib	ABCC1					+
Ib	ABCC10				+	+
Ib	ABCC2	+				+
Ib	ABCC3	+++	-			+
Ib	ABCC4					+
Ib	ABCC5	+				+
Ib	ABCC6	++++				+
Ib	ABCG2	+++				
Ib	ATP7A	+	+			
Ib	ATP7B	++	+			
Ib	LRP/MVP	+				++
II	DPYD	+++			-	
II	TYMP				-	+
II	UPP1	-			+	-
II	UPP2	++++	++++		-	++++
II	CYP1A1	++++			++	+
II	CYP1A2	++++	++		-	+++
II	CYP3A4	++++	+		+	+++
II	UGT1A		+			++
II	CES1	++++	++++		-	+
II	GSTA1	++++	+			++
II	GSTP1					++
III	DHFR	++				+
III	ESR2	++++	-		+	-
III	KIT	++	+		-	++++
III	PDGFRA	++++				++
III	TOP1					+
III	TOP2A				-	
III	TYMS					+
III	VEGFR/KDR		+			++++

^aValues are fold-change in mRNA levels in treated versus nontreated cells. Only increases of ≥ 2 fold-change (+, ≥ 2 ; ++, ≥ 10 ; +++, ≥ 50 ; +++++, ≥ 100) and decrease of ≤ 0.5 (-) have been included in the table. HCC, hepatocellular carcinoma; CGC, cholangiocarcinoma; HPB, hepatoblastoma.

Table 3. Cisplatin Treatment-Induced Change in the Expression Levels of the Genes Involved in Mechanisms of Chemoresistance (MOC) IV and V in Liver Cancer Cell Lines^a

MOC	genes	HCC			CGC	HPB
		SK-HEP-1	Alexander	Huh7	TFK1	HepG2
IV	ERCC1				+	+
IV	XPA	+			+	+
IV	XPC				+	+
IV	UNG/UDG	+				+
IV	DUT	+				+
IV	MLH1	+				
IV	MLH3	+				+
IV	PMS1	+				
IV	PMS2				+	+
IV	GTBP	+				
IV	GADD45A	-	+		++	-
Va	BAX	-				+
Va	TP53		+		+	
Va	CDKN1A	-	+			++
Va	PSMD9					+
Va	FAS		++		+	++
Va	BCL2	++	-		-	-
Va	BCL2L1	++	+		-	
Va	Smac/DIABLO					+
Va	AEG1	+				
Va	BIRC2				+	+
Va	BIRC3					+
Vb	XIAP	+				
Vb	NAIP	++	+		-	+
Vb	BIRC5					-
Vb	BIRC7	++++	+	++	+	+++
Vb	CFLAR	++				+
Vb	RPL6		-			+
Vb	NFKB1	+				
Vb	AKT1	+				+
Vb	PIK3CG	+	-			+
Vb	MAPK1					+
Vb	MYC	+				
Vb	EGFR	+				+

^aValues are fold-change in mRNA levels in treated versus nontreated cells. Only increases of ≥ 2 fold-change (+, ≥ 2 ; ++, ≥ 10 ; +++, ≥ 50 ; +++++, ≥ 100) and decrease of ≤ 0.5 (-) have been included in the table. HCC, hepatocellular carcinoma; CGC, cholangiocarcinoma; HPB, hepatoblastoma.

biotransformation into 5-fluorouracil.^{26,27} Another differential characteristic of CGC and HPB with respect to HCC was the decreased expression of carboxylesterase 1 (CES1) in CGC and HPB, which may limit the ability of these tumors to activate irinotecan as well as other carboxylesterase-dependent prodrugs.²⁸

In healthy liver tissue, the expression of genes encoding molecular targets for antitumor drugs (MOC-III) was particularly high for dihydrofolate reductase (DHFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFRA), topoisomerase I (TOPO-I) and thymidylate synthetase (TYMS). Down-regulation of DHFR was a shared characteristic of CGC and HPB, which may account for the reduced effect of DHFR inhibitors, such as methotrexate.²⁹ PDGFRA and VEGFR play a key role in angiogenesis and in the maintenance of a favorable environment for liver tumor growth.^{30,31} This explains why

Molecular Pharmaceutics

both receptors constitute the target of vectorized therapies based on TKIs, such as imatinib and sorafenib, and monoclonal antibodies, such as cetuximab and bevacizumab.¹⁰ In a previous study on HCC, upregulation of PDGFRA was found in 70% of the tumors studied.³² In contrast, in our HCC series average downregulation of this receptor was observed. This discrepancy was probably due to the marked interindividual variability in the expression of MOC-III genes. This also concerned the expression of VEGFR, which was enhanced in some of the HCC samples studied here, whereas the trend toward downregulation was a more common characteristic in both HCC and CGC. The key role of TOP2A in cell proliferation makes of it a molecular target for important antitumor drugs, such as daunorubicin and doxorubicin. Increased expression of TOP2A could compensate the effect of these compounds and contribute to the lack of sensitivity to these drugs. Previous studies have associated the overexpression of TOP2A with enhanced tumor aggressiveness,³³ early age onset, shorter patient survival, and chemoresistance.³⁴ In the present study, overexpression TOP2A in HCC and CGC was remarkable, due not only to the magnitude of the change but also to the consistency of the finding.

Drugs inducing DNA damage constitute an important therapeutic alternative in the treatment of cancer. MOC-IV includes proteins involved in DNA repair, which may result in enhanced resistance to these drugs. The changes observed in these genes were of low relevance in HCC, CGC and HPB because a minimal increase or even a reduction in their expression was found. Nevertheless, the importance of MOC-IV may change during pharmacological treatment. Several studies have shown that chronic treatment with cisplatin could induce the expression of many MOC-IV genes.^{35–38} Thus, in the present study HepG2 cells were found to be very sensitive to treatment with cisplatin, which induced a marked and generalized increase in the expression of the genes included in MOC-IV.

Cisplatin, cytarabine, etoposide, doxorubicin and many other antitumor drugs act in part by inducing apoptosis in tumor cells.³⁹ Therefore, changes in genes that enhance survival and reduce the activation of apoptosis (MOC-V) generally result in resistance to chemotherapy.^{40,41} In healthy liver tissue the expression of these genes was very variable. The highest expression levels were found for genes encoding metadherin (MTDH), the long isoform of antiapoptotic factor (BCL-X), serine/threonine kinase (AKT1) and epidermal growth factor receptor (EGFR). The other genes included in MOC-V showed low expression. This was particularly poor in the case of genes *BIRC5* and *BIRC7*, which encode survivin and livin, respectively. In contrast to healthy liver and enhanced expression of survivin that occurred in HCC,⁴² which has been correlated with a higher proliferative capacity of the tumor,⁴³ in the present study, a marked and consistent upregulation of *BIRC5* was a shared characteristic of HCC, CGC and HPB.

The results obtained in the different cell lines revealed similarities with the expression profiles found in parent tumors. The case of survivin is remarkable. Another interesting observation concerns *BIRC7*. The expression of this gene was not always increased in untreated patients, but it was consistently upregulated in all cell lines in response to treatment with cisplatin.

In conclusion, although preliminary evidence suggests that enhanced expression of FXR may be involved in induced chemoresistance through bile acid-independent mechanisms and may play a role in protecting healthy tissues from the toxicity of

certain agents,⁴ FXR upregulation in HCC, CGC and HPB does not seem to be required for the expression of the multidrug resistance phenotype characteristic of these tumors. Moreover, two important lines of investigation are suggested from the present study: to explore the usefulness as molecular targets for chemosensitization of key genes reported here and to elucidate the actual role of FXR as inducer of chemoprotection in healthy liver tissue and whether FXR downregulation is a late event in tumorigenesis.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Plot of cell viability as a function of cisplatin concentration, table of genes included in the Taqman low density arrays, and table of specific primers used for the PCR analyses. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Department of Physiology and Pharmacology, Campus Miguel de Unamuno EID S-09, 37007-Salamanca, Spain. Tel: 34-923-294674. Fax: 34-923-294669. E-mail: jgmarin@usal.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank N. Skinner for revising the English spelling, grammar and style of the manuscript. This study was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grants CP05/0135 and PI080151); the Generalitat de Catalunya (2009SGR624) and the Junta de Castilla y Leon (Grants GR75/08, Biomedicina2011, BIO39/SA27/10, SA023A11-2 and SA070A11-2), Spain; the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Grants SAF2009-08493, SAF2010-15517 and SAF2008-00577), Spain; and the Fundación Investigación Médica, Mutua Madrileña (Convocatoria 2009), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), cofunded by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant BFU2007-30688-E/BFI) and belongs to the CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas) Instituto de Salud Carlos III, Spain.

■ ABBREVIATIONS USED

CGC, cholangiocarcinoma; FXR, farnesoid X receptor; HCC, hepatocellular carcinoma; HPB, hepatoblastoma; MOC, mechanism of chemoresistance; CTM, cirrhotic tissue from margin tumor; TKIs, Tyrosine kinase inhibitors; TLDA, Taqman low density array

■ REFERENCES

- (1) Marin, J. J.; Romero, M. R.; Martínez-Becerra, P.; Herraiz, E.; Briz, O. Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Curr. Mol. Med.* **2009**, *9* (9), 1108–29.
- (2) Marin, J. J.; Castano, B.; Blazquez, A. G.; Rosales, R.; Efferth, T.; Monte, M. J. Strategies for overcoming chemotherapy resistance in enterohepatic tumours. *Curr. Mol. Med.* **2010**, *10* (5), 467–85.

- (3) Kemper, J. K. Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1812* (8), 842–50.
- (4) Monte, M. J.; Serrano, M. A.; Herraes, E.; Vaquero, J.; Gonzalez-Sanchez, E.; Romero, M. R.; Rosales, R. R.; Blazquez, A. G.; Perez, M. J.; Macias, R. I. R.; Sanchez-Vicente, L.; Lozano, E.; Jimenez, F.; Gonzalez-San Martin, F.; Muntane, J.; Briz, O.; Marin, J. J. G. Chemoresistance can be induced by bile acid-independent activation of FXR in liver and intestinal cancer cells. *Hepatology* **2011**, *54* (4(S)), 713–4.
- (5) Eloranta, J. J.; Kullak-Ublick, G. A. The role of FXR in disorders of bile acid homeostasis. *Physiology (Bethesda)* **2008**, *23*, 286–95.
- (6) Macias, R. I.; Hierro, C.; Cuesta de Juan, S.; Jimenez, F.; Gonzalez-San Martin, F.; Marin, J. J. Hepatic expression of sodium-dependent vitamin C transporters: ontogeny, subtissular distribution and effect of chronic liver diseases. *Br. J. Nutr.* **2011**, 1–12.
- (7) Tusher, V. G.; Tibshirani, R.; Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98* (9), 5116–21.
- (8) Saeed, A. I.; Bhagabati, N. K.; Braisted, J. C.; Liang, W.; Sharov, V.; Howe, E. A.; Li, J.; Thiagarajan, M.; White, J. A.; Quackenbush, J. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol.* **2006**, *411*, 134–93.
- (9) Huang, Y.; Sadee, W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett.* **2006**, *239* (2), 168–82.
- (10) Marin, J. J.; Romero, M. R.; Briz, O. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (8), 709–40.
- (11) Kinoshita, M.; Miyata, M. Underexpression of mRNA in human hepatocellular carcinoma focusing on eight loci. *Hepatology* **2002**, *36* (2), 433–8.
- (12) Vavricka, S. R.; Jung, D.; Fried, M.; Grutzner, U.; Meier, P. J.; Kullak-Ublick, G. A. The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **2004**, *40* (2), 212–8.
- (13) Zollner, G.; Wagner, M.; Fickert, P.; Silbert, D.; Fuchsbichler, A.; Zatloukal, K.; Denk, H.; Trauner, M. Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* **2005**, *25* (2), 367–79.
- (14) Garcia-Manteiga, J.; Molina-Arcas, M.; Casado, F. J.; Mazo, A.; Pastor-Anglada, M. Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine-induced cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9* (13), 5000–8.
- (15) Holzer, A. K.; Samimi, G.; Katano, K.; Naerdmann, W.; Lin, X.; Safaei, R.; Howell, S. B. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66* (4), 817–23.
- (16) Chan, L. M.; Lowes, S.; Hirst, B. H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21* (1), 25–51.
- (17) Cho, C. W.; Liu, Y.; Yan, X.; Henthorn, T.; Ng, K. Y. Carrier-mediated uptake of rhodamine 123: implications on its use for MDR research. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *279* (1), 124–30.
- (18) Safaei, R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett.* **2006**, *234* (1), 34–9.
- (19) Ohbu, M.; Ogawa, K.; Konno, S.; Kanzaki, A.; Terada, K.; Sugiyama, T.; Takebayashi, Y. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human gastric carcinoma. *Cancer Lett.* **2003**, *189* (1), 33–8.
- (20) Monte, M. J.; Ballester, M. R.; Briz, O.; Perez, M. J.; Marin, J. J. Proapoptotic effect on normal and tumor intestinal cells of cytostatic drugs with enterohepatic organotropism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315* (1), 24–35.
- (21) Steiner, E.; Holzmann, K.; Elbling, L.; Micksche, M.; Berger, W. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr. Drug Targets* **2006**, *7* (8), 923–34.
- (22) Haas, S.; Merkelbach-Bruse, S.; Justenhoven, C.; Brauch, H.; Fischer, H. P. Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in hepatocellular tumors of the non-cirrhotic liver. *Pathol. Res. Pract.* **2009**, *205* (10), 716–25.
- (23) Smith, C. A.; Smith, G.; Wolf, C. R. Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism. *Eur. J. Cancer* **1994**, *30A* (13), 1921–35.
- (24) Howie, A. F.; Forrester, L. M.; Glancey, M. J.; Schlager, J. J.; Powis, G.; Beckett, G. J.; Hayes, J. D.; Wolf, C. R. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues. *Carcinogenesis* **1990**, *11* (3), 451–8.
- (25) Monte, M. J.; Palomero, F.; Sainz, G. R.; Dominguez, M.; Diez, M.; Torano, A.; Marin, J. J. Bile acid secretion during rat liver carcinogenesis. *Life Sci.* **2000**, *66* (12), 1085–95.
- (26) Peters, G. J.; Laurensse, E.; Leyva, A.; Lankelma, J.; Pinedo, H. M. Sensitivity of human, murine, and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.* **1986**, *46* (1), 20–8.
- (27) Ishitsuka, H.; Miwa, M.; Takemoto, K.; Fukuoka, K.; Itoga, A.; Maruyama, H. B. Role of uridine phosphorylase for antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Gann* **1980**, *71* (1), 112–23.
- (28) Tanimoto, K.; Kaneyasu, M.; Shimokuni, T.; Hiyama, K.; Nishiyama, M. Human carboxylesterase 1A2 expressed from carboxylesterase 1A1 and 1A2 genes is a potent predictor of CPT-11 cytotoxicity in vitro. *Pharmacogenet. Genomics* **2007**, *17* (1), 1–10.
- (29) Li, R.; Sirawaraporn, R.; Chitnunsub, P.; Sirawaraporn, W.; Wooden, J.; Athappilly, F.; Turley, S.; Hol, W. G. Three-dimensional structure of M. tuberculosis dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295* (2), 307–23.
- (30) Oseini, A. M.; Roberts, L. R. PDGFRalpha: a new therapeutic target in the treatment of hepatocellular carcinoma? *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13* (4), 443–54.
- (31) Marijon, H.; Faivre, S.; Raymond, E. Targeted therapies in hepatocellular carcinomas: recent results and future development. *Bull. Cancer* **2009**, *96* (5), 553–61.
- (32) Stock, P.; Monga, D.; Tan, X.; Micsenyi, A.; Loizos, N.; Monga, S. P. Platelet-derived growth factor receptor-alpha: a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6* (7), 1932–41.
- (33) Watanuki, A.; Ohwada, S.; Fukusato, T.; Makita, F.; Yamada, T.; Kikuchi, A.; Morishita, Y. Prognostic significance of DNA topoisomerase IIalpha expression in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* **2002**, *22* (2B), 1113–9.
- (34) Wong, N.; Yeo, W.; Wong, W. L.; Wong, N. L.; Chan, K. Y.; Mo, F. K.; Koh, J.; Chan, S. L.; Chan, A. T.; Lai, P. B.; Ching, A. K.; Tong, J. H.; Ng, H. K.; Johnson, P. J.; To, K. F. TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *Int. J. Cancer* **2009**, *124* (3), 644–52.
- (35) Delmastro, D. A.; Li, J.; Vaisman, A.; Solle, M.; Chaney, S. G. DNA damage inducible-gene expression following platinum treatment in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *39* (3), 245–53.
- (36) Ding, X.; Mohd, A. B.; Huang, Z.; Baba, T.; Bernardini, M. Q.; Lyrly, H. K.; Berchuck, A.; Murphy, S. K.; Buermeier, A. B.; Devi, G. R. MLH1 expression sensitises ovarian cancer cells to cell death mediated by XIAP inhibition. *Br. J. Cancer* **2009**, *101* (2), 269–77.
- (37) Fink, D.; Aebi, S.; Howell, S. B. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4* (1), 1–6.
- (38) Melton, D. W.; Ketchen, A. M.; Nunez, F.; Bonatti-Abbondandolo, S.; Abbondandolo, A.; Squires, S.; Johnson, R. T. Cells from ERCC1-deficient mice show increased genome instability and a reduced frequency of S-phase-dependent illegitimate chromosome exchange but a normal frequency of homologous recombination. *J. Cell Sci.* **1998**, *111* (Part 3), 395–404.
- (39) Ormerod, M. G.; O'Neill, C.; Robertson, D.; Kelland, L. R.; Harrap, K. R. cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, *37* (S), 463–71.

Molecular Pharmaceutics

(40) Segal-Bendirdjian, E.; Jacquemin-Sablon, A. Cisplatin resistance in a murine leukemia cell line is associated with a defective apoptotic process. *Exp. Cell Res.* **1995**, *218* (1), 201–12.

(41) Bunz, F. Cell death and cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, *1* (4), 337–41.

(42) Peroukides, S.; Bravou, V.; Alexopoulos, A.; Varakis, J.; Kalofonos, H.; Papadaki, H. Survivin overexpression in HCC and liver cirrhosis differentially correlates with p-STAT3 and E-cadherin. *Histol. Histopathol.* **2010**, *25* (3), 299–307.

(43) Augello, C.; Caruso, L.; Maggioni, M.; Donadon, M.; Montorsi, M.; Santambrogio, R.; Torzilli, G.; Vaira, V.; Pellegrini, C.; Roncalli, M.; Coggi, G.; Bosari, S. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 125.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pharmacological Research

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

Up-regulation of FXR isoforms is not required for stimulation of the expression of genes involved in the lack of response of colon cancer to chemotherapy

P. Martínez-Becerra^a, I. Monte^a, M.R. Romero^{a,e}, M.A. Serrano^{a,e}, J. Vaquero^a, R.I.R. Macias^{a,e}, A. Del Rio^b, N. Grañé-Boladeras^{c,e}, F. Jimenez^{a,d,e}, F. Gonzalez San-Martin^{a,d,e}, M. Pastor-Anglada^{c,e}, J.J.G. Marin^{a,e,*}

^a Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Spain

^b Gastroenterology Unit, Sanatorio Sagrado Corazón de Jesús, Valladolid, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^d Gastroenterology Department, Liver Unit, Salamanca University Hospital, Salamanca, CIBERehd, Spain

^e National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2012

Received in revised form 28 June 2012

Accepted 31 July 2012

Keywords:

Chemoresistance
Colorectal adenocarcinoma
MDR phenotype
Taqman Low-Density Arrays
Tumour

ABSTRACT

Several mechanisms are involved in the poor response of colorectal adenocarcinoma (CRAC) to pharmacological treatment. Since preliminary evidences have suggested that the enhanced expression of farnesoid X receptor (FXR) results in the stimulation of chemoresistance, we investigated whether FXR up-regulation is required for the expression of genes that characterize the multidrug resistance (MDR) phenotype of CRAC. Samples of tumours and adjacent healthy tissues were collected from naive patients. Using Taqman Low-Density Arrays, the abundance of mRNA of 87 genes involved in MDR was determined. Relevant changes were re-evaluated by conventional RT-QPCR. In healthy tissue the major FXR isoforms were FXR α 2(+/-) (80%). In tumours this predominance persisted (91%) but was accompanied by a consistent reduction (3-fold) in total FXR mRNA. A lower FXR expression was confirmed by immunostaining, in spite of which there was a significant change in the expression of MDR genes. Pharmacological challenge was simulated "in vitro" using human CRAC cells (LS174T cells). Short-term (72 h) treatment with cisplatin slightly increased the almost negligible expression of FXR in wild-type LS174T cells, whereas long-term (months) treatment induced a cisplatin-resistant phenotype (LS174T/R cells), which was accompanied by a 350-fold up-regulation of FXR, mainly FXR α 1(+/-). However, the changed expression of MDR genes in LS174T/R cells was not markedly affected by incubation with the FXR antagonist Z-guggulsterone. In conclusion, although the enhanced expression of FXR may be involved in the stimulation of chemoresistance that occurs during pharmacological treatment, FXR up-regulation is not required for the presence of the MDR phenotype characteristic of CRAC.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

When data regarding both sexes are considered together, colorectal adenocarcinoma (CRAC) is the third most common cancer in Western countries, after lung cancer (more frequent in men) and breast cancer (more frequent in women). Moreover, CRAC is the second leading cause of death due to cancer [1]. Recent advances

have permitted improvements in early diagnosis, which is particularly important in this case because surgery can be curative in more than 90% of patients with CRAC if they are diagnosed during the early stages [2]. The treatment of choice for CRAC is resection of the affected segment. Nevertheless, neoadjuvant radiochemotherapy is often useful for reducing local-regional recurrences and chemotherapy improves the prognosis of patients with advanced CRAC [2], which has contributed to the fact that, in recent years, the median survival time in patients with metastases due to CRAC has increased from 5 to 24 months [3]. However, although the rate of success of pharmacological regimens in the treatment of CRAC is higher than in other gastrointestinal tumours, cancer cells often develop resistance during the pharmacological treatment through up-regulation of the genes involved in a variety of mechanisms of chemoresistance (MOCs), whereas on many other occasions chemoresistance is present even before treatment has begun [4].

Abbreviations: CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum(II); CRAC, colorectal adenocarcinoma; 5-FU, 5-fluorouracil; FXR, farnesoid X receptor; MDR, multidrug resistance; MOC, mechanism of chemoresistance; TKI, tyrosine kinase inhibitor; TLDA, Taqman Low-Density Array.

* Corresponding author at: Department of Physiology and Pharmacology, Campus Miguel de Unamuno E.I.D. S-09, 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923 294674; fax: +34 923 294669.

E-mail address: jjgmarin@usal.es (J.J.G. Marin).

1043-6618/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.07.005>

Although the farnesoid X receptor (FXR) has been considered a specific bile acid receptor involved in the control of the expression of genes accounting for lipid homeostasis [5], we have recently reported preliminary data indicating that the activation of FXR can be triggered, in a bile acid-independent manner, by the exposure of liver cells to certain toxic compounds, such as cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II), CDDP) [6]. These findings have suggested the question as to whether an enhanced expression of this nuclear receptor might be involved in the development of the multidrug resistance (MDR) phenotype that is characteristic of CRAC.

In humans, FXR is encoded by the *NR1H4* gene, whose expression can result in four isoforms with relative tissue/cell-specific distributions [7]. To date, these isoforms have been classified using different nomenclatures. Here we have designated them as FXR α 1(+), FXR α 1(-), FXR α 2(+) and FXR α 2(-), based on their difference in the initial region (exons 1–3) of mRNA (α 1 and α 2) and the presence (+) or absence (-) of a 12 base-pair insert at the end of exon 5.

Both under physiological circumstances and regarding their role in inducing chemoresistance in tumours, the functional differences of FXR isoforms are poorly understood. Thus, the aim of the present study was to determine whether the overall expression of FXR or any of its isoforms are modified in CRAC and whether this is related to the expression of genes involved in the MDR phenotype of these tumours. In the present study, in order to characterize the genetic profile of genes involved in MDR phenotype individually, Taqman Low Density Arrays (TLDA) have been used. The genes included in the microfluidic cards have been previously reported to play a role in MOC by: affecting drug uptake (MOC-1a) or efflux (MOC-1b), changing intracellular metabolism (pro-drug activation or drug inactivation) (MOC-2), changing the expression/functionality of molecular targets (MOC-3), enhancing DNA repair machinery (MOC-4), reducing activation of apoptosis (MOC-5a) or enhancing expression/activity of anti-apoptotic pathways (MOC-5b) [4].

2. Methods

2.1. Human samples

Tumour samples from CRAC were obtained for therapeutic/diagnostic/prognostic purposes from surgically removed tumours or biopsies. At the time of sample collection the patients had not yet received any antitumour treatment. The research protocol, which complied with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki, was reviewed and approved by the Human Subjects Committee of the University of Salamanca, and written consent was obtained in all cases. Fresh tissue specimens collected in the operating room were immediately immersed in RNAlater solution (Ambion, Life Technologies, Madrid, Spain). Approximately the same proportion of males and females was included in all groups.

2.2. Cell cultures

LS174T human colon adenocarcinoma cells were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). A monoclonal subline partly resistant to CDDP had been previously obtained at our laboratory [8]. The cells were cultured with appropriate medium in a humidified CO₂:air (5:95%) atmosphere at 37 °C. To calculate the IC₅₀ for CDDP, approximately 5×10^3 or 5×10^4 cells/well (depending on the cell line) were seeded in 96-well plates. To determine cell viability in order to calculate the IC₅₀ from the dose–response curves, the formation of formazan from the

tetrazolium salt (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, MTT, from Sigma–Aldrich Quimica, Madrid, Spain) by living cells was used after long-term (72 h) exposure to CDDP. Cells incubated with or without CDDP at concentrations close to the IC₅₀ (LS174T: 20 μ M and LS174T/R: 100 μ M) for 72 h were analysed using TLDA to characterize MDR expression profiles. Effect of incubation of LS174T/R cells with the FXR antagonist Z-guggulsterone (Santa Cruz Biotechnology) (10 μ M for 48 h) [9] on the expression of MDR genes and some typical FXR target genes was also investigated. Experiments were carried out in triplicate in at least three different cultures per cell line.

2.3. Measurement of mRNA levels

Total RNA extraction from human CRAC samples and cultured cells was performed as previously described [10]. Retrotranscription was carried out using the “SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit” (Invitrogen, Barcelona, Spain). QPCR, using AmpliTaq Gold polymerase, was performed in an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Madrid, Spain) for single reactions to determine mRNA by conventional RT-QPCR with SYBR[®] Green I detection, or using TLDA in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) with TaqMan Mix detection to analyse the expression of genes involved in MOCs (Supplementary Table 1). In all cases, the following thermal conditions were used: a single cycle of 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. The primer oligonucleotides for FXR and its isoforms (Supplementary Table 2) and for the MOC genes, together with their appropriate Taqman probes to be included in the microfluidic cards, were designed and validated by us (FXR) or by Applied Biosystems (TLDA) (data not shown). As house-keeping genes, 18S rRNA, *ACTB* and *GAPDH* were included in the TLDA. 18S rRNA was used as a quality-control check among samples and groups. Since the Ct values for *ACTB* and *GAPDH* were closer to those of the target genes double normalization of the results in each sample was carried out with the values obtained for these two genes. Expression levels were calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where ΔCt is the difference of Ct in each sample between the target gene and the normalizer. This was used to calculate $\Delta\Delta Ct$ as the difference in this value between tumour tissue and paired adjacent healthy colon tissue. To carry out the absolute determination of the number of mRNA copies of FXR isoforms and *GAPDH*, each cDNA was obtained by high-fidelity RT, cloned into a pGEMT Easy vector (Promega, Madrid, Spain), and sequenced. This construct was amplified in *Escherichia coli* and used as a template to obtain by PCR, followed by gel electrophoresis, different amounts of a purified fragment to build the standard curves required for the absolute determination of mRNA by QPCR.

2.4. Immunohistochemistry

Using the “Immunohistochemistry Accessory Kit” (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX), FXR immunostaining was performed on tissue microarrays (TMAs) obtained from the Biobanc of Barcelona Clinic Hospital-IDIBAPS (Barcelona, Spain). Formalin-fixed paraffin-embedded TMAs contained 15 human CRAC and paired non-neoplastic tissue from resection margins. After deparaffinization in xylene and rehydrated in a graded series of ethanol, the endogenous peroxidase activity was quenched with freshly prepared 0.3% H₂O₂ in methanol for 30 min at room temperature, and samples were subjected to antigen retrieval using steamer heating for 20 min. Tissue sections were incubated for 1 h with the rabbit polyclonal antibody (H-130, Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100. Subsequently, the slides were rinsed 3 \times in PBS, incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody for 1 h, again rinsed 3 \times in PBS and incubated with the peroxidase

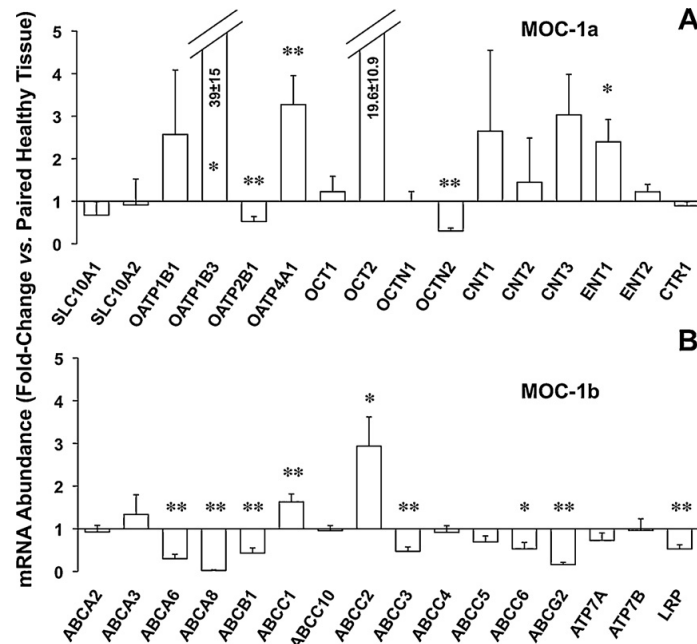


Fig. 1. Expression levels of genes involved in the type 1a (A) and 1b (B) mechanism of chemoresistance (MOC-1a and MOC-1b) as determined by TLDA. Values are fold-changes, in mRNA abundance in human colon adenocarcinoma as compared with paired healthy tissue. Values are means \pm SD of determinations carried out in paired samples from 10 individuals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus healthy tissue by the paired t -test.

substrate for 5 min. Slides were counter-stained with hematoxylin. Non-specific reactivity was assessed by omitting the primary antibody.

2.5. Statistical analysis

To carry out hierarchical clustering, one-way ANOVA was carried out, and to calculate the statistical significance of the differences by the Significance Analysis of Microarrays (SAM) method [11], the Multi Experiment Viewer software (MeV 4.5, v10.2 for Mac; Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA) was used [12]. Comparisons between data obtained by conventional RT-QPCR were carried out using the paired t -test.

3. Results

Although important inter-individual variability was observed in CRAC samples regarding the expression levels of genes involved in the different MOCs (Supplementary Figs. 1–3), some clear trends could be detected. Thus, among the transporters involved in the uptake of anticancer drugs (MOC-1a) only OATP2B1 and OCTN2 were significantly down-regulated in CRAC (Fig. 1A). The mean values indicated that several transporters for organic anions and cations, such as OATP4A1 but mainly OATP1B3 and OCT2, were markedly up-regulated (Fig. 1A). Since these findings might be of considerable relevance for drug targeting regarding the treatment of CRAC, they were re-evaluated by conventional RT-QPCR in a larger series of tumours (Fig. 2). A significant up-regulation of both OATP1B3 and OCT2 was confirmed. Regarding nucleoside transporters, a trend towards up-regulation was observed, although this change was only significant in the case of ENT1 (Fig. 1A). No significant change in CTR1 in tumours was observed (Fig. 1A).

A less marked inter-individual variability in the expression pattern of the genes included in MOC-1b was observed (Supplementary Fig. 1C). Although several significant changes were detected, only two of them would be expected to induce

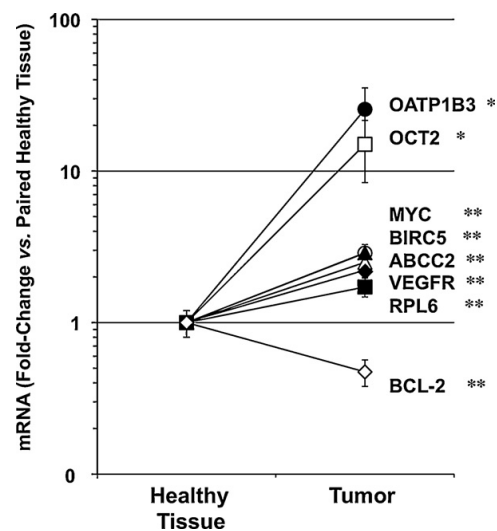


Fig. 2. Re-evaluation by conventional RT-QPCR of changes in gene expression regarding the most relevant traits of the multidrug resistance phenotype detected in colon adenocarcinoma tumours by TLDA. Values are means \pm SD of determinations carried out in paired samples from 19 individuals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with healthy tissue by the paired t -test.

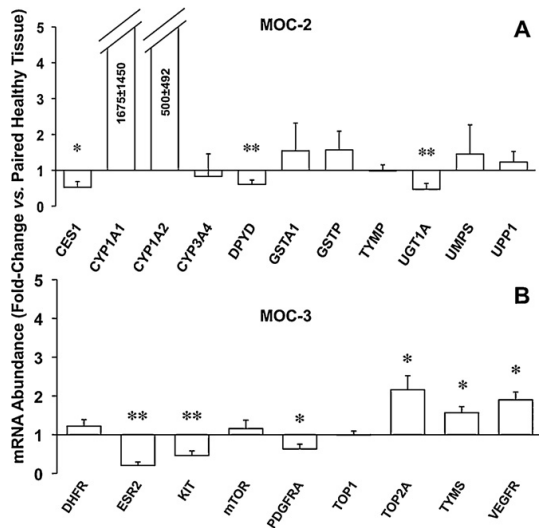


Fig. 3. Expression levels of genes involved in the type 2 (A) and 3 (B) mechanism of chemoresistance (MOC-2 and MOC-3) as determined by TLDAs. Values are fold-changes, in mRNA abundance in human colon adenocarcinoma as compared with paired healthy tissue. Values are means \pm SD of determinations carried out in paired samples from 10 individuals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus healthy tissue by the paired *t*-test.

chemoresistance, i.e., the enhanced expression of ABCC1 and ABCC2 (Fig. 1B). The latter was also confirmed by conventional RT-QPCR (Fig. 2).

MOC-2 includes enzymes involved in intracellular drug metabolism that play a role in drug detoxification and in the biotransformation of pro-drugs into their active forms. A marked inter-individual variability was also observed for MOC-2 (Supplementary Fig. 2A). The mean values indicated a decreased expression of CES1, DPYD and UGT1A (Fig. 3A). Although the expression of CYP1A1 and CYP1A2 was much higher in several tumours than in healthy tissue, this was still too low to expect a role in chemoresistance.

Moderate changes in the expression of the genes included among molecular targets (MOC-3) were found. These mainly consisted of a down-regulation of ESR2 that affected 8 out of 10 tumours assayed (Supplementary Fig. 2C). A down-regulation of KIT and PDGFRA, together with an up-regulation of TOP2A, TYMS and VEGFR was also seen (Fig. 3B).

As compared with healthy colon, the expression of the genes involved in DNA repair (MOC-4) was scarcely modified in CRAC, except for UDG, which was significantly down-regulated (Supplementary Figs. 3A and 4A).

Regarding pro- and anti-apoptotic genes (MOC-5), CDKN1A was down-regulated, whereas MYC, RPL6 and BIRC5 were significantly up-regulated (Fig. 4B). However, a marked degree of inter-individual variability was observed (Supplementary Fig. 3C), except for BCL-2, which was consistently down-regulated (Supplementary Figs. 3C and 4B). This change was confirmed by conventional RT-QPCR in a larger series of tumours (Fig. 2).

In spite of the presence of the gene expression pattern characteristic of MDR phenotype, described above, the abundance of FXR mRNA in CRAC was not enhanced but consistently and significantly decreased (Fig. 5A). The reduced expression of FXR was confirmed by immunostaining (Fig. 6, brown staining). When the FXR isoforms were analysed, FXR α 2 was found to be the predominant one in healthy tissue, with a similar proportion of FXR(-) and FXR(+) (Fig. 5B). In CRAC, down-regulation of FXR expression affected all isoforms, but this was more marked for FXR α 1 isoforms. This resulted in enhanced predominance of FXR α 2. The similarity in the proportions of (-) and (+) isoforms was not changed (Fig. 5B).

To simulate the effect of pharmacological stress human CRAC cells without (LS174T) or with (LS174T/R) induced resistance to CDDP were incubated with IC50 CDDP for 72 h. This drug was chosen regardless its actual usefulness in the management of patients with CRAC because this is a well-known inducer of chemoresistance in most types of tumours assayed. Long-term culture of LS174T cells did not result in enhanced expression of FXR (data not shown). Treatment of LS174T cells with CDDP induced a moderate expression of FXR (from 7 to 35 copies of mRNA/10³ copies GAPDH mRNA). Although enhanced, this can still be considered as poor when compared with the 2500 copies of FXR mRNA/10³ copies GAPDH mRNA found in LS174T/R cells (Fig. 7A). Most of this up-regulation was due to an enhanced expression of FXR α 1 isoforms (Fig. 7A). Treatment

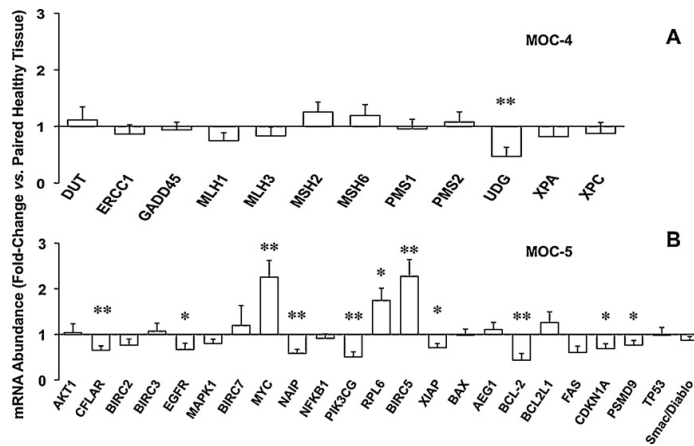


Fig. 4. Expression levels of genes involved in the type 4 (A) and 5 (B) mechanism of chemoresistance (MOC-4 and MOC-5) as determined by TLDAs. Values are fold-changes, in mRNA abundance in human colon adenocarcinoma as compared with paired healthy tissue. Values are means \pm SD of determinations carried out in paired samples from 10 individuals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus healthy tissue by the paired *t*-test.

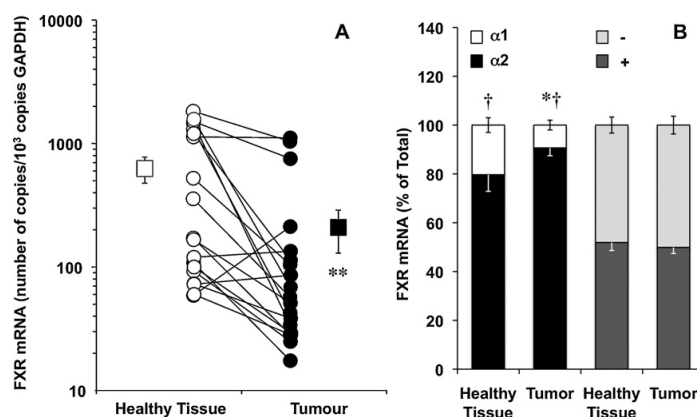


Fig. 5. Comparison between colon adenocarcinoma and adjacent healthy colon tissue regarding the absolute abundance of FXR mRNA (A) and relative proportions of FXR isoforms (B) classified according to the difference in the initial region (exons 1–3) of mRNA (FXR α 1 and FXR α 2) and the presence (+) or absence (–) of a 12 base-pair insert in exon 5. Paired samples from 19 surgically removed tumours or biopsies were collected and analysed by RT-QPCR. Values are expressed as means \pm SD. * p < 0.05; ** p < 0.01, on comparing the abundance and proportions with healthy tissue; † p < 0.01, on comparing the proportions of different FXR isoforms in the same tissue.

of resistant cells with CDDP failed to further increase FXR expression or change the proportion of its isoforms; i.e., FXR α 1 > FXR α 2 (Fig. 7A) and FXR(–) > FXR(+) (Fig. 7B).

Both short-term and long-term treatment with CDDP induced marked changes in the expression pattern of genes included in MOC-1a. These variations were more marked after acute exposure to the drug and were in general characterized by an enhanced expression of the genes affected (Supplementary Fig. 1B). Short-term incubation with CDDP failed to induce significant changes in the expression patterns regarding the genes of MOC-1b, except for

ABCA3. In contrast, cells partially resistant to CDDP exhibited an up-regulation of several ABC proteins, such as ABCB1, ABCC1, ABCC2 and ABCG2 and the copper transporter ATP7B (Supplementary Fig. 1D). In cultured cells, a general down-regulation of the genes involved in MOC-2 was found (Supplementary Fig. 2B). In cells continuously incubated with CDDP, only CES1 was markedly up-regulated. Regarding MOC-3, ESR2, KIT and PDGFRA were up-regulated in LS174T cells, whereas a trend towards a down-regulation of TOP2A and TYMS was observed (Supplementary Fig. 2D). The up-regulation of VEGFR was a shared characteristic

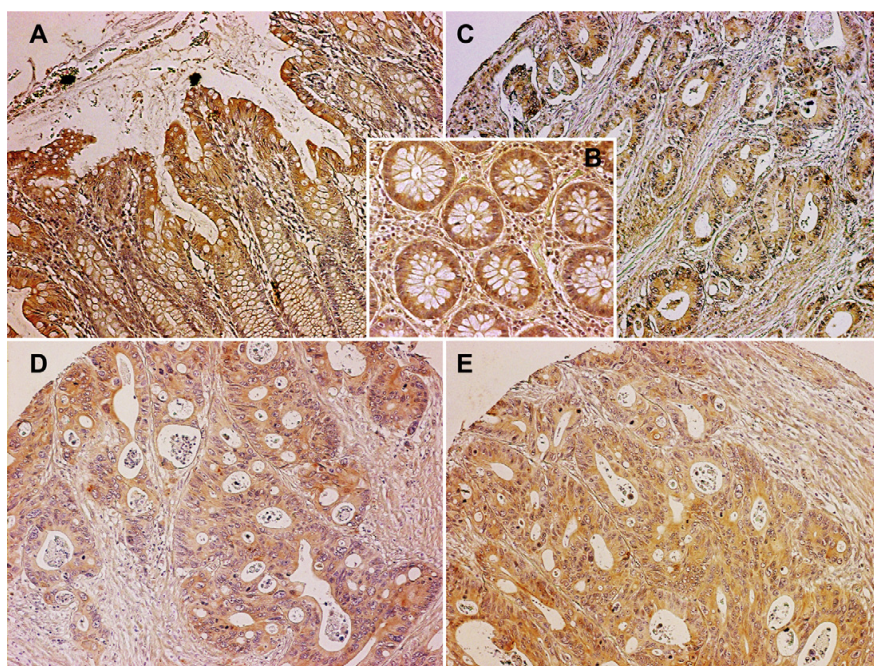


Fig. 6. Immunostaining analysis of FXR expression (brown staining) comparing two slides of healthy human colon (A, B) with slides from three different colon adenocarcinoma with reduced (C) and very low (D, E) levels of FXR expression.

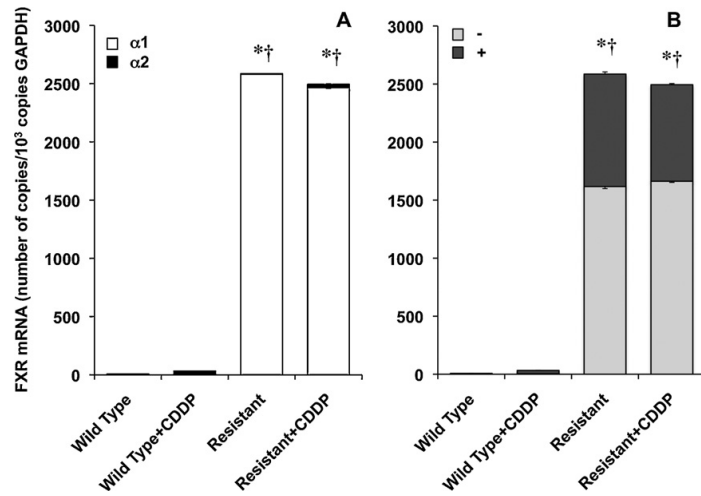


Fig. 7. Expression of FXR isoforms classified according to the difference in the initial region (exons 1–3) of mRNA (FXRα1 and FXR α2) (A) and the presence (+) or absence (–) of a 12 base-pair insert in exon 5 (B). Wild-type LS174T cells from colon adenocarcinoma or a subclone (LS174T/R) partially resistant to cisplatin (CDDP) were incubated with CDDP at approximately the IC50 (LS174T: 20 μM; LS174T/R: 100 μM) for 72 h before RNA extraction for analysis by RT-QPCR. Values are expressed as means ± SD. **p* < 0.05 as compared to untreated wild-type cells; †*p* < 0.01, on comparing the proportion of different FXR isoforms in the same experimental group of cells.

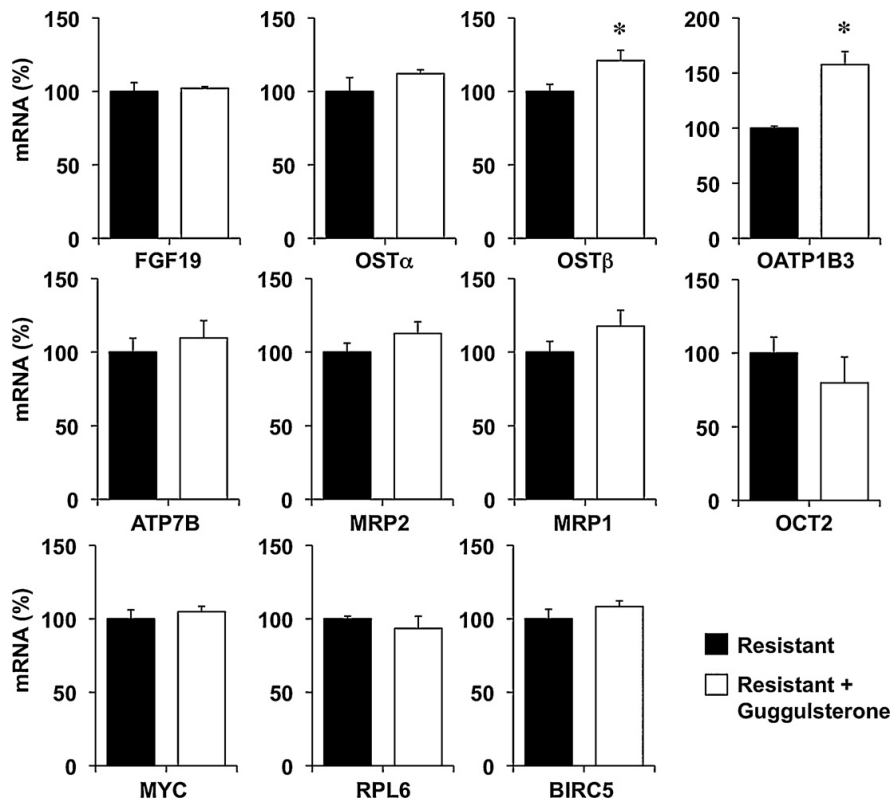


Fig. 8. Effect of incubation with 10 μM Z-guggulsterone for 48 h on the expression of MDR genes and FXR target genes in colon adenocarcinoma cells (LS174T/R) partially resistant to cisplatin (CDDP). Values are expressed as means ± SD. **p* < 0.05 on comparing with untreated LS174T/R cells.

between cells and tumours. Regarding MOC-4, the expression patterns determined in cultured cells were very similar to those found in tumours, except for GADD45, which was up-regulated by acute or long-term CDDP treatment (Supplementary Fig. 3B).

Regarding MOC-5, BCL-2, as found in tumours (Fig. 4B), was also down-regulated in cultured cells. Similarly, a down-regulation of CFLAR, EGFR, NAIP, PI3KCG and XIAP was found in the cells (Supplementary Fig. 3D). In all these genes treatment with CDDP did not reverse this situation (Supplementary Fig. 3D). In contrast, BIRC7, CDKN1A and BCL2L1 were up-regulated in cells treated with CDDP (Supplementary Fig. 3D), whereas the expression of MYC and BIRC5 was already enhanced in untreated LS174T cells (Supplementary Fig. 3D).

Incubation of LS174T/R cells with the FXR antagonist Z-guggulsterone [9] was carried out to investigate its effect on the expression of relevant MDR genes (OCT2, RPL6, BIRC5, MYC, ATP7B, MRP1 and MRP2) and some typical FXR target genes (FGF19, OST α , OST β and OATP1B3). Treatment with Z-guggulsterone induced a significant increase in the expression of OST β and OATP1B3. In contrast no change in the expression of MDR genes was found (Fig. 8).

4. Discussion

Heat maps of the expression levels in single tumours revealed, on one hand, the considerable heterogeneity of the genetic signatures among the different individuals, which supports the need for these types of analysis on an individual basis and even during different stages of the treatment of the same tumour, because pharmacological challenge profoundly alters the expression pattern of these genes, as confirmed here in “in vitro” studies. Therefore, when biopsies are part of the diagnosis and follow-up procedures, individualized analysis of the genetic fingerprint of the tumour before and during treatment could provide valuable information regarding the probability of failure of a given pharmacological regimen. Additionally, these results revealed the existence in CRAC of some trends towards the up-regulation or down-regulation of genes belonging to the different MOCs described above.

Regarding the relationship of FXR expression and the MDR phenotype, important findings of this study were that changes in the expression of several genes involved in chemoresistance occurred in CRAC in spite of a marked down-regulation of FXR. No important change in the balance of expression among FXR isoforms that might justify an increased overall responsiveness of the pathways activated by this nuclear receptor was found.

Moreover, the present study provides interesting data regarding the expression in CRAC of genes involved in the MDR phenotype. Thus, regarding transporters belonging to the superfamily of solute carriers (SLC), whose natural substrates are a large variety of endogenous compounds but which play an important role in the uptake of antitumour drugs [13] and hence have been included in MOC-1a [4], interesting changes have been detected, consisting of the enhanced expression of OCT2 and OATP1B3, which are important because they may determine the pharmacokinetics of several anticancer drugs [14–16].

Most genes included in MOC-1b encode members of the superfamily of ABC proteins involved in the efflux of a large variety of anticancer drugs from tumour cells [17]. In this respect, a prototypic gene accounting for MDR phenotype is ABCB1, also known as P-glycoprotein or MDR1. This is considered the underlying mechanism accounting for resistance to a broad spectrum of drugs including a large variety of anticancer drugs, such as tyrosine kinase inhibitors (TKI), anthracyclines, camptothecins, podophyllotoxins and anti-oestrogenic drugs [15,18,19]. Although ABCB1 has been detected in healthy colon, colorectal polyps and colon cancer cells [20], in the present study, ABCB1 expression was not found to be

enhanced in CRAC. In contrast, the expression of other ABC proteins, such as MRP1 (ABCC1) and MRP2 (ABCC2) was significantly elevated. These pumps confer resistance to anthracyclines, camptothecins, nitrogenous bases, nucleoside analogues, *Vinca* alkaloids and other drugs [4]. Moreover, the overexpression of MRP2 is considered to be one of the most important mechanisms inducing resistance to platinum derivatives in enterohepatic tumours [21].

No changes in the expression profiles of MOC-2 that might enhance chemoresistance were seen, except for CES1. This enzyme accounts for the intracellular activation of irinotecan, and its gene expression is reduced in CRAC with enhanced resistance to this drug [22]. In our series of tumours, this characteristic was very common. In contrast, in chemoresistant LS174T/R cells CES1 was up-regulated. This change may enhance the ability of these cells to activate irinotecan as well as other carboxylesterase-dependent pro-drugs, but may also potentiate the inactivation of some active drugs [23].

The most important changes in the expression of genes encoding molecular targets for antitumour drugs (MOC-3) were the decreased levels of the mRNA of ESR2, KIT and PDGFRA, together with an up-regulation of TOP2A, TYMS and VEGFR. The key role of TOP2A in cell proliferation makes it an important molecular target for antitumour drugs, such as daunorubicin and doxorubicin. Increased expression of TOP2A could compensate the inhibitory effect of these compounds and may account for the chemoresistance to, for instance, anthracyclines observed in recurrent CRAC [24]. In the present study, TOP2A over-expression in CRAC was remarkable, not only owing to the magnitude of the change but also to the consistency of the finding. In our series of tumours, TYMS was moderately but significantly elevated. Tumours with low levels of TYMS are more sensitive to 5-fluorouracil (5-FU) [25] and hence the expression levels of this enzyme have been proposed as an accurate predictor of survival in patients with CRAC treated with 5-FU [26]. In contrast, enhanced TYMS expression in colon cancer cells due to polymorphisms in the TYMS promoter [27] or as a consequence of the treatment of patients with 5-FU [28] results in decreased sensitivity to this drug. Finally, regarding MOC-3, the VEGFR up-regulation should be pointed out. This plays a key role in angiogenesis and in the maintenance of a favourable environment for tumour growth [29]. This explains why this receptor constitutes the target of vectorized therapies based on TKIs, such as sunitinib, and monoclonal antibodies, such as bevacizumab [30].

MOC-4 includes proteins involved in DNA repair, which may result in enhanced resistance to genotoxic agents. In the series of tumours analysed here no important changes in the expression patterns of these genes could account for the enhanced chemoresistance observed. However, the importance of MOC-4 may change dramatically during pharmacological treatment [31,32]. The marked difference in GADD45 expression between LS174T and LS174T/R cells supports this concept.

Since the beneficial activity of many antitumour drugs, such as CDDP, cytarabine, etoposide and doxorubicin is accounted for by their ability to induce apoptosis in tumour cells [33] changes in the expression of genes that enhance survival and reduce apoptosis activation (MOC-5) generally result in resistance to chemotherapy. Thus, the up-regulation or aberrant activation of inhibitors of apoptosis (IAPs) is a frequent cause of chemoresistance. One of the most representative members of IAPs is survivin (BIRC5), whose expression in the present series of CRAC was enhanced. This is also the case in colon adenocarcinoma cell lines with resistance to 5-FU, CDDP or irinotecan [34,35]. There is also a relationship between the expression of MYC, which was enhanced in CRAC, and the response to anticancer drugs such as the camptothecins [36]. However, reduced sensitivity to anticancer drugs may be due not only to changes in the expression of genes involved in apoptosis/survival balance but also to the modified activity of the proteins encoded by them. An

excellent example is p53 (*TP53* gene), a key factor in the induction of apoptosis in response to chemotherapy, which has been found to be mutated in approximately 85% of cases of CRAC [37]. Mutations in *TP53* have been found to be associated with the resistance of colon cancer cells to 5-FU and doxorubicin [38], oxaliplatin [39] and CDDP [8]. In the present study, on comparing CRAC with healthy tissue no change in the expression levels of *TP53* was found.

Another important observation of this study was that some of the genes accounting for the MDR phenotype were already up-regulated in LS174T cells in spite of the existence of negligible levels of FXR expression. Nevertheless, enhanced chemoresistance in LS174T/R was accompanied by a dramatic increase in the expression of FXR α 1(+/-). This was surprising because major isoforms in healthy colon and CRAC were not FXR α 1(+/-) but FXR α 2(+/-).

Z-guggulsterone is known to bind FXR affecting its interaction with some co-activators, which results in an antagonizing effect on some but not all FXR target genes. Moreover, Z-guggulsterone may stimulate the expression of another subset of FXR target genes [9]. Other effects of this compound are accounted for its ability to interact with several steroid receptors [40]. In the present study Z-guggulsterone induced changes in the expression of some FXR target genes but was not able to affect the expression of assayed MDR genes. This suggests that if FXR controls the expression of these MDR genes this occurs through a mechanism insensitive to guggulsterone.

In sum, although preliminary evidences suggest that an enhanced expression of FXR may be involved in the activation of mechanisms leading to an increased protection of healthy tissues against the toxicity of certain agents, the situation seems to be quite different in tumours of naive patients. Our results suggest that FXR up-regulation is not required for the presence of a marked MDR phenotype in CRAC. However, increased expression of this nuclear receptor may be involved in the enhanced chemoresistance of the tumour occurring during pharmacological treatment.

Financial support

This study was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grants CP05/0135 and PI080151); the Fundación Solorzano (2012); the Generalitat de Catalunya (2009SGR624) and the Junta de Castilla y Leon (Biomedicina2011, BIO39/SA27/10, SA023A11-2 and SA070A11-2), Spain; the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Grants SAF2009-08493, SAF2010-15517 and SAF2011-23660), Spain and the Fundación Investigación Médica, Mutua Madrileña (Convocatoria 2009), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant BFU2007-30688-E/BFI) and belongs to the National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERhd) Instituto de Salud Carlos III, Spain. N. Grañé-Boladeras holds a PFIS fellowship (Instituto de Salud Carlos III, MICINN). J. Vaquero was recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación, Spain (Grant AP2007-00105).

Acknowledgement

The authors thank N. Skinner for revising the English spelling, grammar, and style of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.07.005>.

References

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of world-wide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *International Journal of Cancer* 2010;127:2893–917.
- [2] Bujanda L, Sarasqueta C, Hijona E, Hijona L, Cosme A, Gil I, et al. Colorectal cancer prognosis twenty years later. *World Journal of Gastroenterology* 2010;16:862–7.
- [3] Gallagher DJ, Kemeny N. Metastatic colorectal cancer: from improved survival to potential cure. *Oncology* 2010;78:237–48.
- [4] Marin JJ, Romero MR, Martínez-Becerra P, Herraiz E, Briz O. Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours. *Current Molecular Medicine* 2009;9:1108–29.
- [5] Kemper JK. Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011;1812:842–50.
- [6] Monte MJ, Serrano MA, Herraiz E, Vaquero J, Gonzalez-Sanchez E, Romero MR, et al. Chemoresistance can be induced by bile acid-independent activation of FXR in liver and intestinal cancer cells. *Hepatology* 2011;54:713–4.
- [7] Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. The role of FXR in disorders of bile acid homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 2008;23:286–95.
- [8] Briz O, Macias RI, Vallejo M, Silva A, Serrano MA, Marin JJ. Usefulness of liposomes loaded with cytostatic bile acid derivatives to circumvent chemotherapy resistance of enterohepatic tumours. *Molecular Pharmacology* 2003;63:742–50.
- [9] Cui J, Huang L, Zhao A, Lew JL, Yu J, Sahoo S, et al. Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:10214–20.
- [10] Macias RI, Hierro C, Cuesta de Juan S, Jimenez F, Gonzalez-San Martin F, Marin JJ. Hepatic expression of sodium-dependent vitamin C transporters: ontogeny, subcellular distribution and effect of chronic liver diseases. *British Journal of Nutrition* 2011;106:1814–25.
- [11] Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:5116–21.
- [12] Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al. TM4 microarray software suite. *Methods in Enzymology* 2006;411:134–93.
- [13] Huang Y, Sadee W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Letters* 2006;239:168–82.
- [14] Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, et al. LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2001;120:1689–99.
- [15] Marin JJ, Romero MR, Briz O. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Current Medicinal Chemistry* 2010;17:709–40.
- [16] Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006;319:879–86.
- [17] Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004;21:25–51.
- [18] Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:7735–8.
- [19] Efferth T, Konkimala VB, Wang YF, Sauerbrey A, Meinhardt S, Zintl F, et al. Prediction of broad spectrum resistance of tumors towards anticancer drugs. *Clinical Cancer Research* 2008;14:2405–12.
- [20] Ballester MR, Monte MJ, Briz O, Jimenez F, Gonzalez-San Martin F, Marin JJ. Expression of transporters potentially involved in the targeting of cytostatic bile acid derivatives to colon cancer and polyps. *Biochemical Pharmacology* 2006;72:729–38.
- [21] Hinoshita E, Uchiyama T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, et al. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2000;6:2401–7.
- [22] Pavillard V, Agostini C, Richard S, Charasson V, Montaudon D, Robert J. Determinants of the cytotoxicity of irinotecan in two human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2002;49:329–35.
- [23] Tanimoto K, Kaneyasu M, Shimokuni T, Hiyama K, Nishiyama M. Human carboxylesterase 1a2 expressed from carboxylesterase 1a1 and 1a2 genes is a potent predictor of CPT-11 cytotoxicity in vitro. *Pharmacogenetics and Genomics* 2007;17:1–10.
- [24] Lazaris AC, Kavantzias NG, Zorzos HS, Tsavaris NV, Davaris PS. Markers of drug resistance in relapsing colon cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2002;128:114–8.
- [25] Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Research* 1995;55:1407–12.
- [26] Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20:2832–43.

- [27] Marsh S, McKay JA, Cassidy J, McLeod HL. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *International Journal of Oncology* 2001;19:383–6.
- [28] Chu E, Koeller DM, Johnston PG, Zinn S, Allegra CJ. Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Molecular Pharmacology* 1993;43:527–33.
- [29] Kuwai T, Nakamura T, Sasaki T, Kitadai Y, Kim JS, Langley RR, et al. Targeting the EGFR, VEGFR, and PDGFR on colon cancer cells and stromal cells is required for therapy. *Clinical and Experimental Metastasis* 2008;25:477–89.
- [30] Leite de Oliveira R, Hamm A, Mazzone M. Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat – implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Molecular Aspects of Medicine* 2011;32:71–87.
- [31] Delmastro DA, Li J, Vaisman A, Solle M, Chaney SG. DNA damage inducible-gene expression following platinum treatment in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1997;39:245–53.
- [32] Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clinical Cancer Research* 1998;4:1–6.
- [33] Ormerod MG, O'Neill C, Robertson D, Kelland LR, Harrap KR. Cis-diamminedichloroplatinum(ii)-induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1996;37:463–71.
- [34] Xu Y, Fang F, Ludewig G, Jones G, Jones D. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA and Cell Biology* 2004;23:419–29.
- [35] Huerta S, Heinzerling JH, Anguiano-Hernandez YM, Huerta-Yepez S, Lin J, Chen D, et al. Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: Roles of FAS, APAF-1, NFKappaB, IAPs, Smac/Diablo, and AIF. *Journal of Surgical Research* 2007;142:184–94.
- [36] Arango D, Mariadason JM, Wilson AJ, Yang W, Corner GA, Nicholas C, et al. C-myc overexpression sensitises colon cancer cells to camptothecin-induced apoptosis. *British Journal of Cancer* 2003;89:1757–65.
- [37] Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on tp53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC tp53 database. *Human Mutation* 2007;28:622–9.
- [38] Dart DA, Pickles SM, Cooper PA, Double JA, Bibby MC. The role of p53 in the chemotherapeutic responses to cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil treatment. *International Journal of Oncology* 2004;24:115–25.
- [39] Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Aranes MJ, Nicholas C, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer* 2004;91:1931–46.
- [40] Burris TP, Montrose C, Houck KA, Osborne HE, Bocchini WP, Yaden BC, et al. The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Molecular Pharmacology* 2005;67:948–54.

7.2.3- Role of FXR in the development of chemoresistance by hepatic and intestinal cells

According to the results described in section 2, enterohepatic tumors of naive patients, who have not received drug treatment, may develop chemoresistance by altering the basal expression, compared to healthy tissue, of certain genes belonging to MOCs, in despite of the reduction of FXR expression. However, the results obtained in LS 174T/R cells suggest a role for FXR in the development of chemoresistance in response to the stress produced by drug treatment. Therefore, we wanted to analyze the effect of the absence or the presence of FXR, and its activation by a well-known synthetic ligand (GW4064), in the development of chemoresistance by hepatic and intestinal cell lines.

The experiments performed in section 1 showed that the potency of FXR α 1(-) was always equal or greater than that of the other isoforms, independently of the cell line used. Furthermore, although LS 174T cells derive from colon adenocarcinoma, which expresses mostly FXR α 2(+/-), the isoforms present in the subline partially resistant to cisplatin LS 174T/R were FXR α 1(+/-). Thus, we decided to use the plasmid containing FXR α 1(-) isoform in the transfection experiments carry out in this section.

During the development of these results several chemotherapeutic/toxic agents were used, but most experiments were performed using cisplatin as a model drug. This antitumor agent was chosen, independently of its actual use in the treatment of liver cancer patients, because it is a known inducer of chemoresistance in most tumors studied. Moreover, this compound and its derivatives, are amongst the most effective antitumour agents used to treat various types of tumors, including colon cancer (Boulikas and Vougiouka, 2003). In fact, chemotherapy regimens based on platinum derivative compounds in combination with other antitumor drugs constitutes the pharmacological therapy of choice for the treatment of colon cancer (Andre et al., 2004; de Gramont et al., 2000).

The results obtained in this final section of the Doctoral Thesis have been published in one article and used to write a second manuscript, which is not yet published. These results correspond to:

- Figures 6-8 of the article entitled: "Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins".
- The entire manuscript entitled: "Hepatocyte chemoprotection and liver tumor chemoresistance against genotoxic compounds is enhanced by FXR activation".

Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Taberero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., de Gramont, A., 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England journal of medicine* 350, 2343-2351.

Boulikas, T., Vougiouka, M., 2003. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncology reports* 10, 1663-1682.

de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F., Bonetti, A., 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18, 2938-2947.

Cisplatin-Induced Chemoresistance in Colon Cancer Cells Involves FXR-Dependent and FXR-Independent Up-Regulation of ABC Proteins

Elisa Herraiz,[†] Ester Gonzalez-Sanchez,[†] Javier Vaquero,[†] Marta R. Romero,^{†,‡} Maria A. Serrano,^{†,‡} Jose J. G. Marin,^{*,†,‡} and Oscar Briz^{*,†,‡}

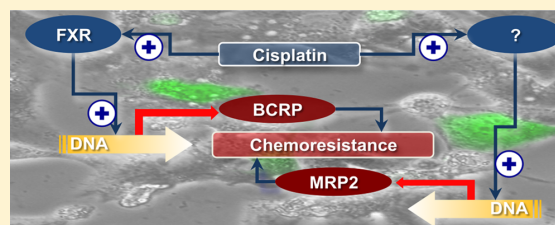
[†]Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Spain

[‡]National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Export pumps often limit the usefulness of anticancer drugs. Here we investigated the effect of cisplatin on the expression of ABC proteins in human colon cancer cells. Short-term incubation of Caco-2 and LS174T cells with cisplatin resulted in up-regulation of several ABC pumps, in particular MRP2 and BCRP. In partially cisplatin-resistant cells (LS174T/R) obtained by long-term exposure to cisplatin, MRP2 and BCRP up-regulation was more marked. This was further enhanced when these cells were cultured under maintained stimulation with cisplatin. The MRP2 promoter (MRP2pr) was cloned, and partially deleted constructs linked to reporter genes were generated. Transfection of LS174T and LS174T/R cells with these constructs revealed the ability of cisplatin to activate MRP2pr. The intensity of this response was dependent on the conserved MRP2pr region. Basal MRP2pr activity was higher in LS174T/R cells, in which the expression of the transcription factors *c/EBPβ*, *HNF1α*, *HNF3β*, and *HNF4α*, but not *PXR*, *p53*, *c-Myc*, *AP1*, *YB-1*, *NRF2*, and *RARα* was enhanced. Up-regulation was particularly high for FXR (200-fold) and SHP (50-fold). In LS174T/R cells, GW4064 induced the expression of *FGF19*, *SHP*, *OSTα/β*, but not MRP2 and BCRP, although the sensitivity of these cells to cisplatin was further reduced. In LS174T cells, GW4064-induced chemoresistance was seen only after being transfected with FXR+RXR, when BCRP, but not MRP2, was up-regulated. Protection of LS174T cells against cisplatin was mimicked by transfection with BCRP. In conclusion, in colon cancer cells, cisplatin treatment enhances chemoresistance through FXR-dependent and FXR-independent mechanisms involving the expression of BCRP and MRP2, respectively.

KEYWORDS: ABC proteins, antitumor drugs, cancer, colon, promoter



INTRODUCTION

The mechanisms of chemoresistance (MOC) have recently been classified in five major groups on the basis of whether they involve a reduction in drug uptake (MOC-1a) or enhanced drug export (MOC-1b), a reduction of metabolic pro-drug activation or an increase in drug inactivation (MOC-2), changes in molecular targets (MOC-3), enhanced DNA repair (MOC-4), and a modification in the pro-(MOC-5a) versus anti-(MOC-5b) apoptotic balance.¹ These are present in both healthy tissues, where they are involved in the defense against the chemical stress caused by potentially toxic compounds, and in cancer cells, where they account for the poor response to antitumor drugs.

In the present study, cisplatin was selected as a model antitumor drug due to its well-known ability to induce chemoresistance and because this compound and its derivatives are among the most effective anticancer agents used to treat several types of tumors, including colon cancer.² Indeed, chemotherapy regimens based on platinum-derived compounds

in combination with other drugs constitute the pharmacological therapy of choice for the treatment of colon cancer.^{3,4} Platinum-based neoadjuvant chemotherapy together with radiotherapy is recommended before surgery in colon cancer at stages II and III,⁵ and it is maintained after tumor resection in more advanced stages to prevent the high risk of recurrence.⁶ However, the pre-existence of drug refractoriness and the frequent development of chemoresistance during treatment are important limitations in the management of these patients.⁷

Refractoriness to the platinum-based drugs is the consequence of the complex participation of several MOC. These include MOC-1a. Thus, the expression of the CTR1 copper transporter, which is a major route for cisplatin uptake, in cells derived from human colon adenocarcinoma,⁸ is decreased in

Received: April 4, 2012

Revised: July 16, 2012

Accepted: July 16, 2012

Published: July 16, 2012

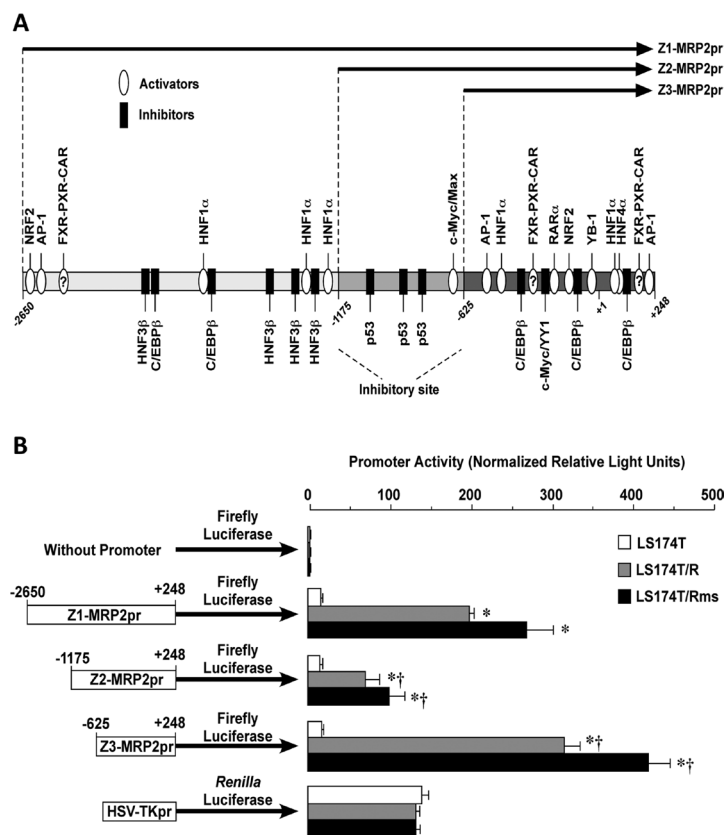


Figure 1. (A) Schematic representation of the 5'-flanking region of the human *ABCC2* gene from nucleotides -2650 to +248 relative to the main transcription start site. The open reading frame begins at nucleotide +249. The regions of the promoter cloned into the plasmids upstream of a reporter gene (Z1-, Z2- and Z3-MRP2pr), and the putative binding sites for transcription factors potentially involved in the regulation of MRP2 expression are depicted. (B) Transcriptional activity of MRP2 promoter (MRP2pr)-firefly luciferase (*Luc2*) fusion plasmids 72 h after being transfected in wild-type LS174T, and cisplatin-resistant cells without (LS174T/R) or with maintained stimulation due to the presence of cisplatin (LS174T/Rms). The constructs contain Z1-, Z2-, and Z3-MRP2pr preceding the ORF of the reporter gene. Numbers indicate positions relative to the main transcription start site. A *Luc2*-expression vector without any promoter was used as a negative control. A vector containing the herpes virus thymidine kinase promoter (HSV-TKpr) and the *Renilla* luciferase reporter gene was used to determine transfection efficiency. The luminescence signal is expressed as arbitrary units of light after normalizing by cell viability and transfection efficiency. Values are mean \pm SD from at least three independent transfection experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with luminescence of LS174T cells. †, $p < 0.05$, as compared with Z1-MRP2pr.

subclonal cells that exhibits acquired resistance to cisplatin.⁹ The development of this characteristic may also be due in part to an increase in drug efflux (MOC-1b) by exporting pumps such as the copper-transporting P-type ATPases ATP7A¹⁰ and ATP7B¹¹ and the multidrug-resistance related protein 2 (MRP2, gene symbol *ABCC2*).¹² Enhancement of the amount of glutathione (GSH) and the conjugating activity of GSH S-transferases (MOC-2), the ability of cancer cells to repair damaged DNA more efficiently (MOC-4), and changes in the control of the apoptosis/survival balance (MOC-5) have also been associated with an increased refractoriness to cisplatin.¹

The overexpression of MRP2 is considered to be one of the most important mechanisms accounting for the failure of cisplatin treatment in colon cancer.¹³ MRP2 is located at the apical membrane of several different polarized cells, such as hepatocytes,¹⁴ where this pump plays a key role in the canalicular secretion of glucuronated bilirubin.¹⁵ Because its substrate specificity, MRP2 plays a key role in the elimination from hepatocytes into bile, from kidney proximal tubules into

urine, and from intestinal epithelial cells into the intestinal lumen of potentially toxic compounds after being conjugated with GSH, glucuronic acid, or sulfate.

The expression of ABC proteins is regulated in response to many endogenous and xenobiotic compounds, including cisplatin.¹⁶ Most of these inducers are also able to affect the expression of drug-metabolizing phase II enzymes (MOC-2), indicating a coordinated regulation of the genes involved in the phase II and phase III steps of detoxification.¹⁷ Transcriptional regulation of these genes requires the cross-talk among a large variety of transcription factors, including NRF2¹⁸ and hepatocyte nuclear factors (HNF).¹⁹ Forming heterodimers with the retinoid X receptor α (RXR α), several nuclear receptors, such as farnesoid X receptor (FXR), pregnane X receptor (PXR), and the constitutive androstane receptor (CAR), are able to bind to hormone response elements in the promoter region of several ABC genes.²⁰ These nuclear receptors are activated by xenobiotics such as rifampicin and dexamethasone (PXR) or phenobarbital (CAR) and also by

endogenous compounds such as bile acids (FXR). Thus, up-regulation of ABC proteins in response to the activation of NRF2, HNFs, PXR, CAR, or FXR may play a role in preventing the accumulation of potentially toxic compounds in cells expressing these genes.

The initial aim of this study was to investigate the effects of cisplatin on MRP2 expression and to characterize the mechanism(s) responsible. However, because the results revealed an important up-regulation of the bile acid sensor FXR in response to the treatment with cisplatin, the question as to whether FXR might be involved in the up-regulation of MRP2 and in the reduced sensitivity of colon cancer cells to cisplatin was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)), chenodeoxycholic acid sodium salt (CDCA), probenecid, propidium iodide (PI), and rifampicin were obtained from Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain). Calcein acetoxymethyl ester (calcein AM) was from Invitrogen (Barcelona, Spain). GW4064 was kindly provided by Dr. Luis Alvarez (La Paz University Hospital, Madrid, Spain). According to the suppliers, the purity of these compounds was $\geq 97\%$. All other chemicals were of analytical grade.

Cloning Procedures. A 2899-bp zone of the 5'-flanking region of the *ABCC2* gene (Z1-MRP2pr) (Supporting Information Figure 1), previously identified as the proximal MRP2 promoter (MRP2pr) (GenBank accession number AF144630),²¹ was cloned using DNA obtained from HepG2 cells. Several binding sites for transcription factors in this region have been described^{19,21} or predicted with the Transcript Element Search Software (TESS, University of Pennsylvania, PA, USA). In addition, partially deleted MRP2pr constructs of 1423 bp and 873 bp, named here Z2-MRP2pr and Z3-MRP2pr, respectively, were also generated (Figure 1A). All constructs contained the 248-bp sequence located downstream of the transcription start site of the *ABCC2* gene up to the nucleotide prior to the coding region because deletion of this region is known to abolish MRP2pr activity.²¹ MRP2pr constructs were amplified by PCR using the high fidelity AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen), and specific oligonucleotide primers (Supporting Information Table 1), to which attB sites were added to obtain cDNA adapted for Gateway cloning. PCR products were recombined with the pDONR207 vector (Invitrogen) to generate Entry plasmids, which were further recombined with the pcDNA-DEST47 destination vector (Invitrogen), containing the C-terminal GFP reporter gene. MRP2pr-firefly luciferase (Luc2) fusion plasmids were obtained by Multisite Gateway cloning (Invitrogen). The pGL4.10-[Luc2] plasmid (Promega, Madrid, Spain) was used as template to amplify by PCR the coding sequence of Luc2 by using appropriate primers (Supporting Information Table 1). A promoter-less destination vector (pDEST/pL) was obtained from the pcDNA6.2/V5-DEST (Invitrogen) by excluding a fragment of this vector containing the CMV and T7 promoters. The coding sequences of FXR, more precisely the FXR α 1-isoform containing exons 1 to 3 and a 12-bp deletion in the exon 5, and RXR α were amplified by PCR from RNA from human liver (HepG2) and placenta (Jeg-3), respectively, by Gateway technology using gene-specific primers (Supporting Information Table 1). The coding sequence of BCRP had been previously cloned as reported elsewhere.²² The exact nucleotide

sequence of all constructs was confirmed by gel-electrophoresis-based sequencing.

Cell Cultures. Caco-2 (HTB-37) and LS174T (CL-188) cell lines, both derived from human colorectal adenocarcinoma, HepG2 (HB-8065), from human hepatoblastoma, JAR cells from human choriocarcinoma (HTB-144), and CHO-K1 (CCL-61), from Chinese hamster ovary, were purchased from the ATCC by way of LGC Standards (Barcelona, Spain) and cultured as recommended by the supplier. A cisplatin-resistant subline (LS174T/R) had previously been obtained in our laboratory.²³ Before using LS174T/R cells, they were cultured in the absence of cisplatin for 6 weeks. Alternatively, 10 μ M cisplatin was maintained in the culture medium (LS174T/Rms cells). Where indicated, the formazan test was used to determine cell viability (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Madrid, Spain).

Measurement of MRP-Mediated Calcein Efflux. Calcein efflux assays were carried out to evaluate the functional activity of MRP pumps.²⁴ Briefly, cells were incubated in 100 μ L of uptake medium (96 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.1 mM KH₂PO₄, 0.8 mM MgSO₄, 1.8 mM CaCl₂, 11 mM glucose, and 50 mM HEPES, pH 7.40) containing 1 μ M calcein AM and 50 μ g/mL PI at 37 °C for the indicated time periods. In some experiments, probenecid, a typical MRP inhibitor, was added together with the substrate. Then, 900 μ L of ice-cold uptake medium was added to stop the transport process, and intracellular fluorescence was determined immediately by flow cytometry with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Madrid, Spain). Dead cells, whose identification was based on PI staining, were excluded from the data analysis.

Cell Transfections and Reporter Gene Assays. Transient transfection of cells, that had been plated (25000 cells/cm²) 24 h previously was carried out with the lipofectamine LTX and PLUS reagents (Invitrogen). After 14 h in the presence of medium containing DNA-cationic lipid complexes, this was replaced by fresh culture medium. Cells were cultured for 72 h before the measurement of promoter activation, which was carried out by determining changes in the fluorescence of cells due to GFP expression by flow cytometry or in the luciferase activity, measured with the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) with a LAS-4000 image reader (FujiFilm; TDI, Madrid, Spain). The luminescence signal was expressed as arbitrary light units/min corrected by the amount of living cells in each well. Luciferase activity was also normalized by differences in transfection efficiency among the different cultures, as estimated by the *Renilla reniformis* luciferase activity of cells that had been transfected 72 h before with 100 ng of pGL4.74[hRluc/TK] vector (Promega). Photographs depicting GFP-expressing cells were obtained using a Nikon Eclipse TE 2000-S microscope (Nikon Instruments Europe; Amstelveen, The Netherlands).

Measurement of Steady-State mRNA Levels. Total RNA was isolated using RNA spin columns treated with RNase-free DNase I (GE Healthcare, Madrid, Spain), determined fluorimetrically with the RiboGreen RNA-Quantitation kit (Invitrogen), and used for cDNA synthesis using random primers and SuperScript III reverse transcriptase (SuperScript VILO cDNA Synthesis kit, Invitrogen). Real-time quantitative PCR (QPCR) was performed using gene-specific primers spanning exon-exon junctions in the target mRNA (Supporting Information Tables 2 and 3) and AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems,

Table 1. Effect of Cisplatin on the Expression of Drug Export Pumps^a

expression level	transporter		ΔCt		fold-change vs wild-type LS174T		
	protein	gene	wild-type LS174T	LS174T/FXR + GW4064	LS174T + cisplatin	LS174T/R	LS174T/Rms
high	Wilson	<i>ATP7B</i>	4.2 ± 0.8	≈1	↑ (2)	↑↑ (7)	↑↑ (7)
	MRP1	<i>ABCC1</i>	4.4 ± 0.9	≈1	↑↑ (4)	↑↑ (5)	↑↑ (6)
	ABCA2	<i>ABCA2</i>	4.5 ± 0.6	≈1	≈1	≈1	↓ (1/2)
	MDR1	<i>ABCB1</i>	4.8 ± 0.9	≈1	↑ (2)	↑ (2)	↑ (3)
	Menkes	<i>ATP7A</i>	5.2 ± 1.0	≈1	↑ (2)	≈1	≈1
	LRP	<i>MVP</i>	5.3 ± 0.7	≈1	↑↑ (7)	↑ (2)	↑ (2)
	MRP3	<i>ABCC3</i>	5.5 ± 0.9	≈1	↑↑ (5)	↑↑ (9)	↑↑↑ (13)
medium	MRP6	<i>ABCC6</i>	6.0 ± 0.9	↓ (1/2)	↑↑ (4)	↑↑ (5)	↑↑ (8)
	MRP2	<i>ABCC2</i>	6.1 ± 1.2	≈1	↑↑ (4)	↑↑↑ (353)	↑↑↑ (494)
	ABCA8	<i>ABCA8</i>	6.2 ± 0.8	↑↑ (4)	↓↓↓ (1/22)	↓↓↓ (1/20)	↓↓↓ (1/170)
	MRP5	<i>ABCC5</i>	6.2 ± 1.0	≈1	↑ (2)	↑ (2)	↑ (3)
	MDR3	<i>ABCB4</i>	6.7 ± 0.7	↑ (3)	≈1	↑ (3)	↑↑ (4)
	MRP7	<i>ABCC10</i>	6.8 ± 2.7	≈1	↑↑ (6)	↑ (2)	↑ (2)
	ABCA3	<i>ABCA3</i>	7.2 ± 1.2	≈1	≈1	↓ (1/2)	↓↓ (1/9)
low	MRP4	<i>ABCC4</i>	9.2 ± 0.4	≈1	≈1	↑↑ (9)	↑↑↑ (13)
	MRP8	<i>ABCC11</i>	9.4 ± 1.6	↑ (2)	↓ (2)	↓↓ (1/8)	↓↓↓ (1/27)
	BCRP	<i>ABCG2</i>	11.5 ± 2.3	↑↑↑ (17)	↑↑↑ (12)	↑↑↑ (196)	↑↑↑ (279)
	BSEP	<i>ABCB11</i>	11.5 ± 1.6	↑ (2)	↓ (1/3)	↓↓ (1/6)	↓↓ (1/8)
	ABCA6	<i>ABCA6</i>	12.0 ± 1.0	≈1	≈1	↓ (1/2)	↓ (1/2)

^aCells were wild-type (LS174T) and cisplatin-resistant without (LS174T/R) or with maintained stimulation due to the presence of cisplatin in the culture medium (LS174T/Rms). Some cultures of LS174T cells were exposed to 20 μM cisplatin for 72 h or transfected with FXR and RXRα and then treated with 1 μM GW4064 for 24 h. Levels of mRNA were measured in triplicate by RT-QPCR in samples from three different cultures. Ct, threshold cycle. ΔCt is the difference between Ct of the target gene and Ct of GAPDH (21.5 ± 0.7), and it is expressed as mean ± SD. The expression level is considered to be high when ΔCt < 6.0; medium, ΔCt 6.0–9.0; low, ΔCt > 9.0. The amount of mRNA was calculated by the formula 2^{-ΔΔCt}, where ΔΔCt is the difference between ΔCt of the target gene and ΔCt of a calibrator, which was human liver. Symbols indicating changes of expression are: ↑ or ↓, low; ↑↑ or ↓↓, high; ↑↑↑ or ↓↓↓, very high; ≈1, no significant change (change lower than 1.5-fold).

Madrid, Spain) in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were as follows: single cycles at 50 °C for 2 min and at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 60 s. Detection of the amplification products was carried out using SYBR Green I. The mRNA abundance of target genes in each sample was normalized on the basis of its GAPDH (Supporting Information Table 2).

Western Blot Analyses. Cells were washed with ice-cold PBS and lysed by incubation for 30 min in ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA; 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS dissolved in PBS) supplemented with protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Protein concentrations were determined using a modification of the Lowry method.²⁵ Cell lysates (20–100 μg protein) were boiled for 7 min, except for the detection of MRP2, for which the samples were not boiled. Immunoblotting analyses were carried out in SDS-PAGE gels, which were then transferred onto nitrocellulose membranes. Blots were probed with primary monoclonal antibodies against human MRP2 (clone M₂III-6), purchased from Alexis Biochemicals (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), against FXR (clone ab56902) and BCRP (BXP-21), from Abcam (Cambridge, United Kingdom), or against C/EBPβ (clone C-19), HNF1α (clone H-140), HNF3β (clone M-20), HNF4α (clone H-171), SHP (clone H-160), and GAPDH (clone 6C5), all provided by Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The appropriate horseradish peroxidase-linked secondary antibodies were from Invitrogen. An

enhanced chemiluminescence detection system (Hybond ECL; GE Healthcare) was used to visualize the bands.

Statistical Methods. Results are expressed as mean ± SD from at least three different cultures carried out in triplicate. To calculate the statistical significance of the differences, the paired Student *t*-test or the Bonferroni method of multiple-range testing were used, as appropriate.

RESULTS

Effect of Cisplatin on the Expression of Export Pumps in Colon Cancer Cells. The effect of cisplatin on the expression of a panel of export pumps was investigated using the colon cancer cell lines LS174T (Table 1) and Caco-2 (Table 2). Under basal conditions, both cell lines contained high mRNA levels of ATP7B, ABCA2, and LRP. ATP7A, MDR1, MRP1, and MRP3 were also highly expressed in LS174T cells, but not in Caco-2 cells, whereas the opposite was the case for MRP4, ABCA3, BCRP, and MRP2. The expression of the other proteins studied here were medium or low in both cell lines (Tables 1 and 2).

The effect of cisplatin was first investigated after short-term exposure (72 h) to concentrations close to the IC₅₀ previously determined for this drug in these cell lines.²⁶ Thus exposure of LS174T cells to cisplatin induced an up-regulation (4 to 12-fold) of many of the proteins such as BCRP, LRP, and several MRP pumps (namely, MRP1, MRP2, MRP3, MRP6, and MRP7) (Table 1). In contrast, several proteins with minor or uncertain role in chemoresistance, such as ABCA2, 3, 6, and 8, were down-regulated (Table 1). This was also found for MRP8 and BSEP, although they were poorly expressed in LS174T

Table 2. Effect of Cisplatin on the Expression of Drug Export Pumps^a

expression level	transporter		ΔCt	fold-changes vs Caco-2
	protein	gene	Caco-2	Caco-2 + cisplatin
high	MRP2	ABCC2	3.2 ± 0.3	↑ (2)
	Wilson	ATP7B	3.6 ± 0.3	≈1
	MRP4	ABCC4	4.6 ± 0.6	↓ (1/2)
	ABCA3	ABCA3	5.3 ± 1.4	↓ (1/3)
	LRP	MVP	5.4 ± 0.1	≈1
	BCRP	ABCG2	5.8 ± 1.2	↑↑ (9)
	ABCA2	ABCA2	5.9 ± 1.1	≈1
medium	MRP3	ABCC3	6.9 ± 0.2	↑↑ (4)
	MRP1	ABCC1	7.0 ± 0.1	↑ (3)
	MRP5	ABCC5	7.0 ± 0.2	↑ (3)
	MRP6	ABCC6	8.2 ± 1.0	↑ (2)
	MDR1	ABCB1	8.6 ± 0.7	↑ (2)
	Menkes	ATP7A	8.7 ± 0.1	≈1
low	ABCA6	ABCA6	9.1 ± 0.4	↓ (1/2)
	MRP7	ABCC10	10.4 ± 0.1	≈1
	ABCA8	ABCA8	12.1 ± 0.8	↓↓↓ (1/21)
	MRP8	ABCC11	12.4 ± 0.1	≈1
	MDR3	ABCB4	13.7 ± 1.7	↓↓↓ (ND)
	BSEP	ABCB11	16.6 ± 3.1	↓↓↓ (ND)

^aSteady-state levels of mRNA in Caco-2 cells, exposed or not to 25 μM cisplatin for 72 h, were measured in triplicate by RT-QPCR in samples from three different cultures. Ct, threshold cycle. ΔCt is the difference between Ct of the target gene and Ct of GAPDH (20.4 ± 1.1), and it is expressed as mean ± SD. The expression level is considered to be high when ΔCt < 6.0; medium, ΔCt 6.0–9.0; low, ΔCt > 9.0. The amount of mRNA of a target gene was calculated by the formula 2^{-ΔΔCt}, where ΔΔCt is the difference between ΔCt of the target gene and ΔCt of a calibrator, which was human liver. Symbols indicating changes of expression are: ↑ or ↓, low; ↑↑ or ↓↓, high; ↑↑↑ or ↓↓↓, very high; ≈1, no significant change (change lower than 1.5-fold). ND, not detected.

cells. When Caco-2 cells were treated with cisplatin, an up-regulation of BCRP, MDR1, and MRPs, namely MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MRP6, was observed (Table 2), whereas ABCA8 was also down-regulated in these cells (Table 2).

Changes in the expression profile due to long-term exposure to cisplatin (LS174T/R cells) were similar although in most genes of higher magnitude than those observed after short-term treatment (Table 1). The up-regulation of MRP2 (353-fold) was remarkable. The enhanced expression of other export pumps, although in some cases (ATP7B, MRP1, MRP3, MRP4, and MRP6) strong, was much lower than that of MRP2. When cisplatin was maintained in the culture medium of LS174T/R cells (LS174T/Rms), the changes in the expression pattern were more marked (Table 1). Although the basal expression of BCRP was low, this pump was markedly up-regulated in response to short-term incubation cisplatin (12-fold) as well as in LS174T/R (196-fold) and LS174T/Rms (279-fold) cells (Table 1).

Western blot analysis indicated that cisplatin-resistant LS174T/R cells displayed higher levels of MRP2 (Figure 2A) and BCRP (Figure 2B) proteins than LS174T cells. This difference was further marked when resistant cells were cultured under maintained stimulation due to the presence of

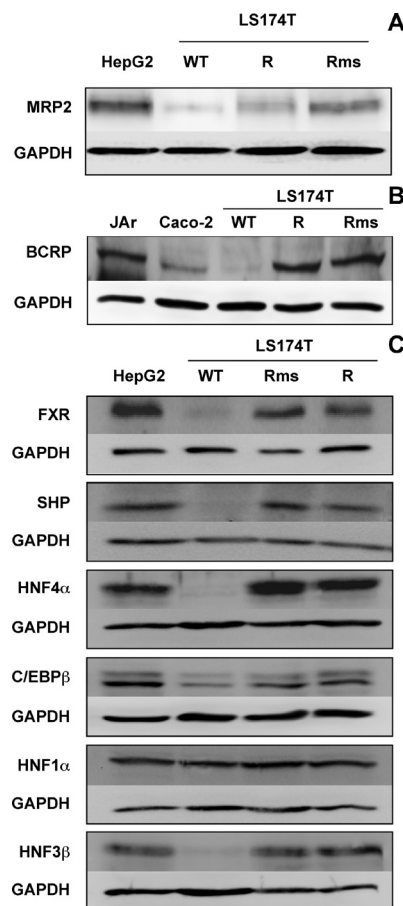


Figure 2. Representative image of Western blot analysis of MRP2 (A), BCRP (B), and different transcription factors (C) carried out with lysates of the following cells: HepG2, JAr and Caco-2 (positive controls), and LS174T, and the cisplatin-resistant cells without (LS174T/R) or with (LS174T/Rms) maintained exposure to cisplatin. Detection was performed using appropriate primary monoclonal antibodies. Western blotting of GAPDH was also performed as a control of the protein loaded in each lane.

cisplatin in the culture medium (LS174T/Rms cells) (Figure 2A). This was also seen for BCRP (Figure 2B).

On the basis of results described above, the role of enhanced expression of MRP2 and BCRP in resistance to cisplatin was investigated. The studies were focused on the three models obtained from LS174T cells. First, we evaluated the functional expression of MRPs in the cells by determining the intracellular accumulation of calcein, a substrate of several members of the MRP family. Flow cytometry analyses revealed that the cellular contents of calcein were lower in LS174T/R than in LS174T cells (Figure 3A,B), which was consistent with the higher functional expression of MRPs in the resistant cells. The ability to prevent calcein accumulation was higher in LS174T/Rms cells (Figure 3A,B). Probenecid, a well-known MRP inhibitor, significantly increased the accumulation of calcein in these three cell lines, although the probenecid-sensitive fraction of calcein accumulation was higher in LS174T/R and LS174T/Rms than in LS174T cells (Figure 3C).

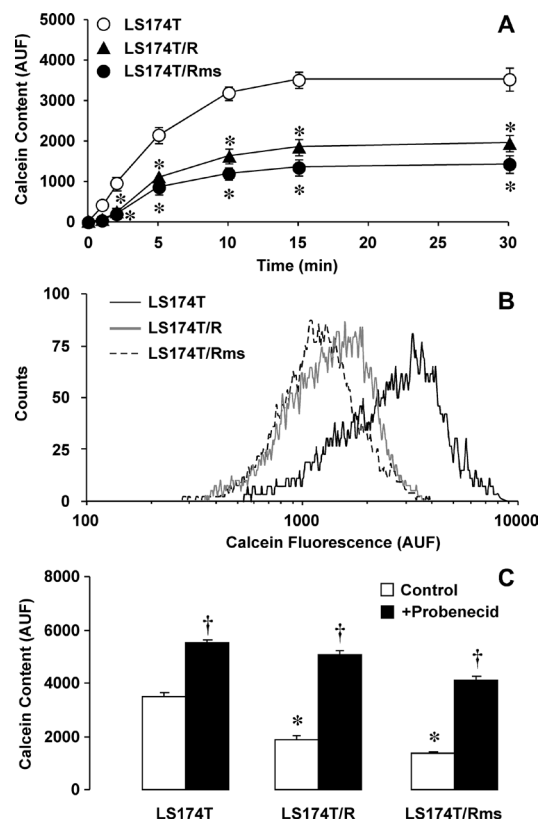


Figure 3. (A) Time-course of calcein content in wild-type LS174T and cisplatin-resistant cells without (LS174T/R) or with maintained stimulation due to the presence of cisplatin (LS174T/Rms). The cells were incubated with $1 \mu\text{M}$ calcein acetoxymethyl ester (calcein AM) and $50 \mu\text{g/mL}$ of propidium iodide (PI) at 37°C for the indicated time. Values are the mean fluorescence intensities (AUF, arbitrary units of fluorescence) measured by flow cytometry. Dead cells based on PI staining were excluded from the analysis. (B) Representative frequency histogram of calcein fluorescence of non-PI-stained cells after incubation at 37°C for 30 min. (C) Effect of probenecid on calcein content of non-PI-stained cells. Values are the mean fluorescence intensities after incubating the cells with $1 \mu\text{M}$ calcein AM and $50 \mu\text{g/mL}$ of PI, with or without $500 \mu\text{M}$ probenecid, at 37°C for 30 min. Results are expressed as mean \pm SD from at least three determinations per data point using cells from three different cultures. *, $p < 0.05$, as compared with LS174T cells. †, $p < 0.05$, as compared with cells incubated in the absence of inhibitor.

Determination of MRP2 Promoter Activity. To investigate the mechanisms accounting for the cisplatin-induced up-regulation of MRP2, the transcriptional activity of the MRP2 promoter was determined in LS174T and LS174T/Rms cells transfected with GFP-reporter gene vectors. Because Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) do not express MRP2, these were used as negative controls. Flow cytometry analysis revealed a marked shift in the fluorescence histogram when cells were transfected with the plasmid containing GFP under the control of the CMV promoter (Supporting Information Figure 1A–C). When cells were transfected with Z1-MRP2pr-GFP, no increase in the fluorescence of CHO-K1 cells was found (Supporting Information Figure 1A). This was consistent with the previously described poor ability of these cells to

activate MRP2pr.¹⁹ In contrast, the transfection of LS174T and LS174T/Rms cells with Z1-MRP2pr-GFP resulted in the appearance in the culture of green fluorescent cells and a moderate shift in the GFP-fluorescence histogram, which in the case of LS174T/Rms cells was of higher magnitude (Supporting Information Figure 1B–C).

To measure the activation of MRP2pr accurately, a construct containing luciferase as the reporter gene was used. Luciferase activity was barely detectable in cells transfected with the promoterless vector (Figure 1B). In contrast, transfection with the Z1-, Z2-, or Z3-MRP2pr-Luc2 plasmids into LS174T cells stimulated luciferase activity with similar efficacy for all constructs (Figure 1B). As compared with LS174T cells, a dramatic stimulation of MRP2pr activity was found in LS174T/R cells, which was even higher in LS174T/Rms cells. This occurred despite a similar transfection efficiency in LS174T, LS174T/R, and LS174T/Rms cells, as estimated by *Renilla* luciferase expression driven by the herpes virus thymidine kinase (HSV-TK) promoter, was obtained (Figure 1B). The order of MRP2pr transcriptional activity was Z3-MRP2pr > Z1-MRP2pr > Z2-MRP2pr.

Stimulation of the MRP2 Promoter by Cisplatin. The response to rifampicin (Figure 4A) and cisplatin (Figure 4B)

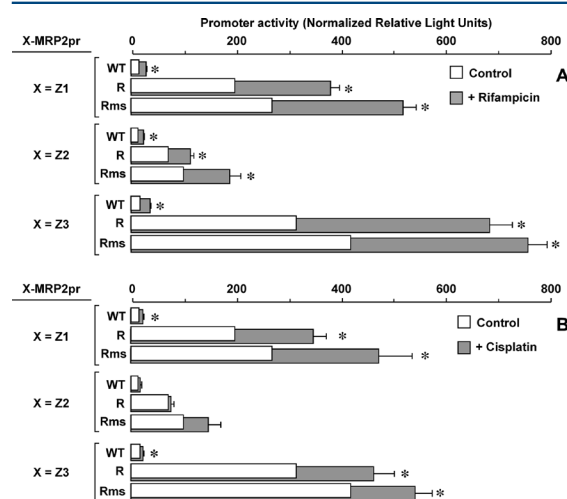


Figure 4. Induction of activity of the MRP2 promoter (MRP2pr) by rifampicin and cisplatin in wild-type LS174T (WT) and cisplatin-resistant cells without (LS174T/R) (R) or with maintained stimulation due to the presence of cisplatin (LS174T/Rms) (Rms) cells. Cells were transiently transfected with Z1-, Z2-, or Z3-MRP2pr-firefly luciferase fusion plasmids 72 h before the luciferase assay was carried out. Either $10 \mu\text{M}$ rifampicin (A) or $5 \mu\text{M}$ cisplatin (B) were added 48 h after transfection. The luminescence signal is expressed as arbitrary units of light after normalizing by cell viability and transfection efficiency. Values are expressed as mean \pm SD from at least three transfection experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with controls.

was investigated using LS174T, LS174T/R, and LS174T/Rms cells transfected with different fragments of MRP2pr preceding Luc2. Rifampicin was used as a positive control because it is a well-known inducer of MRP2 expression²⁷ through the activation of PXR.²⁰ In the present study, rifampicin significantly increased luciferase activity driven by Z1-, Z2-, or Z3-MRP2pr in LS174T, LS174T/R, and LS174T/Rms cells

(Figure 4A). Incubation with cisplatin also resulted in the stimulation of luciferase activity in cells transfected with Z1-MRP2pr or Z3-MRP2pr as compared with each cell type in the absence of cisplatin (Figure 4B). However, cisplatin-induced stimulation was very poor when cells were transfected with Z2-MRP2pr. The concentration of cisplatin used in these experiments was 5 μ M because preliminary studies revealed that higher concentrations were toxic for LS174T cells (data not shown).

Expression of Transcription Factors Involved in Activation of the MRP2 Promoter. Using RT-QPCR the expression of a panel of transcription factors that have been associated with the xenobiotic-mediated induction of cisplatin resistance or the enhanced expression of MRPs was measured in cisplatin-sensitive and -resistant cells (Figure 5). On

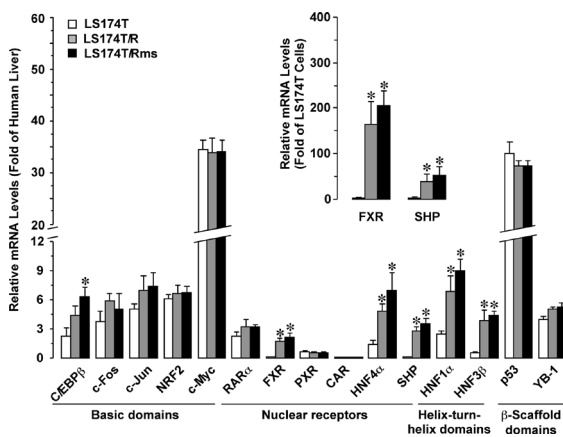


Figure 5. Relative expression of different transcription factors measured by RT-QPCR in wild-type LS174T and cisplatin-resistant cells without (LS174T/R) or with maintained stimulation due to the presence of cisplatin (LS174T/Rms). Transcription factors are classified according to the structure of their DNA-binding domains. Levels of mRNA are expressed in comparison with those found in a pool of healthy human liver used as the calibrator or in LS174T cells (inset). Values are mean \pm SD from at least three cultures performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with LS174T cells.

comparing the results obtained in LS174T, LS174T/R, and LS174T/Rms, no significant differences in the mRNA levels of AP-1 (c-Fos/c-Jun heterodimer), NRF2, c-Myc, RAR α , PXR, CAR, p53, and YB-1 were found (Figure 5). However, in cisplatin-resistant cells, the expression of C/EBP β , HNF4 α , HNF1 α , and HNF3 β was significantly enhanced (2- to 5-fold). The up-regulation was dramatic in the case of FXR (\approx 200-fold) and SHP (\approx 50-fold) (Figure 5). The results concerning protein abundance as determined by Western blot analysis were consistent with the enhanced expression of these genes (Figure 2C).

Effect of FXR Activation. To elucidate whether FXR up-regulation resulted in enhanced function, the ability of the FXR-mediated pathway to respond to CDCA and GW4064 was investigated. Owing to the presence of cisplatin in the culture medium of LS174T/Rms cells, these were not used in this set of experiments in order to rule out any potential artifact. Under basal conditions, the expression of MRP2 and the well-known FXR target genes FGF19, SHP, OST α , and OST β was already higher in LS174T/R than in LS174T cells, except for OST α

(Figure 6). In LS174T cells, with very low levels of FXR (Figures 2 and 5), both GW4064 and CDCA had little effect on

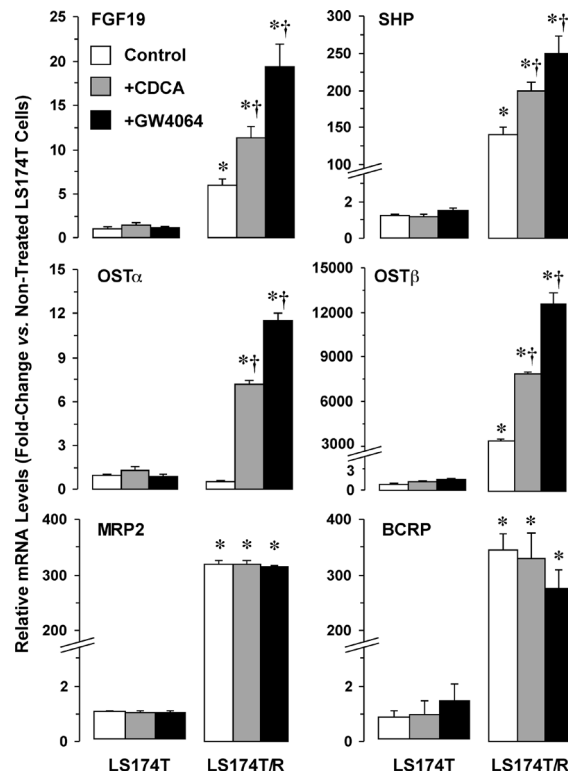


Figure 6. Effect in LS174T and LS174T/R cells of treatment with FXR agonists on the expression of well-known FXR target genes (FGF19, SHP, OST α/β) together with MRP2 and BCRP. The levels of mRNA in cells treated with 100 μ M chenodeoxycholic acid (CDCA) or 1 μ M GW4064 for 24 h were measured by RT-QPCR and expressed in comparison with those found in LS174T cells treated only with DMSO as vehicle. Values are means \pm SD from three independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with LS174T cells. †, $p < 0.05$, as compared with controls.

the expression of these genes. In contrast, in LS174T/R cells, GW4064 and CDCA stimulated the expression of FGF19, SHP, OST α , and OST β , but not that of MRP2 and BCRP, which were already highly up-regulated in absence of FXR agonists (Figure 6).

FXR Activation Protects against Cisplatin-Induced Toxicity. The functional repercussions regarding the chemoresistance of the enhanced expression of FXR were investigated. GW4064 did not modify the sensitivity of LS174T cells to cisplatin (Figure 7A). In contrast, GW4064 increased cisplatin resistance in LS174T/R cells (Figure 7A). Whether this effect could be induced in LS174T cells by enhancing the expression of FXR was investigated. In contrast to the absence of effect in LS174T cells transfected with mock vectors, GW4064 was able to stimulate chemoresistance against cisplatin in LS174T cells transfected with FXR and RXR α (Figure 7B). Thus, no effect of GW4064 on the IC₅₀ was observed in LS174T cells both nontransfected and transfected with mock vectors (Figure 7C). In contrast, GW4064 induced a significant increase in the IC₅₀ in nontransfected LS174T/R cells and LS174T cells transfected

Objetivos, Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Bibliografía, English Summary

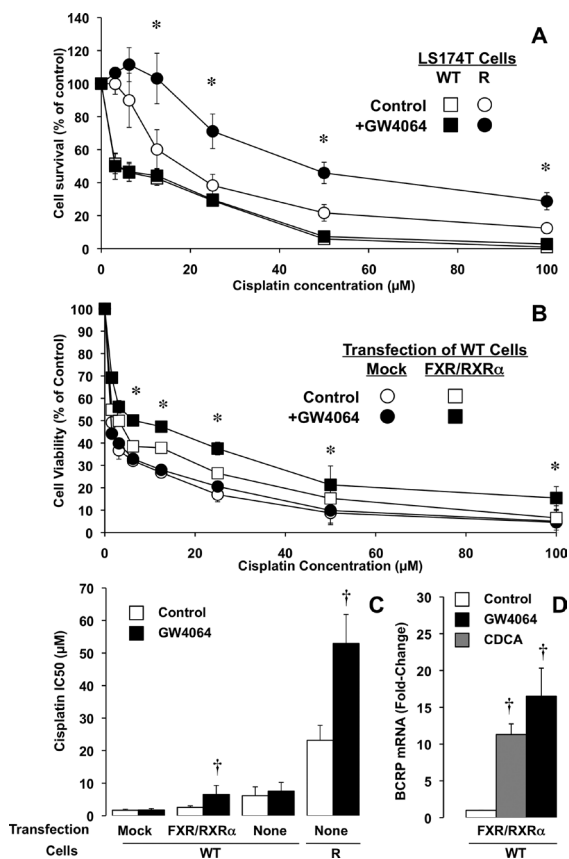


Figure 7. Protective effect of FXR activation against cisplatin-induced cell death. (A) Wild-type (WT) LS174T cells and cisplatin resistant (R) LS174T/R cells were incubated without (control) or with 1 μM GW4064 for 72 h. (B) WT cells were transfected with an empty vector (Mock) or FXR plus RXRα 48 h before being incubated without (control) or with 1 μM GW4064 for 72 h. (C) Comparison of IC₅₀ values for cisplatin in WT and R cells with and without transfection and with and without treatment with GW4064 from concentration–response studies similar to those of A and B. The proportion of living cells in comparison with nontreated plates (control = 100% viability) was determined by the formazan test. IC₅₀ was calculated as the cisplatin concentration able to reduce cell viability by 50%. (D) BCRP up-regulation in LS174T cells transfected with FXR plus RXRα 48 h before being incubated without (control) or with 1 μM GW4064 or 50 μM chenodeoxycholic acid (CDCA) for 24 h. Values are mean ± SD from at least three experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, on comparing the highest versus the lowest viability. †, $p < 0.05$, as compared with or without GW4064.

with FXR and RXRα (Figure 7C). This protective effect was detected in spite of the low (5%) efficiency of transfection, as determined by immunofluorescence in parallel plates in which the vector used for transfection contained GFP instead FXR (data not shown).

Role of BCRP in FXR-Induced Resistance to Cisplatin.

Finally, we investigated whether FXR-mediated protection against cisplatin toxicity might be due to an enhancement in the expression of ABC proteins other than MRP2. Incubation with GW4064 of LS174T cells transfected with FXR and RXRα resulted in minor changes regarding the most abundantly

expressed ABC proteins. A marked up-regulation was only observed for BCRP (17-fold), which under basal conditions was poorly expressed in these cells (Table 1). Activation of FXR with CDCA was also able to induce BCRP expression (Figure 7D). Using TESS software, the in silico analysis revealed the presence of several putative FXR response elements in DNA region located 5' upstream of *ABCG2* gene (Table 3). When BCRP was transfected in LS174T cells, this conferred resistance to mitoxantrone, a well-known BCRP substrate. IC₅₀ value was increased 25-fold (Figure 8A). Similarly, BCRP transfected cells were more resistant to cisplatin whose IC₅₀ value was increased 2.4-fold (Figure 8B).

DISCUSSION

The overexpression of ABC export pumps is one of the major mechanisms accounting for the poor response of gastrointestinal tumors to anticancer agents,¹ including cisplatin.¹⁶ In the present study cisplatin was found to induce a typical multidrug-resistance (MDR) phenotype in colon cancer cells, which was characterized by an increased expression of a broad range of ABC proteins. This included pumps with no ability to transport this drug, such as MDRI, MRP1, or MRP3, together with others, such as MRP2, which is known to play a major role in the poor response of colon cancer and other tumors to cisplatin,¹³ and BCRP, whose role in cisplatin resistance was unknown. Regarding MRP2, a correlation between the expression levels of this protein and the sensitivity to cisplatin of several cell lines has been reported.^{28,29} Moreover, stable transfection of MRP2 cDNA into cells results in the acquisition of resistance to cisplatin.¹² In agreement with these findings, the up-regulation of MRP2 in LS174T/R cells has been previously suggested to be involved in the ability of these cells to reduce the net uptake of cisplatin.^{9,23} This characteristic is abolished by probenecid, which restores the sensitivity of LS174T/R cells to cisplatin-induced toxicity.⁹

The question arises as to whether cisplatin is able to activate MRP2 promoter directly. As previously reported,¹⁹ we observed that CHO-K1 cells were unable to activate MRP2pr and hence GFP was not synthesized when these cells were transfected with Z1-MRP2pr-GFP. In contrast, as indicated by the shift in the GFP-fluorescence histogram from flow cytometry analysis and the enhancement in luciferase activity when these cells were transfected with Z1-MRP2pr-GFP or Z1-MRP2pr-luciferase, respectively, MRP2pr was activated in LS174T cells. Moreover, in agreement with changes observed in MRP2 mRNA levels, basal MRP2pr activity was higher in LS174T/R cells than in LS174T cells. Maintained stimulation of resistance in LS174T/Rms cells resulted in an increased response to transfection with both Z1-MRP2pr-GFP and Z1-MRP2pr-luciferase.

It has been suggested that DNA-damaging agents induce the up-regulation of the rat *Abcc2* gene,³⁰ and probably also the human orthologue gene *ABCC2*,³¹ via response elements located at approximately –250 bp upstream of the transcription start site, although the identity of the transcription factors remains unknown. To investigate the sensitivity of different regions of MRP2pr to the treatment with cisplatin, the promoter was partially deleted (Z2-MRP2pr). The response of both cisplatin-sensitive and -resistant cells to transfection with this construct was markedly reduced. This suggests the existence of binding sites for inhibitory transcription factors in the sequence located between –1175 and –625 bp. Among the potential inhibitory transcription factors involved in this effect

Table 3. In Silico Evaluation of Potential Sites for FXR/RXR Interaction with the DNA Region Located 5' Upstream of ABCG2 Gene

position ^a	sequence	RE ^b	Sns ^f	TESS scores			
				La ^d	La/ ^k	Lq ^l	Ld ^m
-8973 to -8968	TGAACT	half-site	R ^h			SIU-NCS ⁱ	
-8755 to -8743	tCACCTnAGGTCA	ER-1 ^c	N ^g			SIU-NCS	
-8748 to -8735	AGGTCAAnnAGtTCg	DR-2 ^d	N	22	1.57	0.917	2
-8290 to -8285	TGAACT	half-site	R			SIU-NCS	
-8222 to -8210	aGACTTnTGACCT	DR-1	R	14.06	1.28	0.894	1.67
-8034 to -8022	caCTCAnTGACCT	IR-1 ^c	R	22	1.57	0.917	2
-8022 to -8016	TGA ^t CCCT	half-site	R	16	2	1	0
-7988 to -7983	TGACCc	DR-1	R	14	2	1	0
-6813 to -6800	TGAaCTnnTGACCT	DR-2	R	24	1.71	1	0
-6563 to -6551	AGGcCAngagCCa	IR-1	N			SIU-NCS	
-6458 to -6446	aGACTnTGACCc	DR-1	R			SIU-NCS	
-6151 to -6138	AGGcCAAnnAGtTCA	DR-2	N	22	1.57	0.917	2
-5760 to -5755	TGAACT	half-site	R			SIU-NCS	
-5439 to -5426	AGGTCAAnnAGtTCg	DR-2	N	22	1.57	0.917	2
-5391 to -5379	TcACCTnAGGTCA	ER-1	N	22	1.57	0.917	2
-4387 to -4382	TGAACT	half-site	N			SIU-NCS	
-4198 to -4181	ctGTCTn(6)TGACCT	IR-6	N	22	1.29	0.917	2
-4155 to -4150	TGAACT	half-site	R			SIU-NCS	
-3994 to -3982	AGGgCAAnAGGgCA	IR-1	N	22	1.69	0.917	2
-3879 to -3860	TGACCTn(8)AGGTCC	ER-8	N			SIU-NCS	
-3752 to -3747	TGAACT	half-site	N			SIU-NCS	
-2911 to -2906	TGAACT	half-site	R			SIU-NCS	
-2643 to -2631	GAGTTCnTGtCCCT	IR-1	N			SIU-NCS	
-2115 to -2110	TGAACT	half-site	N			SIU-NCS	
-357 to -344	AGGTCAAnnCAGgT	IR-2	N	12.53	1.25	0.905	1.32

^aPosition is counted 5' upstream of transcription start site. ^bRE, response element. ^cER, everted repeat. ^dDR, direct repeat. ^eIR, inverted repeat. ^fSns, sense of the site. ^gN, normal. ^hR, reverse. ⁱSIU-NCS, site identified by user, non-calculated scores. ^jLa, log-likelihood score, higher is better, maximum is 24. ^kLa/, La/Len, higher is better, maximum is 2.0. ^lLq, higher is better, maximum is 1.0. ^mLd, 0 is best, higher is worse.

is p53. This is able to inhibit the expression of ABC genes such as ABCB1³² and ABCC1.³³ Indeed, in silico analysis predicted the existence in the MRP2pr -1175 to -625 region of several binding sites for p53. Response elements for several transcription factors that may behave as enhancers, such as AP1, HNF1 α , or NRF2,¹⁹ are present in the deleted region of Z1-MRP2pr (-2650 to -1176). This may account for the recovery of the activity in Z1-MRP2pr as compared to Z2-MRP2pr. Z3-MRP2pr was the construct with the strongest activity, which was probably due to the lack of inhibitory response elements present in Z2-MRP2pr, whereas Z3-MRP2pr still contained the majority of binding sites for MRP2pr activators.

The enhanced activity of MRP2pr in LS174T/R cells paralleled changes in the expression of several transcription factors, such as HNF1 α and HNF4 α . Both have been reported to activate MRP2pr as part of detoxification processes associated with oxidative stress.³⁴ This is consistent with a link between HNF expression and cisplatin-induced chemical stress, as was observed here. Although HNF3 β and C/EBP β were also increased in LS174T/R cells, they probably do not contribute to resistance to cisplatin in these cells because a negative effect of these transcription factors in the regulation of MRP2, by overriding the stimulatory effect of HNF1 α and 4 α , is expected to occur.¹⁹ PXR is activated by many xenobiotics, including rifampicin, which through this mechanism enhances MRP expression and induces chemoresistance in tumor cells.³⁵ Nevertheless, a major direct role of PXR in the MDR phenotype of LS174T/R and LS174T/Rms cells was ruled out because: (i) the expression of PXR in LS174T cells was

poor, (ii) this was not enhanced in cisplatin-treated cells, whereas, in contrast, other transcription factors were up-regulated, and (iii) removal from the medium of the potential PXR ligand, i.e., cisplatin, did not markedly reduce MDR phenotype of chemoresistant cells.

In contrast, a remarkable finding of the present study was the dramatic up-regulation of FXR in cisplatin-resistant cells which may be also due to activation of HNF-dependent signaling pathway as has been suggested.³⁶ In LS174T/R cells under basal conditions, and after induction with the FXR agonists CDCA and GW4064, the expression of typical FXR target genes, such as FGF19, SHP, OST α , and OST β , was enhanced. This suggests a stimulated activity of the FXR-mediated pathway. However, FXR agonists failed to stimulate MRP2 expression, which suggests that, at least in these human cells, MRP2 is not a target gene of FXR. The reported absence of any correlation between the expression levels of FXR and MRP2 in human liver samples³⁷ supports this concept. The regulation of MRP2 expression may be different in rodents because rat Fxr has been found to bind to an unusual ER-8 element, which is present in the rat MRP2 promoter,²⁰ but not in the human orthologue MRPpr. Surprisingly, activation of FXR resulted in enhanced expression of BCRP, which up to now was not included as a target gene for this nuclear receptor in spite of the fact that the promoter region contains several putative FXR response elements.

The activation of FXR in LS174T/R cells by GW4064 partly protected the cells against the toxic effect of cisplatin. This could also be reproduced in wild-type cells by transfecting both

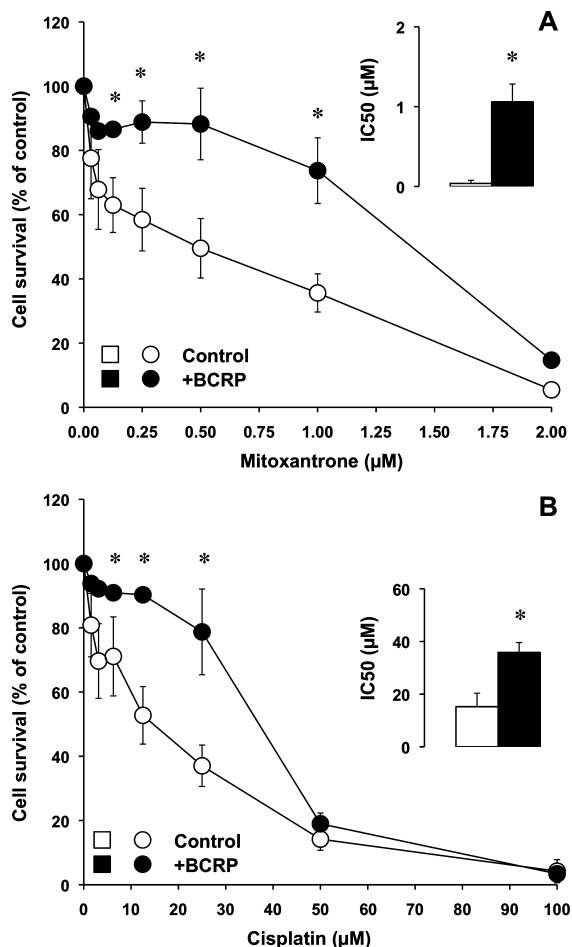


Figure 8. Chemoresistance induced by BCRP expression against toxic effect induced by mitoxantrone and cisplatin. Using the formazan test, cell viability was determined in wild-type LS174T cells transfected with an empty vector (control, ○) or with a vector containing the complete ORF of human BCRP (●) and incubated with mitoxantrone (A) or cisplatin (B) at the indicated concentrations for 72 h in order to calculate the IC₅₀ value (insets). Values are mean ± SD from three experiments performed in triplicate. *, *p* < 0.05, as compared with control.

FXR and RXR α , followed by activation with GW4064. Although FXR is considered to be the natural and specific target for bile acids,³⁸ our results indicate that chemoresistance elicited by cisplatin may involve FXR in a bile acid-independent manner. This suggests that FXR may be part of a complex and poorly understood system of defense to chemical stress. Thus, in this sense, a role of FXR in the protection of gastrointestinal epithelia against potentially toxic compounds,³⁹ or even in enhanced resistance to apoptosis of tumor gastric cells,⁴⁰ has been suggested. The mechanism is poorly understood, but this may involve DNA damage-induced activation of MAPKs signaling pathway, which resulted in enhanced activity of a specific protein kinase C able to phosphorylate FXR. The transcriptional activity of this nuclear receptor seems to be higher when the protein is phosphorylated.⁴¹

Finally, we wondered about the MOC actually involved in FXR-induced protection against cisplatin toxicity. Besides the up-regulation of MRP2, which probably plays a major role in cisplatin-induced chemoresistance, but through an FXR-independent mechanism, the involvement of other genes must be considered. In this respect, an interesting finding was the ability of cisplatin treatment to induce the expression of BCRP. This was particularly high in cisplatin-resistant cells. Similar results in cells derived from esophageal carcinoma with acquired resistance to cisplatin have been reported.⁴² Moreover, FXR activation was also able to up-regulate BCRP. Functional experiments carried out here revealed that indeed BCRP transfection to colon cancer cells conferred protection against a well-known substrate of BCRP, such as mitoxantrone, as well as against cisplatin. However, in LS174T/R cells, FXR activation was able to further reduce sensitivity to cisplatin in spite of the fact that BCRP expression was not further increased. This suggests that other mechanisms are also involved in FXR-mediated enhanced chemoresistance.

The up-regulation in cisplatin-resistant cells of other pumps able to export this drug, such as MRP6 and ATP7B found here, and the previously reported down-regulation of uptake transporters, such as CTR1 or SLC31A1,⁹ may contribute to the reduction in the intracellular levels of the drug in these cells (MOC-1). Conjugation with glutathione, which plays an important role in cisplatin inactivation by tumor cells (MOC-2) and which is enhanced in LS174T/R cells,²³ and an alteration in the p53 status (MOC-5), may also contribute to FXR-dependent cisplatin-induced MDR phenotype of LS174T/R.²³

In conclusion, in colon cancer cells, treatment with cisplatin induces changes in the expression of a broad range of ABC proteins, in particular, MRP2 and BCRP. Both the enhanced expression of MRP2, which occurs in an FXR-independent manner, and the activation of FXR-mediated mechanisms, which include BCRP up-regulation, are involved in the development of cisplatin-induced MDR phenotype.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Oligonucleotide sequences of gene-specific regions of primers used in Gateway cloning. Gene-specific oligonucleotide sequences for primers used to determine the expression of genes encoding drug efflux pumps and the normalizer GAPDH by real-time quantitative RT-QPCR. Gene-specific oligonucleotide sequences for primers used to determine the expression of transcription factors and gene targets of FXR by real-time quantitative RT-QPCR. Representative frequency histograms of the GFP fluorescence of CHO-K1, LS174T, and LS174T/Rms cells transfected with GFP reporter gene-plasmids. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*For J.J.G.M.: phone, (34) 923 294674; fax, (34) 923 294669; E-mail, jjgmarin@usal.es; address, Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, ED-S-09, 37007-Salamanca, Spain. For O.B.: phone, (34) 923 294674; fax, (34) 923 294669; E-mail, obriz@usal.es; address, Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, ED-S-09, 37007-Salamanca, Spain.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Luis Alvarez (La Paz University Hospital, Madrid, Spain) for the generous donation of GW4064 and Nicholas Skinner (University of Salamanca) for the revision of the English spelling, grammar, and style of the manuscript. This study was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III, FIS (grant PI110337), the Junta de Castilla y Leon (grants GR75/08, BIO39/SA27/10, SA023A11-2, and SA070A11-2), Spain, the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (grants SAF2009-08493 and SAF2010-15517), Fundación Samuel Solórzano Barruso (FS/1-2011), Spain, and the Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña (Convocatoria 2009), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), cofunded by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, and the European Regional Development Fund (ERDF) (grant BFU2007-30688-E) and belongs to the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Spain. Ester Gonzalez-Sanchez and Javier Vaquero are recipients of predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación, Spain (grants AP2008-03762 and AP2007-00105, respectively).

ABBREVIATIONS USED

ABC, ATP-binding cassette; CDCA, chenodeoxycholic acid; C/EBP β , CCAAT-enhancer binding protein- β ; FXR, farnesoid X receptor; HNF, hepatic nuclear factor; Luc2, firefly luciferase; MOC, mechanism of chemoresistance; MRP, multidrug resistance-associated protein; PI, propidium iodide

REFERENCES

- Marin, J. J.; Romero, M. R.; Briz, O. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (8), 709–740.
- Boulikas, T.; Vougiouka, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol. Rep.* **2003**, *10* (6), 1663–1682.
- de Gramont, A.; Figer, A.; Seymour, M.; Homerin, M.; Hmissi, A.; Cassidy, J.; Boni, C.; Cortes-Funes, H.; Cervantes, A.; Freyer, G.; Papamichael, D.; Le Bail, N.; Louvet, C.; Hendl, D.; de Braud, F.; Wilson, C.; Morvan, F.; Bonetti, A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18* (16), 2938–2947.
- Andre, T.; Boni, C.; Mounedji-Boudiaf, L.; Navarro, M.; Tabernero, J.; Hickish, T.; Topham, C.; Zaninelli, M.; Clingan, P.; Bridgewater, J.; Tabah-Fisch, I.; de Gramont, A. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350* (23), 2343–2351.
- Scott, N. A.; Susnerwala, S.; Gollins, S.; Myint, A. S.; Levine, E. Preoperative neo-adjuvant therapy for curable rectal cancer—reaching a consensus 2008. *Colorectal Dis.* **2009**, *11* (3), 245–248.
- Sharif, S.; O'Connell, M. J.; Yothers, G.; Lopa, S.; Wolmark, N. FOLFIRI and FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer. *Cancer Invest.* **2008**, *26* (9), 956–963.
- Marin, J. J.; Romero, M. R.; Blazquez, A. G.; Herraiz, E.; Keck, E.; Briz, O. Importance and limitations of chemotherapy among the available treatments for gastrointestinal tumours. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9* (2), 162–184.
- Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in

yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99* (22), 14298–14302.

(9) Monte, M. J.; Ballester, M. R.; Briz, O.; Perez, M. J.; Marin, J. J. Proapoptotic effect on normal and tumor intestinal cells of cytostatic drugs with enterohepatic organotropism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315* (1), 24–35.

(10) Samimi, G.; Varki, N. M.; Wilczynski, S.; Safaei, R.; Alberts, D. S.; Howell, S. B. Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9* (16 Pt 1), 5853–5859.

(11) Komatsu, M.; Sumizawa, T.; Mutoh, M.; Chen, Z. S.; Terada, K.; Furukawa, T.; Yang, X. L.; Gao, H.; Miura, N.; Sugiyama, T.; Akiyama, S. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* **2000**, *60* (5), 1312–1316.

(12) Cui, Y.; Konig, J.; Buchholz, J. K.; Spring, H.; Leier, I.; Keppler, D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55* (5), 929–937.

(13) Hinoshita, E.; Uchiumi, T.; Taguchi, K.; Kinukawa, N.; Tsuneyoshi, M.; Maehara, Y.; Sugimachi, K.; Kuwano, M. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6* (6), 2401–2407.

(14) Nies, A. T.; Keppler, D. The apical conjugate efflux pump ABC2 (MRP2). *Pflugers Arch.* **2007**, *453* (5), 643–659.

(15) Jedlitschky, G.; Leier, I.; Buchholz, U.; Hummel-Eisenbeiss, J.; Burchell, B.; Keppler, D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem. J.* **1997**, *327* (Pt 1), 305–310.

(16) Kauffmann, H. M.; Keppler, D.; Kartenbeck, J.; Schrenk, D. Induction of cMrp/cMoat gene expression by cisplatin, 2-acetylaminofluorene, or cycloheximide in rat hepatocytes. *Hepatology* **1997**, *26* (4), 980–985.

(17) Payen, L.; Courtois, A.; Loewert, M.; Guillouzo, A.; Fardel, O. Reactive oxygen species-related induction of multidrug resistance-associated protein 2 expression in primary hepatocytes exposed to sulforaphane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282* (1), 257–263.

(18) Vollrath, V.; Wielandt, A. M.; Iruretagoyena, M.; Chianale, J. Role of Nrf2 in the regulation of the MRP2 (ABCC2) gene. *Biochem. J.* **2006**, *395* (3), 599–609.

(19) Qadri, I.; Hu, L. J.; Iwahashi, M.; Al-Zuabi, S.; Quattrochi, L. C.; Simon, F. R. Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *234* (3), 281–292.

(20) Kast, H. R.; Goodwin, B.; Tarr, P. T.; Jones, S. A.; Anisfeld, A. M.; Stoltz, C. M.; Tontonoz, P.; Kliewer, S.; Willson, T. M.; Edwards, P. A. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (4), 2908–2915.

(21) Tanaka, T.; Uchiumi, T.; Hinoshita, E.; Inokuchi, A.; Toh, S.; Wada, M.; Takano, H.; Kohno, K.; Kuwano, M. The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* **1999**, *30* (6), 1507–1512.

(22) Blazquez, A. G.; Briz, O.; Romero, M. R.; Rosales, R.; Monte, M. J.; Vaquero, J.; Macias, R. I.; Cassio, D.; Marin, J. J. Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *81* (2), 273–283.

(23) Briz, O.; Macias, R. I.; Vallejo, M.; Silva, A.; Serrano, M. A.; Marin, J. J. Usefulness of liposomes loaded with cytostatic bile acid derivatives to circumvent chemotherapy resistance of enterohepatic tumors. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63* (3), 742–750.

- (24) Feller, N.; Broxterman, H. J.; Wahrer, D. C.; Pinedo, H. M. ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Lett.* **1995**, *368* (2), 385–388.
- (25) Markwell, M. A.; Haas, S. M.; Bieber, L. L.; Tolbert, N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **1978**, *87* (1), 206–210.
- (26) Vallejo, M.; Castro, M. A.; Medarde, M.; Macias, R. I.; Romero, M. R.; El-Mir, M. Y.; Monte, M. J.; Briz, O.; Serrano, M. A.; Marin, J. J. Novel bile acid derivatives (BANBs) with cytostatic activity obtained by conjugation of their side chain with nitrogenated bases. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73* (9), 1394–1404.
- (27) Kauffmann, H. M.; Keppler, D.; Gant, T. W.; Schrenk, D. Induction of hepatic mrp2 (cmrp/cmoot) gene expression in nonhuman primates treated with rifampicin or tamoxifen. *Arch. Toxicol.* **1998**, *72* (12), 763–768.
- (28) Kool, M.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; van Eijk, M. J.; Juijn, J. A.; Baas, F.; Borst, P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRPs, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **1997**, *57* (16), 3537–3547.
- (29) Koike, K.; Kawabe, T.; Tanaka, T.; Toh, S.; Uchiumi, T.; Wada, M.; Akiyama, S.; Ono, M.; Kuwano, M. A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res.* **1997**, *57* (24), 5475–5479.
- (30) Kauffmann, H. M.; Schrenk, D. Sequence analysis and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat multidrug resistance protein 2 (mrp2) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245* (2), 325–331.
- (31) Schrenk, D.; Baus, P. R.; Ermel, N.; Klein, C.; Vorderstemann, B.; Kauffmann, H. M. Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol. Lett.* **2001**, *120* (1–3), 51–57.
- (32) Chin, K. V.; Ueda, K.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* **1992**, *255* (5043), 459–462.
- (33) Wang, Q.; Beck, W. T. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res.* **1998**, *58* (24), 5762–5769.
- (34) Qadri, I.; Iwahashi, M.; Kullak-Ublick, G. A.; Simon, F. R. Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 mediate hepatic multidrug resistance protein 2 up-regulation during hepatitis C virus gene expression. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70* (2), 627–636.
- (35) Mensah-Osman, E. J.; Thomas, D. G.; Tabb, M. M.; Larios, J. M.; Hughes, D. P.; Giordano, T. J.; Lizyness, M. L.; Rae, J. M.; Blumberg, B.; Hollenberg, P. F.; Baker, L. H. Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines. *Cancer* **2007**, *109* (5), 957–965.
- (36) Lou, G.; Li, Y.; Chen, B.; Chen, M.; Chen, J.; Liao, R.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhou, D. Functional analysis on the 5'-flanking region of human FXR gene in HepG2 cells. *Gene* **2007**, *396* (2), 358–368.
- (37) Aleksunes, L. M.; Yeager, R. L.; Klaassen, C. D. Application of multivariate statistical procedures to identify transcription factors that correlate with MRP2, 3, and 4 mRNA in adult human livers. *Xenobiotica* **2009**, *39* (7), 514–522.
- (38) Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R. K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Kliewer, S. A.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D. D.; Lehmann, J. M. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **1999**, *284* (5418), 1365–1368.
- (39) Fiorucci, S.; Mencarelli, A.; Cipriani, S.; Renga, B.; Palladino, G.; Santucci, L.; Distrutti, E. Activation of the farnesoid-X receptor protects against gastrointestinal injury caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164* (8), 1929–1938.
- (40) Lian, F.; Xing, X.; Yuan, G.; Schafer, C.; Rauser, S.; Walch, A.; Rocken, C.; Ebeling, M.; Wright, M. B.; Schmid, R. M.; Ebert, M. P.; Burgermeister, E. Farnesoid X receptor protects human and murine gastric epithelial cells against inflammation-induced damage. *Biochem. J.* **2011**, *438* (2), 315–323.
- (41) Gineste, R.; Sirvent, A.; Paumelle, R.; Helleboid, S.; Aquilina, A.; Darteil, R.; Hum, D. W.; Fruchart, J. C.; Staels, B. Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* **2008**, *22* (11), 2433–2447.
- (42) To, K. K.; Yu, L.; Liu, S.; Fu, J.; Cho, C. H. Constitutive AhR activation leads to concomitant ABCG2-mediated multidrug resistance in cisplatin-resistant esophageal carcinoma cells. *Mol. Carcinog.* **2011**, *51* (6), 449–464.

Activation of the nuclear receptor FXR enhances hepatocyte chemoprotection and liver tumor chemoresistance against genotoxic compounds

Javier Vaquero¹, Oscar Briz^{1,3}, Elisa Herraes¹, Jordi Muntané^{2,3}, Jose J.G. Marin^{1,3}

(¹) Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain.

(²) Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), University Hospital Virgen del Rocio, CSIC, University of Seville, Seville, Spain.

(³) National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Spain.

Short Title: FXR-induced chemoresistance

Contact Information:

Jose J. G. Marin
Department of Physiology and Pharmacology
University of Salamanca
Campus Miguel de Unamuno E.D. S-09
37007-Salamanca, Spain
Telephone: +34-923-294674
Fax: +34-923-294669
E-mail: jjgmarin@usal.es

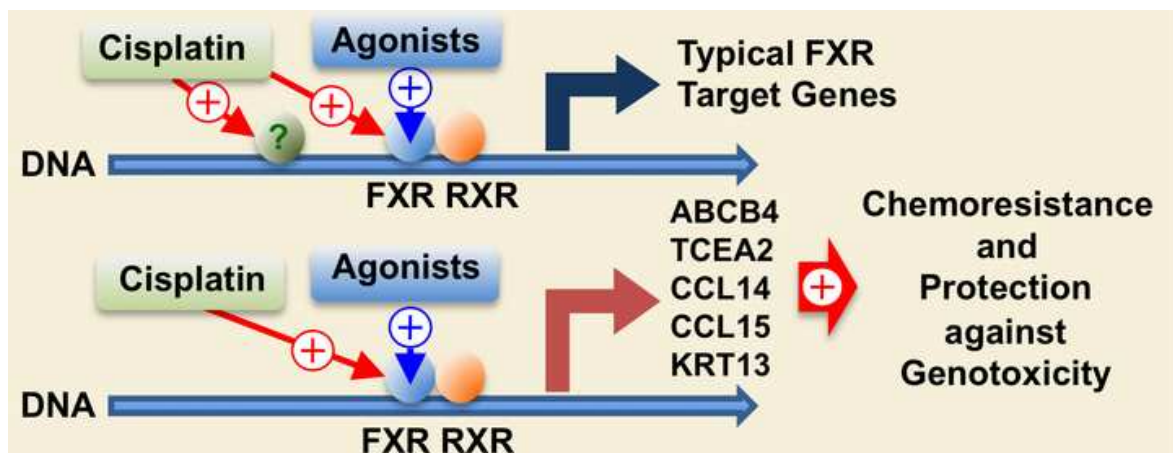
Abbreviations

FXR, Farnesoid X receptor; HCC, Hepatocellular carcinoma; MOC, mechanisms of chemoresistance; RXR, Retinoid X receptor; TLDA, Taqman Low Density Array.

Highlights

- The nuclear receptor and bile acid sensor FXR up-regulates chemoresistance genes
- Deleterious effect of genotoxics such as cisplatin is attenuated by FXR activation
- In the absence of FXR agonists, cisplatin up-regulates typical FXR target genes
- FXR-mediated trans-activation of response elements is stimulated by cisplatin

Graphical Abstract (for review)



ABSTRACT

The success of pharmacological treatments in primary liver cancers is limited by the marked efficacy of mechanisms of chemoresistance already present in hepatocytes. The role of the nuclear receptor FXR is unclear, because although refractoriness to anticancer drugs is present in liver tumors despite FXR expression is reduced, the treatment with cisplatin up-regulates FXR. The aim of this study was to investigate whether FXR is involved in stimulating chemoprotection/chemoresistance in healthy and tumour liver cells. In human hepatocytes, the activation of FXR with the agonist GW4064 resulted in a significant protection against cisplatin-induced toxicity. In human hepatoma Alexander cells, with negligible endogenous expression of FXR, GW4064 also protected against cisplatin-induced toxicity, but only if they were previously transfected with FXR/RXR. Investigation of 109 genes potentially involved in chemoresistance revealed that only ABCB4, TCEA2, CCL14, CCL15 and KRT13 were up-regulated by FXR activation both in human hepatocytes and FXR/RXR-expressing hepatoma cells. In both models, cisplatin, even in the absence of FXR agonists, such as bile acids and GW4064, was able to up-regulate FXR targets genes, which was due to FXR-mediated trans-activation of response elements in the promoter region. FXR-dependent chemoprotection was also efficient against other DNA-damaging compounds, such as doxorubicin, mitomycin C and potassium dichromate, but not against non-genotoxic drugs, such colchicine, paclitaxel, acetaminophen, artesunate and sorafenib. In conclusion, ligand-dependent and independent activation of FXR stimulates mechanisms able to enhance the chemoprotection of hepatocytes against genotoxic compounds and to reduce the response of liver tumor cells to certain pharmacological treatments.

Key Words: Bile acid; Cancer; Chemotherapy; Drug; Liver; Pharmacology.

1. INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third cause of cancer-related death worldwide. Surgery is the curative therapy of choice, but the resection of these tumors is not always possible. The use of pharmacological approaches is limited because, owing to the marked drug refractoriness of these tumors, the response to available adjuvant chemotherapy is very poor. This characteristic depends in part on the expression of the genes involved in a variety of mechanisms of chemoresistance (MOC), which are also involved in the chemoprotection of normal liver tissue. These include a reduction in drug/toxin uptake (MOC-1a), an enhanced drug/toxin export (MOC-1b), a reduction in metabolic pro-drug/toxin activation or an increase in drug/toxin inactivation (MOC-2), changes in molecular targets (MOC-3), enhanced DNA repair (MOC-4), and a modification in the pro-apoptotic (MOC-5a) versus pro-survival (MOC-5b) balance [1].

The farnesoid X receptor (FXR, gene symbol *NR1H4*) is a transcription factor mainly expressed in the liver, intestine, kidney, and adrenal glands. To activate the expression of its target genes, FXR heterodimerizes with the retinoid X receptor α (RXR α) and, upon activation by specific agonists, binds to FXR response elements (FXREs), mainly IR-1 (inverted repeats separated by 1 nucleotide) [2].

FXR has traditionally been considered as a specific bile acid receptor involved in the control of bile acid homeostasis. However, a role of FXR in the control of lipid and glucose metabolism has been described [3], and more recently, FXR has also been implicated in the prevention of hepatic and intestinal carcinogenesis [4, 5], liver regeneration [6], the barrier function of the intestine [7], attenuation of the adverse effects of cholestasis [8] and the prevention of gallstone formation [9]. To carry out some of these functions, FXR regulates the expression of genes involved in MOC, such as phase I oxidation enzymes (CYP3A4) [10], phase II conjugation enzymes (UGT2B4 and SULT2A1) [11, 12], and phase III transporters (BSEP and MDR3) [13, 14]. This implies a potential role of FXR in the hepatic handling of potentially toxic xenobiotics, such as acetaminophen [15]. Moreover, we have recently described a role for FXR in chemoresistance to cisplatin in colon cancer cells [16].

Nevertheless, the role of FXR in the control of the genes involved in MOC remains unclear, because, although enhanced chemoresistance occurs in liver tumors despite FXR expression was reduced [17], certain antitumor drugs, such as cisplatin, are able to induce FXR expression in tumor cells [17]. Thus, the aim of this study was to investigate whether FXR is involved in the activation of chemoprotection in healthy hepatocytes and hepatoma cells.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Acetaminophen, cisplatin, colchicine, doxorubicin, mitomycin C, paclitaxel and potassium dichromate were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). GW4064 was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Sorafenib tosylate was obtained through the Pharmacy Department, University Hospital (Salamanca, Spain). Artesunate was kindly provided by Dr. Thomas Effert (University of Mainz, Germany). The purity of all these compounds was $\geq 97\%$. All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Cloning

FXR $\alpha 1(-)$ isoform (containing exons 1 to 3 and a 12-bp deletion in exon 5) [18] and RXR α , henceforth designated simply as FXR and RXR, were cloned using Gateway technology. The coding sequences were amplified by PCR using DNA from HepG2 cells and Jeg-3 cells, respectively, and the high fidelity AccuPrime *Pfx* DNA polymerase and gene specific primers (Supplementary Table 1) with appropriate *attB* adapters. The *attB*-flanked PCR products were recombined with the *attP*-containing pDONR207 vector (Invitrogen, Barcelona, Spain) to generate Entry plasmids, which were further recombined with the pcDNA6.2-V5 Destination vector (Invitrogen), to generate the Expression vectors. The pGL4.28[Luc2CP] vector (Promega) was used to obtain pGL4.28[Luc2CP]/IR-1, containing the consensus IR-1 response element for FXR. The IR-1 (AGGTCAATGACCT) consisted of an inverted repeat of the consensus sequence AGGTCA separated by one nucleotide (A) [2]. The exact nucleotide sequence of all constructs was confirmed by gel-electrophoresis-based sequencing.

2.3. Cell culture and transfection assays

Human hepatoma Alexander cells (PLC/PRF/5, ATCC: CRL-8024) and human hepatoblastoma HepG2 cells (ATCC: HB-8065) were provided by LGC Standards S.L.U., Barcelona (Spain) and cultured as recommended by the supplier. Human hepatocytes were isolated from the healthy liver tissue obtained by surgical resections of primary or secondary liver tumors after written consent of the patients (4 men, 2 women, 59 \pm 5.3 years) at the Reina Sofia Hospital (Cordoba, Spain). Hepatocytes were isolated and further cultured as previously described [19].

Transient transfection of Alexander and HepG2 cells was carried out with the Lipofectamine LTX and PLUS reagents (Invitrogen). Cells were transfected with an empty vector (mock) or plasmids containing FXR, RXR or both. In some cases, transfections were carried out in combination with a plasmid containing an IR-1 response element upstream of a minimal promoter (minPr) and the destabilized firefly luciferase (*luc2CP*) gene. After transfection (48 h), cells were incubated with 5 μ M cisplatin, 1 μ M GW4064, or with different concentrations of cisplatin or several toxic compounds, with or without 1 μ M GW4064, over 24 h, 48 h or 72 h, depending on the parameter (cell viability, luciferase activity or mRNA levels) to be measured.

2.4. Cell viability and luciferase activity

The amount of living cells was determined using the formazan test (Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Madrid, Spain).

Promoter activation was followed by changes in the luciferase activity, measured with the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) on a LAS-4000 image reader (FujiFilm; TDI, Madrid, Spain). The intensity of the signal was expressed as arbitrary units of luminescence (light emission/10 min).

2.5. Gene expression analyses

Measurement of mRNA steady-state levels was carried out by RT-QPCR as previously reported [17, 20]. In brief, total RNA extraction from cultured cells was performed as previously described [20]. RT was carried out using the "SuperScript® VILOTM cDNA Synthesis Kit" (Invitrogen). QPCR was performed using Amplitaq Gold polymerase in an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Madrid, Spain) for single reactions to determine mRNA levels by conventional RT-QPCR with SYBR® Green I detection, or using TLDA in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) with TaqMan Mix detection. In all cases, the following thermal conditions were used: a single cycle of 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. The primer oligonucleotides for FXR and its target genes, and for the MOC genes (Supplementary Table 2), together with their appropriate Taqman probes to be included in the microfluidic cards, were designed and validated by us or by Applied Biosystems (TLDA) (data not shown). Changes in the expression of the heterodimeric protein OST α / β was following by measuring the monomer with the highest expression level in each cell type, i.e., OST α in hepatocytes and OST β in Alexander cells. 18S rRNA was used as a quality-control

check among samples and groups. Double normalization of the results in each sample was carried out with the values obtained for ACTB and GAPDH as previously reported [17].

For protein detection by immunofluorescence Alexander transfected cells were fixed and permeabilized in ice-cold methanol, and nonspecific binding sites were blocked by incubation with 5% fetal calf serum. Preparations were incubated with primary antibody from Invitrogen (anti-V5 against FXR-V5 diluted 1:200) and then for 1 h with a 1:1000 dilution of Alexa Fluor-488 anti-mouse secondary antibody, and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to counterstain nuclei. Fluorescence staining was visualized using a Leica TCS SP2 confocal microscope.

2.6. Bile acid analysis and statistical methods

Bile acid concentrations in cell cultures were determined by HPLC-MS/MS using a 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), as previously reported [21].

To calculate the statistical significance of the differences between groups, the paired or unpaired *t*-tests were used, as appropriate.

3. RESULTS

3.1. FXR activation protects against cisplatin-induced toxicity

When human hepatocytes were placed in culture, a spontaneous and progressive decrease in the expression of FXR was observed. The abundance of FXR mRNA decreased to approximately 50% of that of human liver over the first 3–4 days in culture. Then steady state was reached and maintained for up to, at least, 12 days (Supplementary Figure 1). Experiments performed within this period revealed that treatment with the FXR agonist GW4064 partly protected human hepatocytes against cisplatin-induced toxicity (Figure 1A).

To further investigate this effect the human hepatoma Alexander cells, with negligible endogenous FXR expression levels ($0.28\% \pm 0.06$ of human liver), were used as experimental model. These cells were transiently transfected with FXR. Prior to measuring FXR mRNA, the restriction enzyme *DpnI*, which cuts methylated DNA, was used to digest the remaining intracellular plasmids. A peak of FXR mRNA was observed 48 h after transfection (Supplementary Figure 2), when most FXR protein was located in the nucleus (Supplementary Figure 2, inset). This time was therefore used as the starting time to expose the cells to the compounds to be tested. When the cells were transfected with the same amount of DNA but divided into two plasmids containing either FXR or RXR, the abundances of FXR mRNA and RXR mRNA 48 h after transfection were $685\% \pm 45$ and $490\% \pm 35$ that of human liver, respectively.

Dose-dependent studies of cisplatin-induced cell death revealed an improved survival of Alexander cells when they had been transfected with FXR+RXR and were cultured in the presence of $1\ \mu\text{M}$ GW4064 (Figure 1B). Thus, the cisplatin IC_{50} was increased 5.8-fold under conditions of activated FXR (Figure 2). In contrast, transfection with RXR alone did not modify the sensitivity of Alexander cells to cisplatin (Figure 2). Moreover, GW4064 had no effect on the sensitivity of Alexander cells to cisplatin when the cells were transfected with RXR either alone or with an empty vector.

3.2. Expression of genes involved in chemoresistance

To elucidate the relationship between FXR activation and enhanced chemoresistance, GW4064-induced changes in the expression levels of a set of 109 genes potentially involved in different MOC were investigated (Table 1). Incubation with $1\ \mu\text{M}$ GW4064 for 24 h resulted in a significant up-regulation of five genes involved in MOC-1b (*ABCB4*), MOC-4 (*TCEA2*),

MOC-5b (*CCL14*, *CCL15* and *KRT13*), both in human hepatocytes in primary culture (Figure 3A) and Alexander cells transfected with FXR+RXR (Figure 3B). No effect on Alexander cells transfected with an empty vector was found (data not shown).

3.3. Cisplatin-induced expression of FXR target genes

Since partial protection of the cells against cisplatin toxicity was also seen in FXR transfected cells even in the absence of GW4064 (Figure 2), we wondered whether endogenous bile acids could be activating FXR in these cells. HPLC-MS/MS analysis revealed that, under all the experimental conditions used here, bile acids levels in Alexander cells were undetectable (data not shown).

A potential explanation would be the activation of FXR in response to the toxicity of cisplatin. To elucidate this question human hepatocytes were treated with cisplatin, which induced no significant change in the expression of FXR (Figure 4). In contrast, cisplatin was able to up-regulate several FXR target genes, such as BSEP, SHP, OST α , and TCEA2 (Figure 4).

To further analyze the effect of cisplatin on the FXR signaling pathway, Alexander cells were transfected with FXR+RXR and treated with cisplatin or GW4064 for 72h, and the expression of FXR target genes was determined. In mock cells, cisplatin, but not GW4064, was already able to activate some, but not all, FXR target genes assayed (Figure 5A). In contrast, in FXR+RXR-transfected cells, GW4064 induced a significant effect on the expression of FXR target genes (Figure 5B). Surprisingly, cisplatin had a similar but weaker FXR-dependent effect on these genes (Figure 5B).

3.4. Cisplatin-induced activation of a IR-1 FXR-response element

The ability of cisplatin to directly or indirectly activate FXR, in the absence of bile acids or GW4064, was then investigated by determining luciferase expression driven by an IR-1 consensus element in HepG2 cells, which constitutively express FXR, and in Alexander cells transfected with FXR or FXR+RXR. In the absence of the IR-1 element, treatment with either cisplatin or GW4064 had no effect on luciferase expression (Figure 6A). In contrast, in the presence of the IR-1 element both cisplatin and GW4064 (GW4064>cisplatin) induced luciferase expression (Figure 6B).

3.5. Protection against genotoxicity

Since the mechanism of action of cisplatin is based on its damaging interaction with DNA we investigated whether in absence of FXR, cisplatin was able to activate several genes involved in MOC-4. Indeed, p53 and p53-dependent proteins p21, GADD45 and FAS were up-regulated by cisplatin in Alexander cells (Figure 7). In contrast, FXR+RXR transfection plus GW4064 did not up-regulate these genes (Table 1). Finally, we investigated whether the protective effect of FXR activation was specific for cisplatin or it was shared with other genotoxic compounds. Transfection plus activation of FXR also protected Alexander cells against other DNA damaging agents, such as mitomycin C, doxorubicin and potassium dichromate, but not against compounds without genotoxic activity, such as colchicine, paclitaxel, acetaminophen, artesunate or sorafenib (Figure 8).

4. DISCUSSION

The present study revealed that activation of FXR with a typical agonist, such as GW4064, elicited partial protection against the toxic effect of cisplatin. Surprisingly, in the absence of GW4064 or other typical agonists of this nuclear receptor, such as bile acids, the expression of FXR also protected the cells against cisplatin-induced toxicity. This suggests that - directly or indirectly - cisplatin itself, and presumably other toxic compounds, with genotoxic activity, are able to activate the FXR pathway. Indeed, only when FXR was expressed, cisplatin was able to activate luciferase expression driven by an IR-1 response element. Although not impossible, the molecular structure of cisplatin makes it unlikely that this drug would behave as a typical FXR agonist. Accordingly, it could be speculated that the mechanism of cisplatin-induced FXR activation would be different from that of its well-known ligands. Among the possibilities is FXR phosphorylation by PKC ζ and PKC α , which have been shown to activate FXR in the absence of agonist [22, 23]. Moreover, DNA damage induces the activation of PKC signaling pathways, resulting in an enhanced protein kinase C activity able to phosphorylate FXR [24].

An additional level of complexity was suggested by the findings that cisplatin was able to activate the expression of several FXR target genes, such as SHP and OST β , even in cells lacking FXR expression. In contrast, cisplatin up-regulated BSEP and TCEA2 only when FXR was expressed. The FXR-independent up-regulation of SHP has previously been described to occur through the activation of p53 triggered by DNA damage [25]. The reason for this overlapping between the p53 and FXR pathways is probably that both p53 and FXR share the MLL3 methyltransferase, which forms part of a coactivator complex able to interact with multiple transcription factors [25]. Our results support the concept that p53, a master sensor of DNA damage, may be involved in an indirect activation of the transcription complex able to enhance the expression of some FXR target genes.

Regarding the mechanism by which FXR is able to induce chemoprotection, the expression of a large set of genes was analyzed. The overexpression of ABC export pumps, belonging to MOC-1, is one of the major mechanisms accounting for the poor response of tumors to anticancer drugs. However, we only found changes in the expression of BSEP and MDR3. BSEP is a well known target of FXR whose main function is the transport of bile acids into the canalicular lumen [26]. This pump is also able to transport some anticancer compounds,

such as vinblastine, but not others, such as daunorubicine or paclitaxel [27]. MDR3 is mainly expressed in the canalicular membrane of the hepatocytes, where it plays a role as phospholipid translocase [28], but its relevance in chemoresistance is poorly understood. MDR3 is overexpressed in K562 cells resistant to doxorubicin [29], one of the compounds whose efficacy was seen here to be reduced its when FXR was expressed and activated. MRP2 is particularly important in the chemoresistance to cisplatin [1]. Thus, MRP2 expression levels have been correlated with the sensitivity of several cell lines to cisplatin [30]. We have previously described that cisplatin treatment is able to induce MRP2 expression in colon cancer cells [16]. Furthermore, we have reported that FXR-dependent overexpression of BCRP may also be involved in the chemoresistance of colon cancer to cisplatin [16]. However, in liver cells, no significant changes in the expression of MRP2 or BCRP in response to FXR activation have been found.

Although MOC-2 and MOC-3 include FXR target genes, such as *CEBPB* and *CYP3A4*, no changes in the expression of these genes in response to FXR activation was found. In contrast, interesting results regarding MOC-4 were obtained. The expression of *TCEA2*, recently reported as an FXR target gene [31], was induced after the activation of FXR. The protein encoded by this gene, TFIIS, is an elongation factor involved in the transcription-coupled DNA repair mechanism and has previously been associated with chemoresistance to cisplatin [32]. The FXR-mediated up-regulation of *TCEA2*, but not of *TCEA1* or *TCEA3*, found in the present study suggest that only the isoform 2 of this protein is probably involved in the enhanced chemoresistance to agents with known ability to induce DNA damage, such as doxorubicin, mitomycin C, cisplatin and potassium dichromate [33].

Changes in the expression of genes belonging to MOC-5 could account for the reduced sensitivity to mitomycin C, whose mechanism of action includes the up-regulation of caspase-8, which leads to apoptosis [34]. Since *KRT13* has anti-apoptotic properties [35], the up-regulation of this protein may result in enhanced protection against the toxicity of mitomycin C, and other pro-apoptotic drugs used in this study. Although the mechanism of action of artesunate involves the up-regulation of a large number of pro-apoptotic genes and the down-regulation of others [36], we have found no changes in the expression of these genes. Thus, the absence of FXR-induced chemoresistance to artesunate was probably related to the lack of effect on the proapoptotic/survival balance in our experimental setting.

Regarding the FXR-dependent enhanced expression of *CCL14* and *CCL15*, although chemokines are involved in angiogenesis and cell proliferation, migration, invasion and metastasis [37] their role in the chemoprotective response to FXR remains unclear.

5. CONCLUSIONS

In conclusion, these results indicate that the ligand-dependent and independent activation of FXR and/or its signaling pathway is involved in the chemoprotective response of liver cells. This is due in part to changes in the expression of several genes accounting for different MOC, mainly these involved in drug efflux (MOC-1b), DNA repair (MOC-4) and cell survival (MOC-5b). Moreover, this characteristic is shared by healthy and tumor cells, and hence may play an important role in enhancing the chemoprotection of healthy hepatocytes against genotoxic compounds and reducing the response of liver tumor cells to certain pharmacological treatments.

Acknowledgements

The authors thank revision of the English spelling, grammar and style of the manuscript by N. Skinner. Thanks are also given to Thomas Effert (University of Mainz, Germany) for the generous donation of artesunate.

Financial Support:

This study was supported in part by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant SAF2010-15517); the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grant PI11/0337) and the Junta de Castilla y Leon (Grants SA023A11-2, SA070A11-2 and Biomedicina-2011), Spain. The group is member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), co-funded by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and the European Regional Development Fund (ERDF) (Grant BFU2007-30688-E/BFI) and belongs to the CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas), Instituto de Salud Carlos III, Spain. Javier Vaquero is recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educacion, Spain (grant AP2007-00105).

REFERENCES

- [1] J.J. Marin, M.R. Romero, O. Briz, Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment, *Current medicinal chemistry*, 17 (2010) 709-740.
- [2] H.K. Chong, A.M. Infante, Y.K. Seo, T.I. Jeon, Y. Zhang, P.A. Edwards, X. Xie, T.F. Osborne, Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1, *Nucleic acids research*, 38 (2010) 6007-6017.
- [3] P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers, B. Staels, Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation, *Physiological reviews*, 89 (2009) 147-191.
- [4] I. Kim, K. Morimura, Y. Shah, Q. Yang, J.M. Ward, F.J. Gonzalez, Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice, *Carcinogenesis*, 28 (2007) 940-946.
- [5] S. Modica, S. Murzilli, L. Salvatore, D.R. Schmidt, A. Moschetta, Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis, *Cancer research*, 68 (2008) 9589-9594.
- [6] W.D. Chen, Y.D. Wang, L. Zhang, S. Shiah, M. Wang, F. Yang, D. Yu, B.M. Forman, W. Huang, Farnesoid X receptor alleviates age-related proliferation defects in regenerating mouse livers by activating forkhead box m1b transcription, *Hepatology*, 51 (2010) 953-962.
- [7] T. Inagaki, A. Moschetta, Y.K. Lee, L. Peng, G. Zhao, M. Downes, R.T. Yu, J.M. Shelton, J.A. Richardson, J.J. Repa, D.J. Mangelsdorf, S.A. Kliewer, Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 3920-3925.
- [8] C. Stedman, C. Liddle, S. Coulter, J. Sonoda, J.G. Alvarez, R.M. Evans, M. Downes, Benefit of farnesoid X receptor inhibition in obstructive cholestasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 11323-11328.
- [9] A. Moschetta, A.L. Bookout, D.J. Mangelsdorf, Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model, *Nature medicine*, 10 (2004) 1352-1358.
- [10] C. Gnerre, S. Blattler, M.R. Kaufmann, R. Looser, U.A. Meyer, Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene, *Pharmacogenetics*, 14 (2004) 635-645.
- [11] O. Barbier, I.P. Torra, A. Sirvent, T. Claudel, C. Blanquart, D. Duran-Sandoval, F. Kuipers, V. Kosykh, J.C. Fruchart, B. Staels, FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity, *Gastroenterology*, 124 (2003) 1926-1940.
- [12] C.S. Song, I. Echchgadda, B.S. Baek, S.C. Ahn, T. Oh, A.K. Roy, B. Chatterjee, Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 42549-42556.
- [13] L. Huang, A. Zhao, J.L. Lew, T. Zhang, Y. Hrywna, J.R. Thompson, N. de Pedro, I. Royo, R.A. Blevins, F. Pelaez, S.D. Wright, J. Cui, Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 51085-51090.
- [14] M. Ananthanarayanan, N. Balasubramanian, M. Makishima, D.J. Mangelsdorf, F.J. Suchy, Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 28857-28865.
- [15] F.Y. Lee, T.Q. de Aguiar Vallim, H.K. Chong, Y. Zhang, Y. Liu, S.A. Jones, T.F. Osborne, P.A. Edwards, Activation of the farnesoid X receptor provides protection against acetaminophen-induced hepatic toxicity, *Mol Endocrinol*, 24 (2010) 1626-1636.
- [16] E. Herraez, E. Gonzalez-Sanchez, J. Vaquero, M.R. Romero, M.A. Serrano, J.J. Marin, O. Briz, Cisplatin-Induced Chemoresistance in Colon Cancer Cells Involves FXR-

- Dependent and FXR-Independent Up-Regulation of ABC Proteins, *Molecular pharmaceuticals*, 9 (2012) 2565-2576.
- [17] P. Martinez-Becerra, J. Vaquero, M.R. Romero, E. Lozano, C. Anadon, R.I. Macias, M.A. Serrano, N. Grane-Boladeras, L. Munoz-Bellvis, L. Alvarez, B. Sangro, M. Pastor-Anglada, J.J. Marin, No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors, *Molecular pharmaceuticals*, 9 (2012) 1693-1704.
- [18] R.M. Huber, K. Murphy, B. Miao, J.R. Link, M.R. Cunningham, M.J. Rugar, P.L. Gunyuzlu, T.F. Haws, A. Kassam, F. Powell, G.F. Hollis, P.R. Young, R. Mukherjee, T.C. Burn, Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters, *Gene*, 290 (2002) 35-43.
- [19] R. Gonzalez, A. Cruz, G. Ferrin, P. Lopez-Cillero, R. Fernandez-Rodriguez, J. Briceno, M.A. Gomez, S. Rufian, L. Mata Mde, A. Martinez-Ruiz, J.J. Marin, J. Muntane, Nitric oxide mimics transcriptional and post-translational regulation during alpha-tocopherol cytoprotection against glycochenodeoxycholate-induced cell death in hepatocytes, *Journal of hepatology*, 55 (2011) 133-144.
- [20] R.I. Macias, C. Hierro, S.C. de Juan, F. Jimenez, F. Gonzalez-San Martin, J.J. Marin, Hepatic expression of sodium-dependent vitamin C transporters: ontogeny, subtissular distribution and effect of chronic liver diseases, *The British journal of nutrition*, 106 (2011) 1814-1825.
- [21] N.S. Nytofte, M.A. Serrano, M.J. Monte, E. Gonzalez-Sanchez, Z. Tumer, K. Ladefoged, O. Briz, J.J. Marin, A homozygous nonsense mutation (c.214C->A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis, *J Med Genet*, 48 (2011) 219-225.
- [22] T. Frankenberg, T. Miloh, F.Y. Chen, M. Ananthanarayanan, A.Q. Sun, N. Balasubramanian, I. Arias, K.D. Setchell, F.J. Suchy, B.L. Shneider, The membrane protein ATPase class I type 8B member 1 signals through protein kinase C zeta to activate the farnesoid X receptor, *Hepatology*, 48 (2008) 1896-1905.
- [23] R. Gineste, A. Sirvent, R. Paumelle, S. Helleboid, A. Aquilina, R. Dartel, D.W. Hum, J.C. Fruchart, B. Staels, Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity, *Mol Endocrinol*, 22 (2008) 2433-2447.
- [24] A. Basu, H. Tu, Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase Cdelta, *Biochemical and biophysical research communications*, 334 (2005) 1068-1073.
- [25] D.H. Kim, J. Kim, J.W. Lee, Requirement for MLL3 in p53 regulation of hepatic expression of small heterodimer partner and bile acid homeostasis, *Mol Endocrinol*, 25 (2011) 2076-2083.
- [26] M. Trauner, J.L. Boyer, Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation, *Physiological reviews*, 83 (2003) 633-671.
- [27] V. Lecureur, D. Sun, P. Hargrove, E.G. Schuetz, R.B. Kim, L.B. Lan, J.D. Schuetz, Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein, *Molecular pharmacology*, 57 (2000) 24-35.
- [28] S. Ruetz, P. Gros, Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene, *Cell*, 77 (1994) 1071-1081.
- [29] A. Johnsson, J. Vallon-Christensson, C. Strand, T. Litman, J. Eriksen, Gene expression profiling in chemoresistant variants of three cell lines of different origin, *Anticancer research*, 25 (2005) 2661-2668.
- [30] K. Koike, T. Kawabe, T. Tanaka, S. Toh, T. Uchiumi, M. Wada, S. Akiyama, M. Ono, M. Kuwano, A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells, *Cancer research*, 57 (1997) 5475-5479.

- [31] E.P. Cuesta, C. Langhi, D. Haro, P.F. Marrero, J.C. Rodríguez, Transcription elongation factor TFIIS.1 gene is regulated by farnesoid X receptor, the FEBS Journal, 279 (2012) 276.
- [32] S. Tornaletti, S.M. Patrick, J.J. Turchi, P.C. Hanawalt, Behavior of T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II at site-specific cisplatin adducts in the template DNA, The Journal of biological chemistry, 278 (2003) 35791-35797.
- [33] A.K. Patlolla, C. Barnes, D. Hackett, P.B. Tchounwou, Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells, International journal of environmental research and public health, 6 (2009) 643-653.
- [34] C. Liedtke, D. Lambertz, N. Schnepel, C. Trautwein, Molecular mechanism of Mitomycin C-dependent caspase-8 regulation: implications for apoptosis and synergism with interferon-alpha signalling, Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 12 (2007) 2259-2270.
- [35] F. Lian, X. Xing, G. Yuan, C. Schafer, S. Rauser, A. Walch, C. Rocken, M. Ebeling, M.B. Wright, R.M. Schmid, M.P. Ebert, E. Burgermeister, Farnesoid X receptor protects human and murine gastric epithelial cells against inflammation-induced damage, The Biochemical journal, 438 (2011) 315-323.
- [36] T. Efferth, A. Sauerbrey, A. Olbrich, E. Gebhart, P. Rauch, H.O. Weber, J.G. Hengstler, M.E. Halatsch, M. Volm, K.D. Tew, D.D. Ross, J.O. Funk, Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines, Molecular pharmacology, 64 (2003) 382-394.
- [37] Q. Li, L. Shi, B. Gui, W. Yu, J. Wang, D. Zhang, X. Han, Z. Yao, Y. Shang, Binding of the JmJc demethylase JARID1B to LSD1/NuRD suppresses angiogenesis and metastasis in breast cancer cells by repressing chemokine CCL14, Cancer research, 71 (2011) 6899-6908.

Conflict of Interest

The authors do not have any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the work submitted that could inappropriately influence their work.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of FXR activation by 1 μ M GW4064 on the sensitivity of human hepatocytes (**A**) and hepatoma Alexander cells expressing FXR (**B**) to cisplatin as measured with the formazan test after incubation with the indicated concentrations of cisplatin for 72 h. Alexander cells were transfected with plasmids containing FXR+RXR or an empty vector (Mock) 48 h before adding GW4064 and cisplatin. Values are expressed as means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with Vehicle or Mock groups.

Figure 2. Effect of transfection with an empty vector (Mock), FXR, RXR or FXR+RXR with and without activation with 1 μ M GW4064 on the sensitivity to cisplatin expressed as IC₅₀ that was calculated from dose-response studies similar to these shown in Figure 1B. Values are expressed as mean \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with the Mock group.

Figure 3. Effect of FXR activation on the expression of genes involved in chemoresistance in human hepatocytes in primary culture (**A**) and in human hepatoma Alexander cells transfected with FXR+RXR (**B**). Cells were treated with 1 μ M GW4064 for 24 h before gene expression were measured by RT-QPCR. Results, expressed as fold induction by comparing with basal conditions in the absence of GW4064, are means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with untreated control cells. MOC, Type of mechanism of chemoresistance.

Figure 4. Cisplatin-induced change in the expression of FXR target genes in human hepatocytes, as measured by RT-QPCR, in response to incubation with 5 μ M cisplatin or 1 μ M GW4064 for 24 h. Values are expressed as means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with cells treated only with DMSO (Vehicle).

Figure 5. Time-course of the effect of cisplatin or GW4064 on the amount mRNA for FXR target genes in human hepatoma Alexander cells transfected with an empty vector (Mock) (**A**) or plasmids containing FXR and RXR (**B**) 48 h before adding the drug (5 μ M cisplatin or 1 μ M GW4064) or only DMSO (Vehicle). Values are expressed as means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, compared with the Vehicle group; †, $p < 0.05$, comparing Cisplatin with GW4064.

Figure 6. Cisplatin-induced activation of the FXR-response element IR-1. Human hepatoblastoma HepG2 and hepatoma Alexander cells were transfected with a plasmid containing either a minimal promoter (minPr) controlling the expression of the destabilized firefly luciferase (luc2CP), used here as a reporter gene, alone (**A**) or in combination with an IR-1 response element located upstream of the minPr (**B**). In addition Alexander cells were transfected with an empty vector (Mock) or plasmids containing FXR and RXR. The drug (5 μ M cisplatin or 1 μ M GW4064) or only DMSO (Vehicle) were added 48 h after transfection and the cells were incubated for 4 h before luminiscence was measured. Values are expressed as means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, compared with the Vehicle group; †, $p < 0.05$, comparing Cisplatin with GW4064.

Figure 7. Time-course of the effect of cisplatin on the amount mRNA for p53 and p53-dependent genes in human hepatoma Alexander cells transfected with an empty vector 48 h before adding 5 μ M cisplatin or only DMSO (Vehicle). Values are expressed as means \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, compared with the Vehicle group.

Figure 8. Protective effect of FXR activation against genotoxic compounds. Viability of cells transfected with FXR+RXR or an empty vector and treated with 5 μ M colchicine, 10 nM paclitaxel, 1.5 mM acetaminophen, 20 μ M artesunate, 5 μ M sorafenib, 50 μ M cisplatin, 2.5 μ M mitomycin C, 250 nM doxorubicin or 2.5 μ M potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) with or without 1 μ M GW4064 for 72 h. Values are expressed as mean \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$, as compared with the Mock group.

Supplementary Figure 1. Time course of FXR expression in human hepatocytes after isolation and culture. Values are expressed as mean \pm SD from 4 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$; N.S., Not Significant ($p > 0.05$).

Supplementary Figure 2. Time-course of FXR expression in human hepatoma Alexander cells after transfection with a FXR plasmid. The amount of mRNA was determined by RT-QPCR after treatment without or with the *DpnI* restriction enzyme to digest the remaining intracellular plasmids before carrying out the RT-QPCR. The insets show representative fluorescence confocal microscopy photographs of Alexander cells expressing V5-tagged FXR (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). *, $p < 0.05$, as compared with cells treated with *DpnI*.

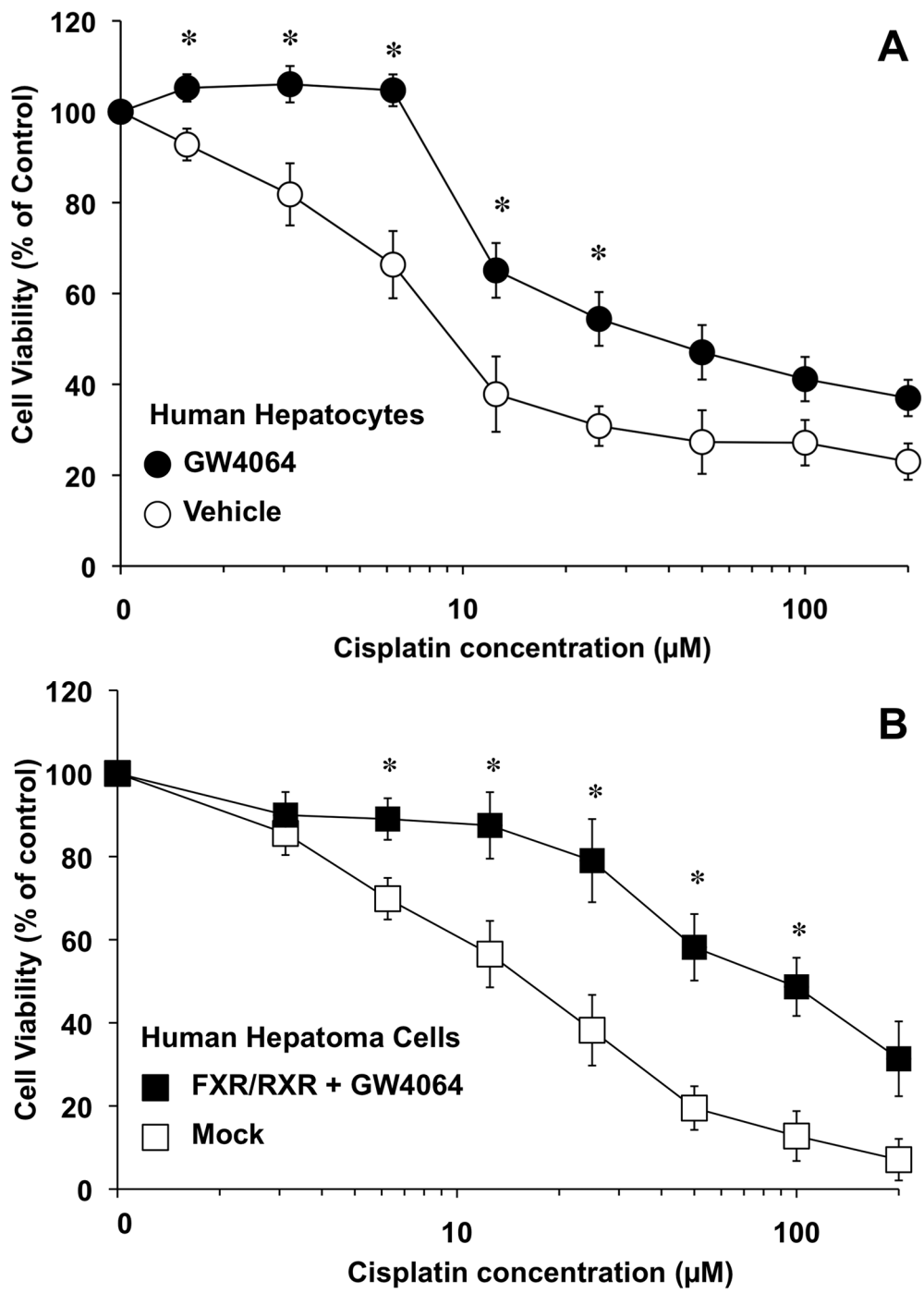


Figure 1

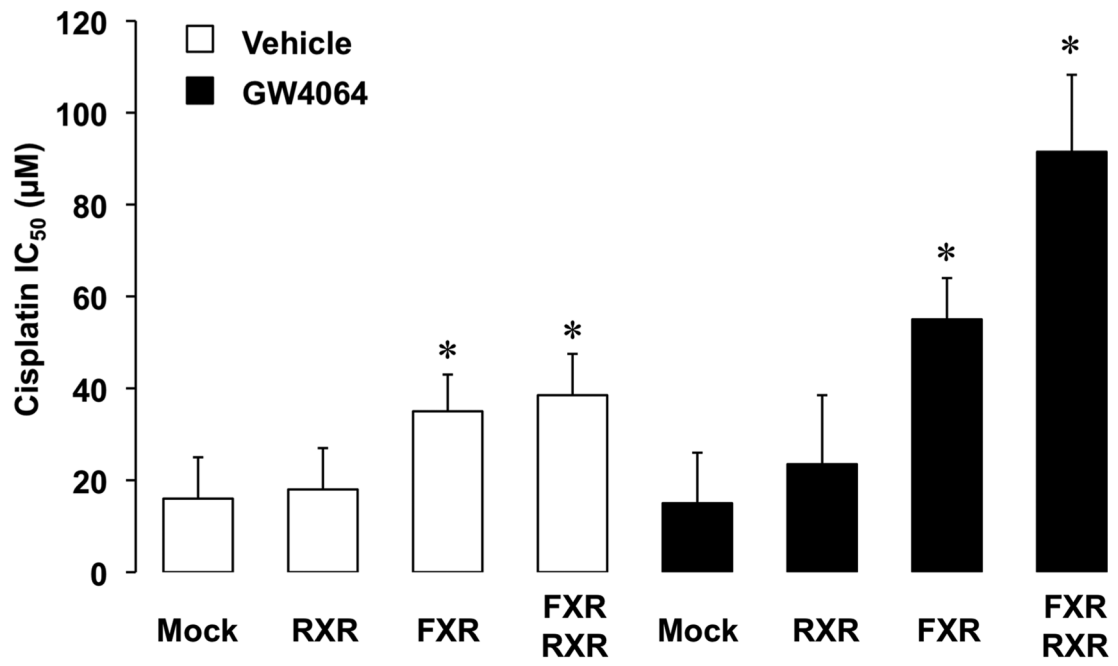


Figure 2

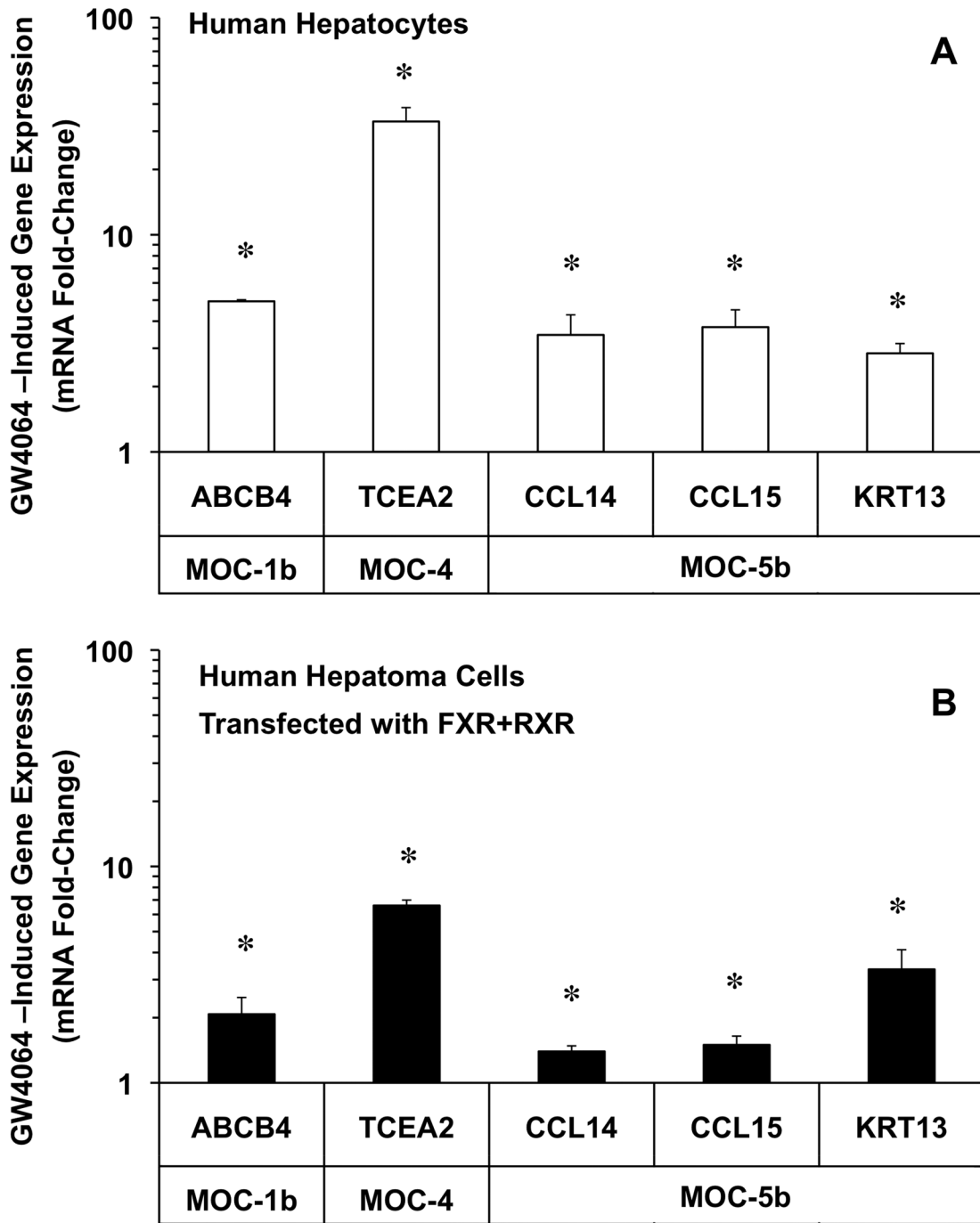


Figure 3

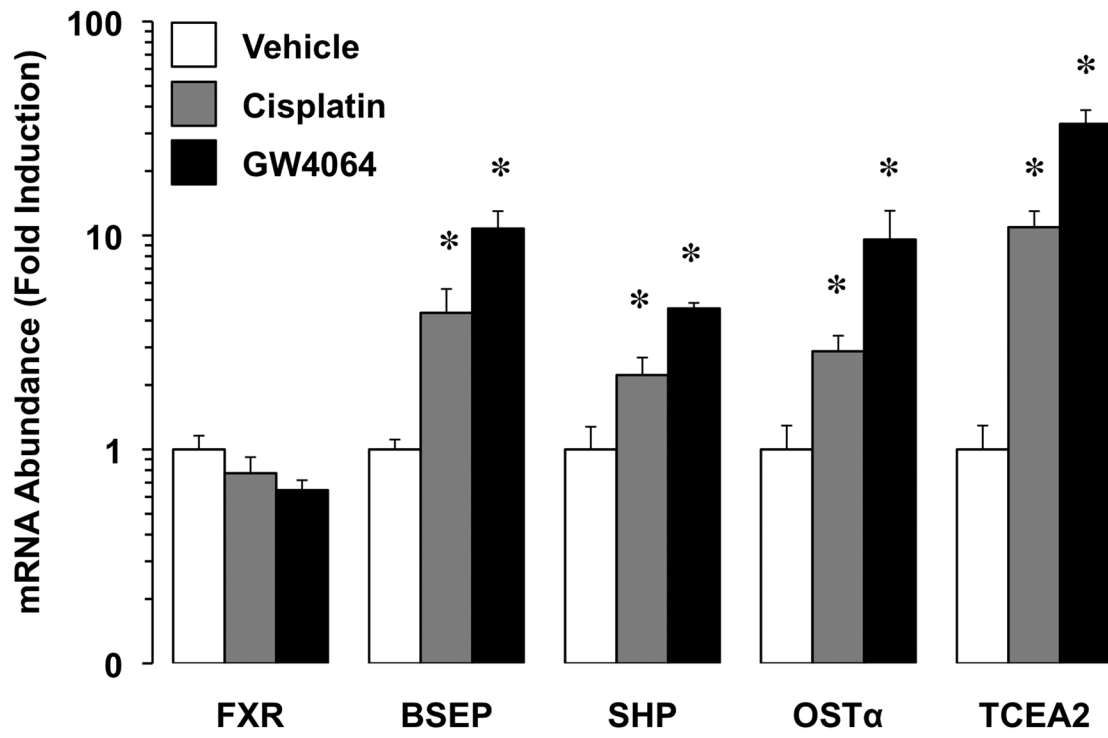


Figure 4

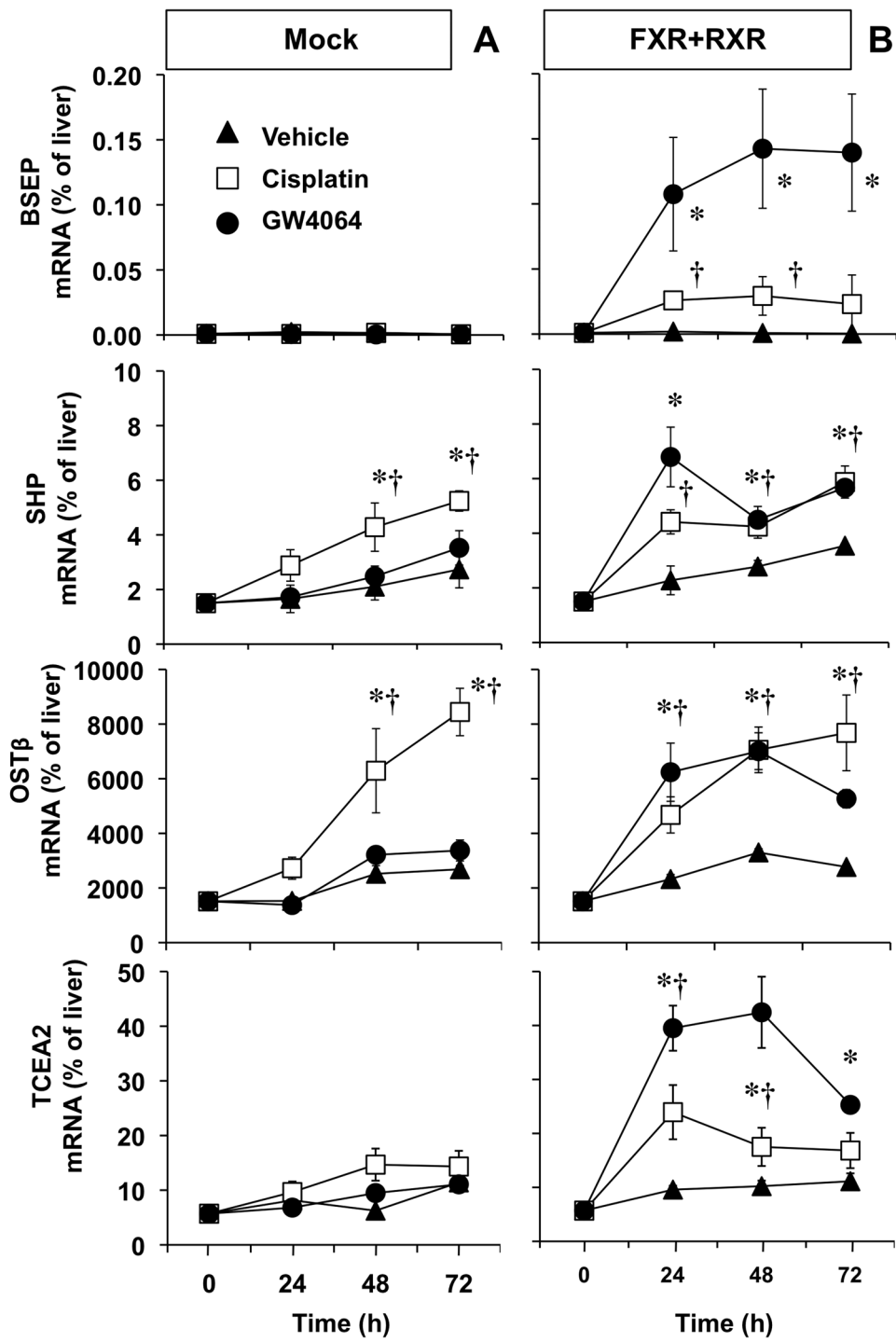


Figure 5

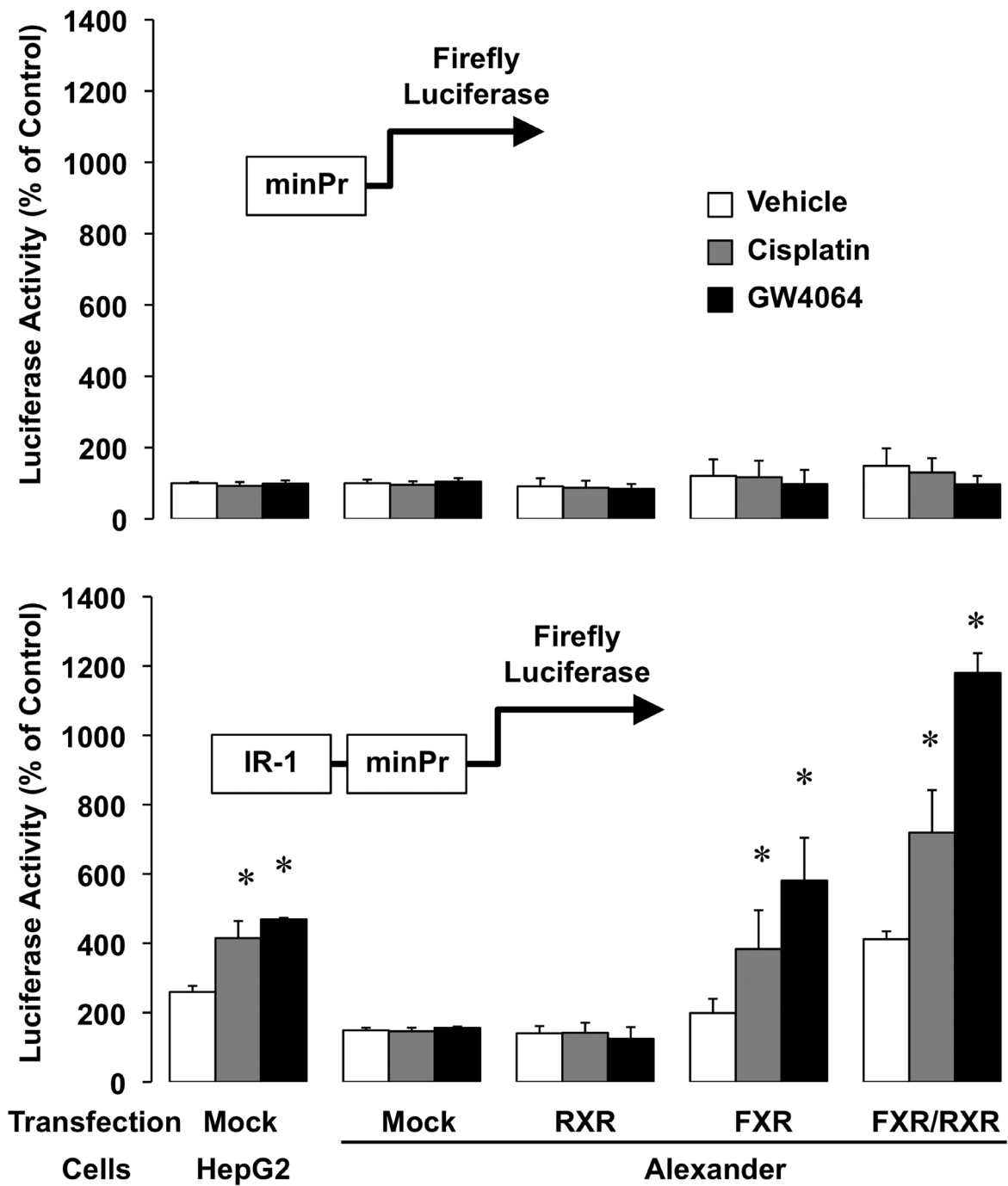


Figure 6

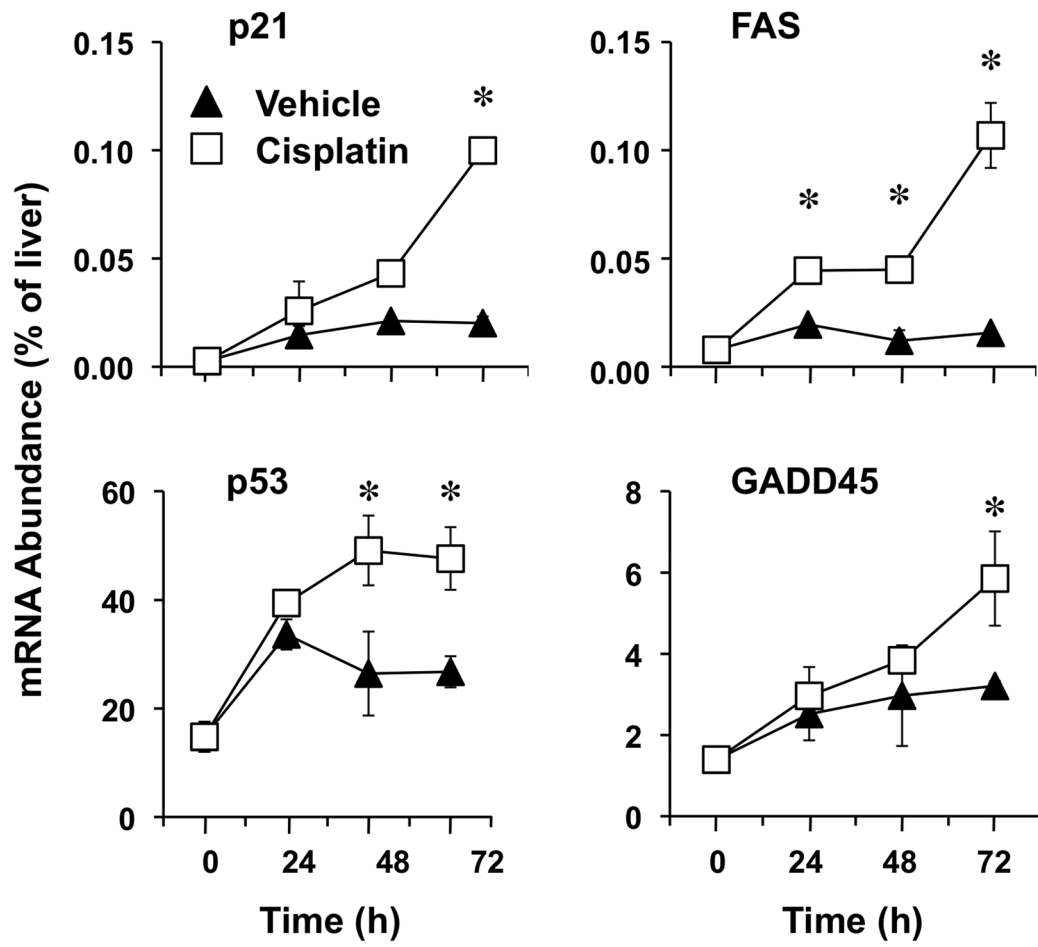


Figure 7

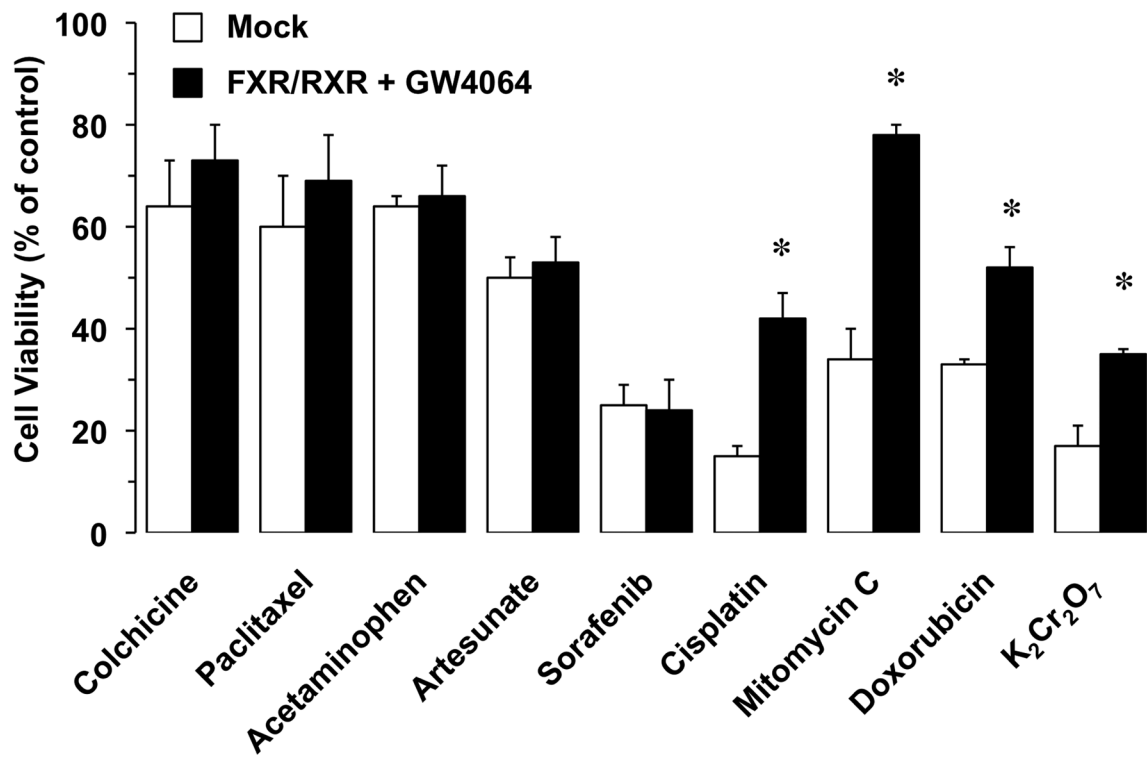


Figure 8

Table 1. Genes included in the analysis of expression levels by RT-QPCR using TLDA or single reactions. Genes are classified on the bases of their role in mechanism of chemoresistance (MOC) or the known sensitivity to FXR activation.

	MOC-1a	MOC-1b	MOC-2	MOC-3	MOC-4	MOC-5a	MOC-5b	FXR Targets
Non-Affected	SLC10A1	ABCA2	CES1	DHFR	ERCC1	AEG1	AKT1	CEBPB
	SLC10A2	ABCA3	CES2	ESR2	DUT	BAX	BCL2	CYP3A4
	SLCO2B1	ABCA6	CYP1A1	FRAP1	GADD45A	BCL2L1	BIRC1	SLCO1B1
	SLCO4A1	ABCA8	CYP1A2	KDR	MLH1	BIRC2	BIRC4	SLCO1B3
	SLC22A1	ABCB1	DPYD	KIT	MLH3	BIRC3	BIRC5	
	SLC22A2	ABCC1	GSTA1	mTOR	MSH2	CDKN1A	BIRC7	
	SLC22A4	ABCC2	GSTP1	PDGFRA	MSH3	DIABLO	BTG1	
	SLC22A5	ABCC3	TYMP	TOP1	PMS1	FAS	CASP8	
	SLC28A1	ABCC4	UGT1A	TOP2A	PMS2	PSMD9	CFLAR	
	SLC28A2	ABCC5	UMPS	TYMS	PRKDC	TP53	EGFR	
	SLC28A3	ABCC6	UPP1		RAD51		JUN	
	SLC29A1	ABCC10	UPP2		RAD51AP1		MAPK1	
	SLC29A2	ABCC11			TCEA1		MYC	
	SLC31A1	ATP7A			TCEA3		NFKB1	
		ATP7B			UDG		PIK3CG	
		MVP			XPA		RPL6	
					XPC		SQSTM1	
					XRCC5			
					XRCC6			
	Up-Regulated							CCL14 ^a
							CCL15 ^a	ABC14 ^a
								KRT13 ^a
								TCEA2 ^a

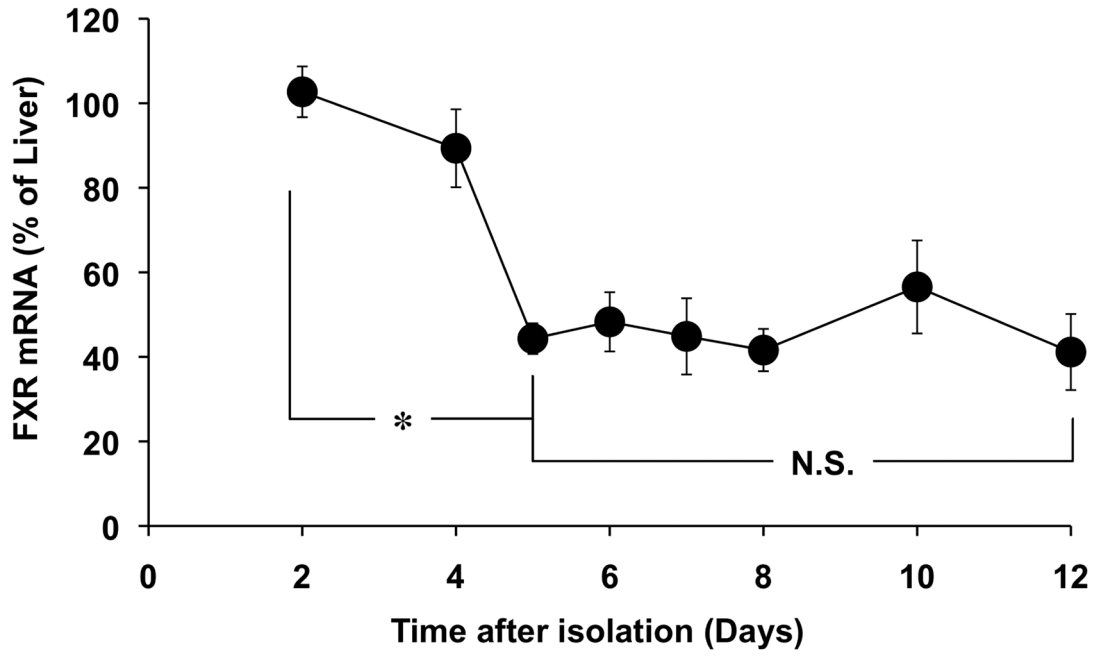
^a, Genes whose expression was significantly ($p < 0.05$) modified in human hepatoma Alexander cells transfected with FXR+RXR, in response to FXR activation by 1 μ M GW4064.

Supplementary Table 1. Oligonucleotide sequences of primers used in Gateway cloning.

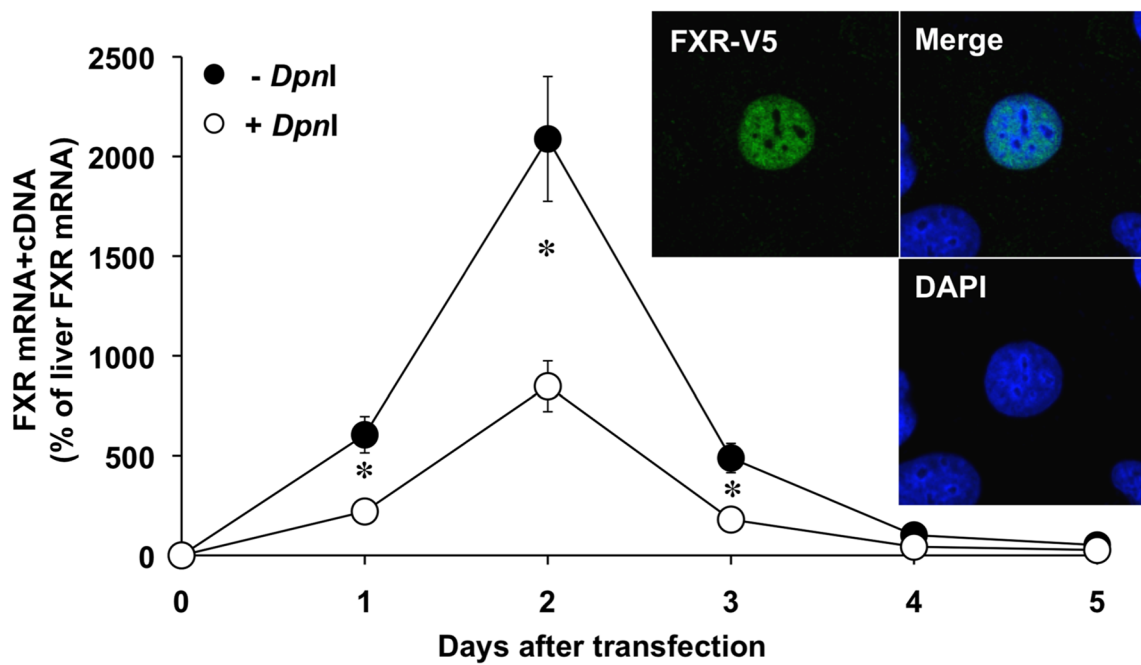
Cloned cDNA	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
FXR α 1-/V5	ATGGGATCAAAAATGAATCTCATTGAACATTCCC	CTGCACGTCCCAGATTTCCACAGAG
FXR α 1-/STOP	ATGGGATCAAAAATGAATCTCATTGAACATTCCC	CTACTGCACGTCCCAGATTTCCACAGAG
RXR α	ATGGACACCAAACATTTCTGCGCT	CTAAGTCATTTGGTGC GGCGCCT

Supplementary Table 2. Oligonucleotide sequence of primers used to determine the expression levels of human genes by RT-QPCR.

Gene	Protein	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amp. Size (pb)	Acc. Number
<i>ABCB11</i>	BSEP	GTGAAGGAATGGTGACCGTGA	TCCTTGGCAGCTTGGACTATGTCT	178	NM_003742
<i>ABCB4</i>	MDR3	CGAGGTTGAGGCTGAGATGGAT	TTGCTGCTGATGCCAGTCAAAG	100	NM_018850
<i>ABCC11</i>	MRP8	CGGTCTCCTTTATTCTCCACA	AGCCTCTAAACTGGCTGATGAAGT	101	NM_032583
<i>BTG1</i>	BTG1	CAGGAGCTGCTGGCAGAACATT	AGCTCCTGACTGCTCAGTCCAAT	149	NM_001731
<i>CASP8</i>	CASP8	TCTGCCTACAGGGTCATGCTCTATC	TCCAGCAGGTTTCATGTCATCATCCA	128	NM_001080125
<i>CCL14</i>	CCL14	GTGCTGCTTACCTACTACTACATA	GGCCCCTTTTGGTGATGAAGACAAT	113	NM_032962
<i>CCL15</i>	CCL15	AGGCCAGTTCATAAATGATGACAGAGA	GGGATGCTTTGTGAGATGTAGGAGGT	130	NM_032965
<i>CDKN1A</i>	p21	GAGGAGGCGCCATGTCAGAA	ATTAGCGCATCACAGTCGCGG	124	NM_000389
<i>CEBPB</i>	C/EBP β	GGCCGGTTTCGAAGTTGATGCAAT	AGCAACAAGCCGTAGGAACATCT	134	NM_005194
<i>FAS</i>	FAS	GCCCTGTCTCCAGGTGAAA	GGCTTTGTCTGTGACTCCTTCCC	103	NM_000043
<i>GADD45A</i>	GADD45A	GAGAGCAGAAGACCGAAAGGATGGATAA	ATCTGCAGAGCCACATCTCTGTC	193	NM_001924
<i>GAPDH</i>	GAPDH	TGAGCCCGCAGCCTCC	TACGACCAATCCGTTGACTCC	138	NM_002046
<i>KRT13</i>	KRT13	AGCTCCGGGACAAGATCCTGA	CCAGCTCATTCTCATACTGAGCCTGAA	114	NM_153490
<i>NR0B2</i>	SHP	GGTTCATGCTGTCTGGAGT	CTGGCACATCGGGTTGAAGA	99	NM_021969
<i>NR1H4</i>	FXR	ACAGAACAAGTGGCAGGTC	CTGAAGAAACCTTTACACCCTC	368	NM_005123
<i>OSTα</i>	OST α	TTCCAGTTCTCCTCATCCTGAC	CAATTCATCACTTGAGACCTGGTTTT	122	NM_152672
<i>OSTβ</i>	OST β	TGGCAGCTGTGGTGGTCATT	TGGTGGCTGCATCGTTTCT	83	NM_178859
<i>PRKDC</i>	PRKDC	GCGGTGCTGGCATTACAGACAT	GGTGCATCTTCTGGCCATT	161	NM_006904
<i>RAD51</i>	RAD51	GCCATGATGGTAGAATCTAGGTATGCACT	CAAACATCAGCGAGTCGCAGAA	154	NM_002875
<i>RAD51AP1</i>	RAD51AP1	GCAGTGCCTTGTACAAAGATGGCTT	TGCACATTAGTGGTACTGTTGGAAGT	110	BC016330
<i>SQSTM1</i>	SQSTM1	GTCTGAGGGCTTCTGCACA	CCCCAACGTTCTCAGGAAATCACA	200	NM_003900
<i>TCEA1</i>	TFIIS-1	CCTGAGGCAAGAGAAGAACTACTTCCA	GCTGCAGCAAGCATCTCCCTA	152	NM_006756
<i>TCEA2</i>	TFIIS-2	TCGACTCCGAGGATCACCACATTT	CACGTGGTCATGGTCCGTCT	111	NM_003195
<i>TCEA3</i>	TFIIS-3	CCCTGAAGGCGGACGATGATTACA	CGGTACTTCATGTCCTGCTCTTGA	112	NM_003196
<i>TP53</i>	p53	CCTGGATTGGCAGCCAGACT	AAATCATCCATTGCTTGGGACGGC	166	NM_000546
<i>XRCC5</i>	XRCC5	GGAAATAAGGCAGCTGTTGTGCTGTG	TCTCAGCAACACCTGTCGCTGTA	134	NM_021141
<i>XRCC6</i>	XRCC6	CCTGCGCCAAAGTGAGCAGTA	AGTCTCCACTTGCTTCAAGTTCTCT	115	NM_001469



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

7.3- CONCLUSIONS

FIRST CONCLUSION

In tissues expressing the nuclear receptor FXR, differences in the expression patterns of FXR α 1(+/-) and FXR α 2(+/-) isoforms are found. Thus, FXR α 1 isoforms are most abundant in liver, whereas FXR α 2 are predominant in intestine and kidney. In contrast, similar proportion of FXR α (+) and FXR α (-) isoforms are expressed in these tissues. Regardless the cell type investigated, all FXR isoforms have intranuclear localization.

SECOND CONCLUSION

The magnitude of the FXR response to their natural agonists, bile acids, and synthetic ligands, such as GW4064, differs among the four isoforms of this nuclear receptor. Regarding to the magnitude of stimulation of the expression of FXR target genes, the FXR α 1(-) isoform generally induced a stronger response than FXR α 2(-). Moreover, long FXR transcripts (+) are less potent than short isoforms (-). This order of transcriptional activity is maintained in both hepatic and intestinal cell lines.

THIRD CONCLUSION

Based on phenotypic changes induced by the activation of FXR isoforms by endogenous or synthetic agonists, FXR target genes can be classified into three groups. One of them is shared by typically hepatic, such as BSEP, and intestinal, such as IBABP and FGF19, target genes. The other two patterns of response include genes whose expression responds to FXR activation in both liver and intestine, such as SHP and OST β . These patterns of differential stimulation of transcription by FXR isoforms are shared by all agonist able to activate this nuclear receptor.

FOURTH CONCLUSION

Regarding the steroid nucleus, there is a marked diversity in the ability of different molecular species of bile acids to activate FXR isoforms. Thus, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, lithocholic acid and allo-cholic acid, are able to activate all transcripts of this nuclear receptor, whereas cholic acid and ursodeoxycholic acid lack this ability

FIFTH CONCLUSION

Depending on the cell type, the conjugation with taurine or glycine abolishes, reduces or does not affect the ability of bile acids to activate FXR. This suggests that to carry out their agonist activity on this nuclear receptor, conjugated bile acids, but not their free counterparts, require the presence of some additional non-identified mechanism that has disappeared or is less active in some liver and intestinal tumor cells.

SIXTH CONCLUSION

In naïve patients, the presence of the multidrug resistance phenotype characteristic of hepatic and intestinal tumors is not associated with increased expression of FXR. On the contrary, the expression levels of this nuclear receptor are decreased in hepatoblastoma, hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma and colon adenocarcinoma. Moreover, in these tumors there is no change in the expression patterns of FXR isoforms that could justify changes in the overall FXR-dependent transcriptional activity.

SEVENTH CONCLUSION

In both hepatic and intestinal cell lines, as in healthy human hepatocytes, an increase in FXR expression levels, either by transfection or induced by prolonged treatment with cisplatin, and subsequent activation of this nuclear receptor, stimulates the expression of genes involved in at least three different mechanisms of chemoresistance. These include ABCB4 and ABCG2 export pumps, TCEA2, involved in DNA repair, and CCL14, CCL15 and KRT13, related to enhanced cell survival.

EIGHTH CONCLUSION

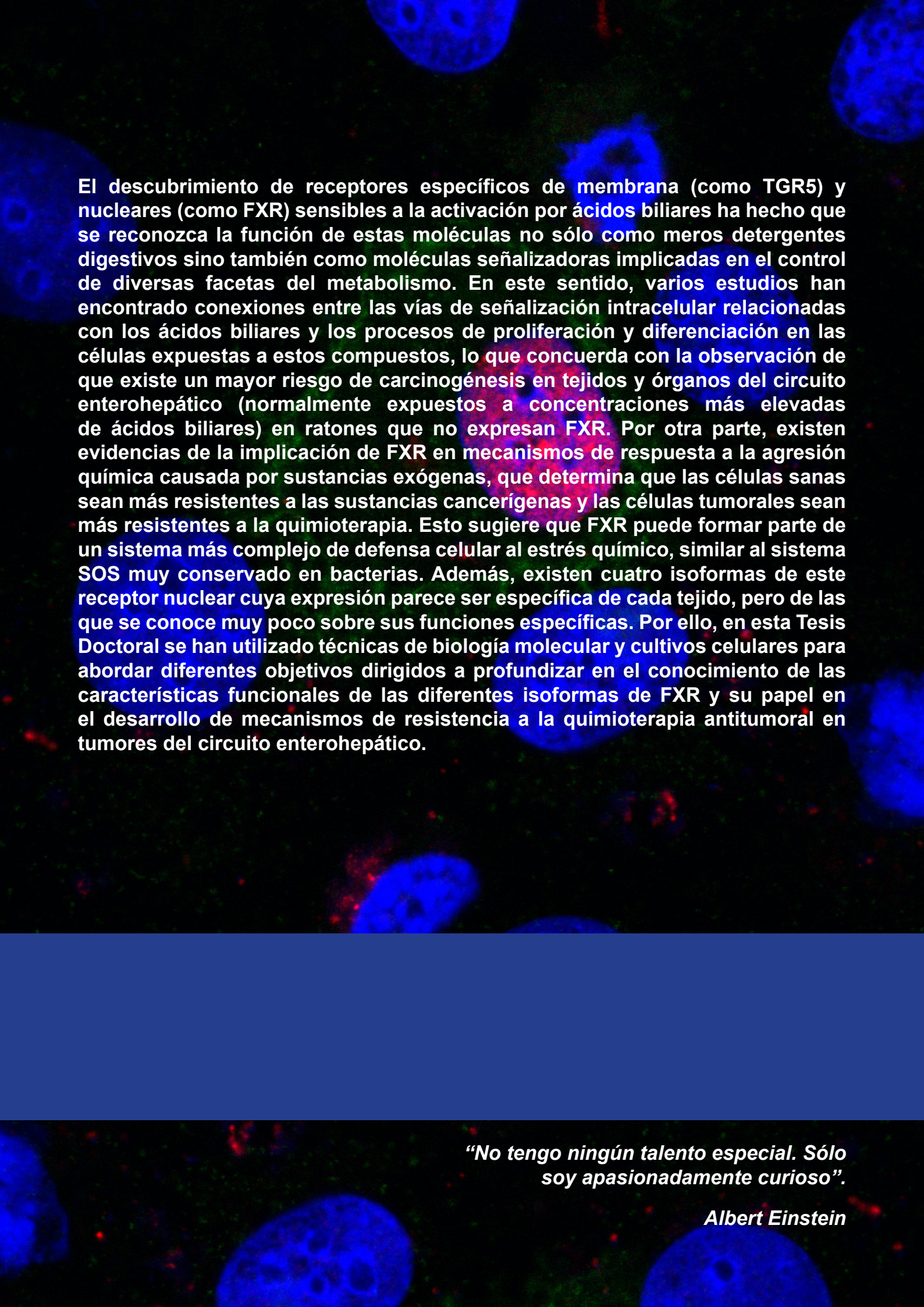
Chemoresistance mechanisms activated by FXR are able to partially protect liver and intestinal cells against the toxicity of certain genotoxic compounds such as cisplatin, mitomycin C, doxorubicin and potassium dichromate. However, they fail to protect against the toxic effect of compounds with different mechanisms of action, such as colchicine, paclitaxel, acetaminophen, artesunate and sorafenib.

NINETH CONCLUSION

Some genotoxic agents such as cisplatin are able to activate FXR, probably by an indirect way. Moreover, cisplatin can induce the expression of genes belonging to the FXR signaling pathway independently of this nuclear receptor.

GLOBAL CONCLUSION

FXR is involved in the activation of response mechanisms to chemical aggression caused by endogenous and exogenous compounds. Thus, FXR may form part of a complex cellular defense system to chemical stress, similar to SOS system that is highly conserved in bacteria. In healthy hepatic and intestinal cells, FXR may play a role in protection against genotoxic, and therefore potentially carcinogenic, substances, whereas in tumor cells FXR may be involved in the stimulation of its chemoresistance in response to the treatment with certain anticancer drugs.



El descubrimiento de receptores específicos de membrana (como TGR5) y nucleares (como FXR) sensibles a la activación por ácidos biliares ha hecho que se reconozca la función de estas moléculas no sólo como meros detergentes digestivos sino también como moléculas señalizadoras implicadas en el control de diversas facetas del metabolismo. En este sentido, varios estudios han encontrado conexiones entre las vías de señalización intracelular relacionadas con los ácidos biliares y los procesos de proliferación y diferenciación en las células expuestas a estos compuestos, lo que concuerda con la observación de que existe un mayor riesgo de carcinogénesis en tejidos y órganos del circuito enterohepático (normalmente expuestos a concentraciones más elevadas de ácidos biliares) en ratones que no expresan FXR. Por otra parte, existen evidencias de la implicación de FXR en mecanismos de respuesta a la agresión química causada por sustancias exógenas, que determina que las células sanas sean más resistentes a las sustancias cancerígenas y las células tumorales sean más resistentes a la quimioterapia. Esto sugiere que FXR puede formar parte de un sistema más complejo de defensa celular al estrés químico, similar al sistema SOS muy conservado en bacterias. Además, existen cuatro isoformas de este receptor nuclear cuya expresión parece ser específica de cada tejido, pero de las que se conoce muy poco sobre sus funciones específicas. Por ello, en esta Tesis Doctoral se han utilizado técnicas de biología molecular y cultivos celulares para abordar diferentes objetivos dirigidos a profundizar en el conocimiento de las características funcionales de las diferentes isoformas de FXR y su papel en el desarrollo de mecanismos de resistencia a la quimioterapia antitumoral en tumores del circuito enterohepático.

“No tengo ningún talento especial. Sólo soy apasionadamente curioso”.

Albert Einstein