



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

Estudio comparativo entre tumor primario y metastásico de la trimetilación de la Histona H3 en el modelo *in vivo* de metástasis hepática de cáncer colorrectal murino.

Autor:
Ariane Schaub Clerigué

Director/a:
Iker Badiola Etxaburu /
Isabel Smith Zubiaga

ÍNDICE

1) RESUMEN.....	2
2) INTRODUCCIÓN.....	3
1.1- Concepto de metástasis.....	3
1.2- Metástasis hepática.....	5
1.3- Epigenética.....	5
1.4- Condensación de la cromatina.....	6
1.5- Condensación de la cromatina en cáncer colorrectal.....	7
1.6- Objetivos e hipótesis.....	8
3) MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.1- MATERIALES.....	8
2.2- MÉTODOS.....	12
2.2.1- Modelo <i>in vivo</i> . Obtención de tumores.....	12
2.2.2- Obtención de líneas celulares tumorales a partir de explantes murinos.....	13
2.2.3- Aislamiento de histonas.....	13
2.2.4- Análisis del patrón de trimetilación de Histona H3 en células tumorales mediante Western Blot.....	14
2.2.5- Stripping.....	16
4) RESULTADOS.....	16
4.1- Cuantificación de histona.....	16
4.2- Trimetilación de Histona H3.....	17
5) DISCUSIÓN.....	18
6) BIBLIOGRAFÍA.....	21

RESUMEN

Los mecanismos epigenéticos, entre los que está implicada la modificación covalente de histonas, son esenciales para el mantenimiento estable de la actividad génica en las células. Estos mecanismos también están implicados en la aparición de enfermedades como el cáncer colorrectal (CCR), siendo la metástasis hepática una de las formas más agresivas de la misma al producir una drástica disminución de la esperanza de vida del enfermo. Las modificaciones en las histonas, conocidas recientemente como código histónico, afectan a la estructura de la cromatina y juegan un papel importante en el desarrollo de la tumorigénesis. Sin embargo, se sabe poco acerca de aquellas células que adquieren la capacidad de metastatizar, y es por ello que en el presente trabajo se estudian las diferencias epigenéticas entre células tumorales primarias y células tumorales metastásicas para el patrón de trimetilación de la histona H3 en tres residuos diferentes del aminoácido lisina: lisina 4 (H3K4me3), lisina 9 (H3K9me3) y lisina 27 (H3K27me3).

Epigenetic mechanisms, among histone covalent modifications are included, they are essential for the cell's stable gene activity maintenance. These mechanisms are also involved in the onset of diseases such as colorectal cancer (CRC), being hepatic metastasis one of the most aggressive forms of the disease due to the drastic decrease of life expectancy of the patient. Modifications in histones, recently called as "histone code", affect the chromatin structure and play an important role in the development of tumorigenesis. Little is known about those cells that acquire metastatic capacity. This is the reason why in this work, epigenetic differences on the patterns of trimethylation of histone H3 (for 3 different amino acids: lysine 4 (H3K4me3), lysine 9 (H3K9me3) and lysine 27 (H3K27me3)) are studied between primary tumoral cells and metastatic tumoral cells.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las enfermedades más comunes en el mundo. En los países desarrollados constituye el tercer tipo de cáncer que más afecta a los hombres (por detrás del cáncer de pulmón y próstata) y el segundo entre las mujeres (tras el cáncer de mama). Se trata de una enfermedad con una incidencia que va en aumento, registrándose cada año más de un millón de nuevos casos con una mortalidad entorno al 33%. En los países desarrollados constituye la segunda causa de muerte en ambos sexos y es más común a partir de los 50 años de edad (1). En la mayor parte de los casos el CCR aparece de forma esporádica, mientras que el 25% de los afectados presentan un historial familiar previo, sugiriendo que la enfermedad podría tener un componente genético y ambiental (2).

Entorno al 95% de los casos de CCR son adenocarcinomas. El origen de estos tumores suele estar en células epiteliales del colon que sufren un proceso de transformación y comienzan a proliferar descontroladamente y a evadir la apoptosis, originando el tumor. El pronóstico de la enfermedad suele estar muy condicionado por la posible propagación del tumor original a otro órgano del cuerpo, proceso conocido como metástasis. Los órganos que más sufren la metástasis en el caso del CCR son el hígado (más del 50% de los casos), pulmón, hueso y cerebro.

Concepto de metástasis

La metástasis es un proceso complejo que ocurre secuencialmente en varios pasos. El proceso en sí es ineficiente, ya que tan sólo una pequeña proporción de las células que entran en circulación serán capaces de desarrollar metástasis y en gran parte es debido a que la mayoría son eliminadas por el sistema inmune del hospedador. Sin embargo, hay casos en los que las células transformadas que conforman el tumor primario se desprenden y escapan del control del sistema inmune y se diseminan por todo el cuerpo a través del sistema linfático o sanguíneo. En éste proceso deben sobrevivir a un ambiente hostil. El sistema de defensa inmunitario, posibles fármacos que reciba la persona que padece la enfermedad así como el trauma mecánico y químico producido por el movimiento en los vasos sanguíneos y linfáticos y la naturaleza de la sangre dificultan la supervivencia de estas células tumorales que se diseminan por el cuerpo. Las células metastásicas que logren sobrevivir pueden asentarse en órganos distantes del lugar original proliferando y formando nuevas masas tumorales. De éste modo, los pasos que se distinguen en el proceso de metástasis son los siguientes:

1. Neovangiogenesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos preexistentes en los tejidos que rodean al tumor y que se introducen hacia el interior de la masa tumoral. Éste proceso es necesario cuando el tumor alcanza un diámetro entorno a 1-2 mm para que las células puedan obtener nutrientes y oxígeno así como para eliminar los productos de desecho (3). La angiogenesis es promovida por las células endoteliales del huésped así como por las células tumorales mediante la liberación de diversos factores como pueden ser el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el factor de crecimiento de células endoteliales (VEGF).
2. Intravasación. Se trata del mecanismo por el cual las células tumorales se desprenden de la masa tumoral y traspasan la pared vascular, de manera que penetran en el sistema circulatorio. Las células se adhieren al lado externo de la membrana basal del vaso sanguíneo o linfático y mediante la liberación de enzimas proteolíticos degradan la pared, de tal manera que son capaces de llegar a la luz del vaso.
3. Extravasación. No todas las células que viajan por los vasos consiguen sobrevivir pero aquellas que lo consiguen pueden unirse a la cara interna del vaso, hidrolizarlo y atravesarlo, asentándose finalmente en el tejido del órgano receptor.
4. Proliferación celular y consiguiente formación de la masa tumoral metastásica.

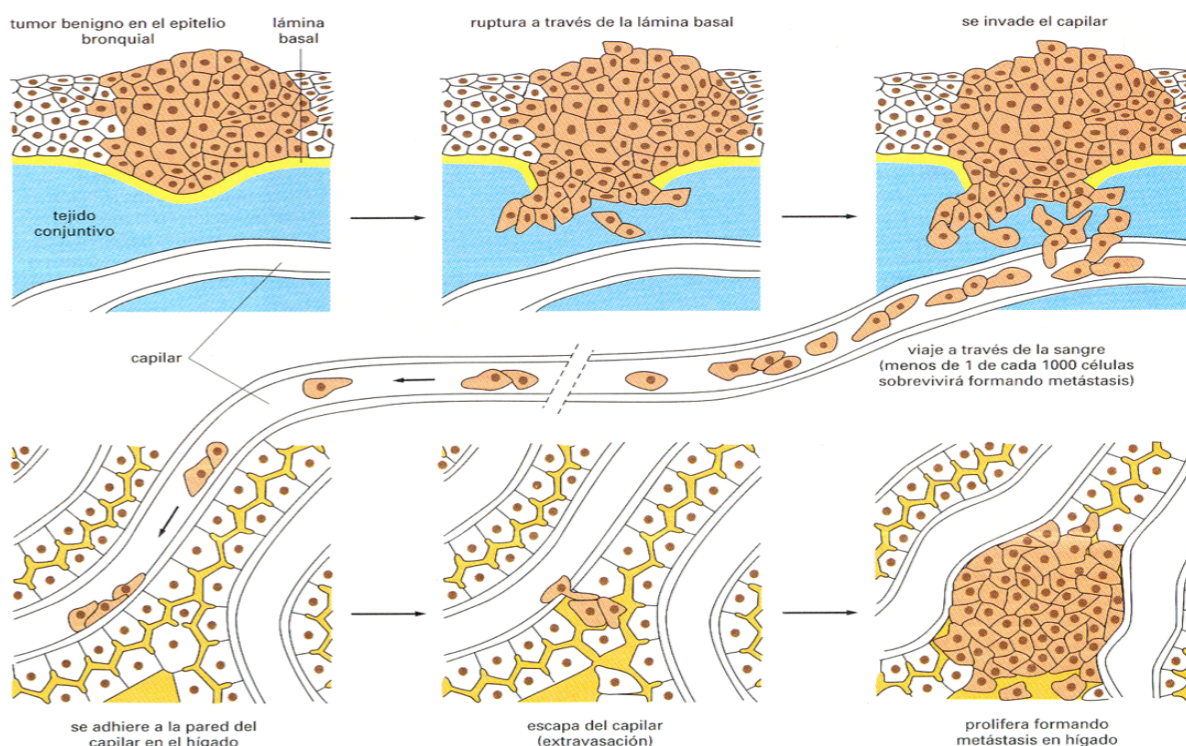


Fig.2. Proceso de metástasis. En el proceso de metástasis se distinguen una serie de pasos que las células tienen que atravesar para formar un tumor metastásico.

Metástasis hepática

Tal como hemos comentado anteriormente el hígado suele ser un órgano diana habitual en la metástasis de CCR y cuando se produce, la esperanza de vida del paciente disminuye drásticamente, situándose entorno al año si no se recibe tratamiento (4).

Se trata de un órgano frecuentemente metastatizado por el CCR debido a su función y a su arquitectura característica. El hígado recibe a través de la arteria hepática sangre oxigenada y por medio de la vena porta sangre desoxigenada y rica en nutrientes procedente del intestino y del bazo. Además, presenta una red capilar (sinusoides) entorno a la cual se diferencian cuatro tipos celulares (hepatocitos, células de Kupffer, células endoteliales del sinusoides hepático, células estrelladas hepáticas). La colonización del hígado comienza en los sinusoides, donde las células endoteliales del sinusoides hepático y las células de Kupffer interactúan con las células tumorales. Estas últimas se unen a las células endoteliales, hidrolizan la pared del vaso y lo extravasan, invadiendo el parénquima hepático. Así, las células residentes del hígado además de jugar un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis hepática, también están implicadas en el proceso de metástasis del CCR al activarse, liberar factores y reclutar células del sistema inmune. Todo ello genera un microambiente tumoral propicio para el asentamiento y proliferación de las células procedentes del tumor original (5). Una vez que el tumor metastásico se ha asentado en el hígado las terapias tradicionales poco pueden hacer para erradicarlo. Son células muy resistentes que difícilmente se pueden tratar con terapias enfocadas a atacar características muy genéricas de las células tumorales, como es el caso de los agentes antiproliferativos que eliminan cualquier célula proliferativa. Por este motivo en los últimos años se ha ahondado en estudios comparativos más profundos de las células tumorales. Y los citados estudios han coincidido con la aparición de una nueva disciplina llamada epigenética.

Epigenética

El término epigenética se refiere a cambios heredables en la expresión génica producidos sin que se vea afectada la secuencia de DNA. Los principales mecanismos epigenéticos son 3: la expresión de microRNAs, la metilación del DNA y la condensación de la cromatina, todos ellos procesos reversibles.

Los microRNAs son pequeñas moléculas que están implicadas en el silenciamiento específico de mRNAs y por otro lado, la metilación del DNA y la condensación cromatínica se producen por mediación de enzimas altamente específicas. La especificidad y la reversibilidad son clave en el diseño de terapias dirigidas a bloquear o revertir los procesos epigenéticos mediante el

uso de compuestos químicos y actualmente constituyen una realidad en el tratamiento de enfermedades como el cáncer (6).

La herencia epigenética es un mecanismo regulador esencial para el mantenimiento estable de la actividad génica de las células de una generación a la generación siguiente (7); está implicada en la embriogénesis, en la impronta genómica, en la inactivación del cromosoma X y en enfermedades como el cáncer.

Condensación de la cromatina

En las células eucariotas, el DNA se encuentra en forma de cromatina asociado a proteínas histonas y a proteínas no histonas. Se trata de una estructura muy dinámica, con diferentes grados de empaquetamiento que va cambiando en respuesta a los diferentes procesos celulares como la replicación y la transcripción.

Hay dos tipos de cromatina:

euromatina, que constituye la mayor parte del material génico y que sufre los procesos de condensación y descondensación durante las diferentes fases del ciclo celular y por otro lado está la heterocromatina, altamente condensada durante todo el ciclo celular, y por tanto transcripcionalmente inerte, que se localiza en los centrómeros, telómeros y también en el cromosoma X inactivo de hembras de mamífero.

Las histonas son las proteínas más abundantes de la molécula de cromatina y presentan carga neta positiva debido a la abundancia de residuos de arginina y lisina. El nivel más simple de la estructura de la cromatina es el nucleosoma, compuesto por dos vueltas de la molécula de DNA entorno a un octámero de histonas. El octámero se compone de dos histonas H2A, H2B, H3 y H4, y cada una de ellas presenta un dominio globular y un dominio que sobresale del nucleosoma y que es más flexible; la cola, compuesta por varios aminoácidos (entre 11 y 37, normalmente). Aquellos aminoácidos que forman parte de la cola y que tienen cargas positivas interactúan con las cargas negativas procedentes de los grupos fosfato de la



Fig.2. Nucleosoma y colas de histonas. Del octámero de histonas nacen las colas de las histonas, formadas por cadenas de aminoácidos que pueden sufrir modificaciones covalentes. (P.Cheung, C. David Allis, P. Sassone-Corsi modificada).

molécula de DNA de tal manera que si se generan alteraciones en las colas de las histonas, su relación con la molécula de DNA se va a ver alterada, originando a su vez un reordenamiento estructural de la cromatina. Las modificaciones que pueden sufrir las histonas son varias: acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones, citrulinaciones y ADP-ribosilaciones, y el resultado es lo que se conoce como “código histónico”, denominado así porque constituye una extensión de la información contenida en la molécula de DNA al ser un mecanismo implicado en la regulación de la expresión génica (8). Además, estas modificaciones podrían ser clave en otros procesos celulares como la replicación, la recombinación y la segregación cromosómica (9).

La modificación covalente de las histonas es llevada a cabo por enzimas que son altamente específicas para aminoácidos que presentan una localización concreta dentro de la cola de las histonas. Estas modificaciones constituyen a su vez dianas para el reclutamiento de diversos complejos enzimáticos que contienen cromodominios y que usan las marcas epigenéticas de las colas de las histonas para unirse a la cromatina y comenzar procesos de compactación de la cromatina, regulación de la transcripción o reparación del DNA (10).

La adición de grupos metilo a las colas de histonas es llevada a cabo por enzimas DNA metiltransferasas. Concretamente, en la histona H3 estos grupos metilo suelen estar unidos a residuos de lisina y dicha unión es catalizada por enzimas histona lisina metiltransferasas (KMT). Generalmente son los aminoácidos de lisina 4 (H3K4) lisina 9 (H3K9) y lisina 27 (H3K27) los que aparecen metilados y pueden aparecer en forma de mono, di o trimetilaciones (9). Las trimetilaciones están asociadas tanto a regiones activas como a regiones reprimidas del DNA: la trimetilación de lisina 4 (H3K4me3) está implicada en la activación de la transcripción, mientras que las trimetilaciones en lisina 9 (H3K9me3) y lisina 27 (H3K27me3) suelen estar asociadas a genes silenciados.

Condensación de la cromatina en el cáncer colorrectal

El cáncer es una enfermedad epigenética ya que prácticamente todos los cánceres presentan alteraciones epigenéticas, y entre ellas remodelaciones en la conformación de la cromatina producidas por cambios covalentes en las histonas (6). Se sabe que el patrón de metilación de los residuos de lisina en la histona H3 juega un papel importante en la carcinogénesis. En el CCR la H3K9me3 aumenta y podría estar directamente relacionada con procesos de metástasis (11). Así mismo, el enriquecimiento de la H3K27me3 aparece en las etapas más tempranas del hepatocarcinoma (12). Por el contrario, la H3K4me3 parece estar relacionada con un descenso en la malignidad del cáncer gástrico (13). Todos ellos son procesos

relacionados con la tumorigénesis de cánceres gastrointestinales.

Objetivos e hipótesis

Las observaciones realizadas al estudiar y comparar el epigenoma de células sanas y células cancerígenas reflejan una clara implicación de los cambios en el patrón de trimetilación de la histona H3 en el cáncer. Sin embargo, en lo que refiere a éste tema, se sabe poco acerca de aquellas células que sufren el proceso de metástasis, es por ello que en éste trabajo se han estudiado las diferencias en tres patrones de trimetilación de histona H3 que pueda haber entre la célula cancerígena inicial que crece y forma el tumor primario y la célula tumoral metastásica que logra invadir y crecer en un órgano diana como es el hígado.

La hipótesis que se plantea por lo tanto es que las células tumorales del cáncer colorrectal con capacidad metastásica presentarán diferencias epigenéticas respecto a aquellas células que han formado el tumor primario y que no han adquirido la capacidad de metastatizar.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Animales

Ratones BALB/C machos de 4 semanas de edad procedentes de los laboratorios Charles River (España). Se utilizó esta línea de ratón debido a que es singénica con el tipo celular inyectado en los animales.

Células

La línea celular C26 originada en ratones balb/c. (American Type Culture Collection [ATCC]; Manassas, VA, USA).

Isoflurano

Anestésico inhalatorio utilizado en la cirugía para dormir los ratones.

Abbot Laboratories Ltd. (100% isoflurano). (Maidenhead, Berkshire, UK).

PBS (Phosphate buffered Saline)

Tampón fosfato salino. La formulación del tampón en su forma de uso es la siguiente: 8 gr/l

de NaCl (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA), 0'2 gr/l de KCl, 1'44 gr/l de Na₂HPO₄·2H₂O (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA), 0'2 gr/l de KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA) en agua destilada y ajustando el pH a 7'4.

PBS-EDTA (4mM)

Tampón PBS mas EDTA 4mM (Merck; Darmstadt, Alemania).

RPMI-1640

El RPMI-1640 (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA). Suplementado con antibióticos (streptomicina, penicilina).

FBS (Fetal Bovine Serum)

Gibco. Life Technologies, Inc; (Gaithersburg, MD, USA).

Solución antibiótica y antimicótica

Solución 100 veces concentrada de penicilina (10000 unidades/ml), estreptomicina (10 mg/ml) y anfotericina B (25µg/ml) suministrada por (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Sulfato de gentamicina

Complemento antibiótico para los cultivos de células primarias a una concentración de 50µg/ml. Suministrada por (Sigma, St Louis, MO, USA) en forma de sulfato en solución a 10 mg/ml.

DEPC – Treated Water

Ambion. Life Technologies. (Gaithersburg, MD, USA).

Tripsina

0.25% Trypsin -EDTA (1x). Sigma- Aldrich. (St Louis, MO, USA)

Filtro

100um Nylon. Cell Strainer. BD Falcon. (Becton Drive, Franklin Lakes. NJ. USA.).

Lysis Buffer

10 mM Tris-HCl pH8 (Panreac.Castellar del Vallès, Barcelona, España), 1 mM KCl, 1'5 mM MgCl₂, 0'5% NP40, DTT 1 mM, inhibidor de proteasa.

TCA (Trichloroacetic acid)

. ACS reagent 99%. Sigma–Aldrich. (St Louis, MO, USA)

Acetona ácida

0'1% HCl (Panreac.Castellar del Vallès, Barcelona, España) en acetona (Panreac.Castellar del Vallès, Barcelona, España) (100ul en 100ml).

Gel para Western Blot

Preparado en dos fracciones; una superior llamada stacking y una inferior llamada running. El Running Gel (15% de Acrilamida) se compone de 30% Acry-Bis (BIO-RAD Laboratories. Alfred Nobel Dr. Hercules, CA), Tris HCl 2M pH 8'8 (Panreac.Castellar del Vallès, Barcelona, España), H₂O Milli-Q 2'25 ml, 10-20% SDS (Sigma –Aldrich.St Louis, MO, USA), 10% APS, TEMED 5 ul (BIO-RAD Laboratories. Alfred Nobel Dr. Hercules, CA).

El Stacking Gel (4% Acrilamida) se compone de 30% Acry-Bis(BIO-RAD Laboratories. Alfred Nobel Dr. Hercules, CA), Tris HCl 0'5M pH 8'8 (Panreac.Castellar del Vallès, Barcelona, España).H₂O Milli-Q 1'75 ml, 20% SDS(Sigma –Aldrich.St Louis, MO, USA), 10% APS, TEMED 2'5 ul (BIO-RAD Laboratories. Alfred Nobel Dr. Hercules, CA).

Ladder

BenchMark Prestained Prtein Ladder. Invitrogen. (Carlsbad, CA. USA)

Laemmli 4x

Preparado en las siguientes proporciones:

1ml Glicerol, SDS 10% (Sigma –Aldrich.St Louis, MO, USA), 1'25ml Stacking Buffer, 250ul H₂O Milli-Q, Azul Bromofenol 1% (0'01gr/ml), 20% 2-mercaptoetanol.

2-mercaptoetanol

2-Hydroxyethylmercaptan; β-Mercaptoethanol. Sigma-Aldrich. (St Louis, MO, USA)

Buffer electroforésis 5x

Tris 0'124M, Glicina 0'959M (Sigma-Aldrich. St Louis, MO, USA)

y SDS 0'0173M (Sigma-Aldrich. St Louis, MO, USA)

en un volumen total de 1L de agua destilada. El buffer se utilizó para llevar a cabo la electroforesis a una concentración de 1x.

Buffer transferencia 1x

Tris 0'0249M (Panreac. Castellar del Vallès, Barcelona, España), Glicina 0'1918M(Sigma-Aldrich. St Louis, MO, USA), 200 ml de metanol (Panreac.Castellar del Vallès, Barcelona, España) y se ajusto a 1L con agua destilada.

Tris Buffer Saline (TBS 5x)

Tris 0'124M (Panreac. Castellar del Vallès, Barcelona, España), NaCl 0'75M (Panreac.Castellar del Vallès, Barcelona, España). Se utilizo para la preparación del TBS-T.

TBS-T

El TBS 5x se diluyo a 1x y se le añadieron 500 µl de Tween 20 (Sigma-Aldrich. St Louis, MO, USA) por litro de TBS 1%. El TBS-T se utilizo para el lavado de las membranas y diluciones de los anticuerpos.

Bloqueo

TBS-T 1x al 5% de BSA.

Bovine Serum Albumin (BSA)

Sigma-Aldrich. (St Louis, MO, USA)

Buffer de Stripping

H2O destilada añadiendo glicina 0'2M (Panreac. Castellar del Vallès, Barcelona, España) y ajustado a pH 2'8.

Membrana PVDF

Immun-Blot. Tamaño del poro: 0'2µm.(BIO-RAD Laboratories. Alfred Nobel Dr. Hercules, CA).

Anticuerpos

Anticuerpos primarios

- Anticuerpo Anti-H3 trimethyl K4 Abcam Ms mAb to Histone H3 [mAbcam 12209 (trimethyl K4)] 100ugr (0'8 mgr/ml) ab 12209. (330 Cambridge Science Park Cambridge.UK).
- Anticuerpo Anti-H3 trimethyl K9 Abcam Rb pAb to Histone H3 (trimethyl K9) 100ugr (1mgr/ml) ab 8898. (330 Cambridge Science Park Cambridge.UK).
- Anticuerpo Anti-H3 trimethyl K27 Abcam Ms mAb to Histone H3 [mAbcam 6002] 100ugr (1mgr/ml) ab 6002. (330 Cambridge Science Park Cambridge.UK).
- Anticuerpo Anti-Histona H3 Histone H3 (FL-136): sc-10809 1:1000. (Santa Cruz. 10410 Finnell Street Dallas, Texas 75220. USA).

Anticuerpos secundarios

- Goat Anti-Mouse HRP Conjugated 1ml at 10ugr/ml. (Pierce. Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL. USA).
- Goat Anti-Rabbit HRP Conjugated 1ml at 10ugr/ml. (Pierce. Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL. USA).

ECL Western Blotting Detection Reagents

RPN 2106 GE Healthcare. Life Sciences. (Amersham Place. Little Chalfont Buckinghamshire HP79NA. UK).

MÉTODOS

Modelo *in vivo*. Obtención de tumores.

Se utilizaron un total de 3 ratones BALB/C a cada uno de los cuales se inoculó 50ul (100 000 células/ ratón) de una suspensión de células C26 en PBS, singénicas con la línea de ratones empleada. Éstas células fueron cultivadas en medio RPMI con estreptomycin/penicilina al 10% FBS. Los ratones se pincharon en bazo, clampando la vena porta para evitar una posible migración directa al hígado debido a la presión ejercida al inyectar. Transcurridos 15 días, se sacrificaron los ratones y se extrajeron las masas tumorales crecidas en el bazo y en el hígado. Se denominó tumor primario a aquellas células inoculadas y crecidas en el bazo, mientras que

las células que adquirieron capacidad metastásica y migraron al hígado formaron las masas tumorales metastásicas. Todos los experimentos se realizaron tras haber sido previamente evaluados y aprobados por el comité de ética de bienestar animal de la Universidad del País Vasco (237/212/Badiola Echaburu).

Obtención de líneas celulares tumorales a partir de explantes murinos

A partir de las masas tumorales extraídas de los ratones, se obtuvieron células tumorales primarias y metastásicas. Para ello, trabajando sobre placas de Petri, se trataron por un lado las masas tumorales primarias obtenidas de los bazo y por otro lado las masas tumorales metastásicas obtenidas de los hígados.

Las muestras de tejido se disgregaron en pequeños fragmentos utilizando para ello tijeras y 1000ul de tripsina en cada placa, se vertieron en tubos y se incubaron en la estufa durante 10 minutos. A continuación se centrifugaron a 720xg, 4°C durante 10 minutos, obteniendo un pellet de células de tumor primario y un pellet de células de tumor metastásico. Ambos pellets se resuspendieron en 700ul de FBS, 70ul de gentamicina y 7ml de RPMI. El contenido total de cada tubo fue filtrado con filtros de un tamaño de poro de 100um, de tal manera que sólo pasaron las células. Los fragmentos más grandes de tejido no disgregado quedaron excluidos. Se recogió el filtrado con cada tipo celular y se puso en placas de cultivo de 24 pocillos con 500ul del filtrado en cada pocillo. Transcurridas 12 horas se lavaron con PBS los cultivos de células tumorales primarias y metastásicas y se pasaron a frascos T25 con medio de cultivo RPMI y estreptomina, enriquecido con FBS al 10%. Siguiendo este procedimiento se obtuvieron dos líneas celulares distintas: células tumorales primarias y células tumorales metastásicas.

Aislamiento de histonas.

El aislamiento de histonas se realizó siguiendo el protocolo de extracción ácida de histonas para células de mamífero (14) para extraer histonas de células tumorales C26, células tumorales primarias extraídas del bazo y células tumorales metastásicas extraídas del hígado, todas ellas en el pase tres y cultivadas a 37°C en medio de cultivo RPMI suplementado con los antibióticos estreptomina/penicilina al 1% y FBS al 10%.

En primer lugar, se retiró el medio de cultivo de los tres frascos T75 y se limpiaron con PBS. Los tres tipos celulares se levantaron con PBS-EDTA atemperado y se centrifugaron a 600xg, 4°C durante 10 minutos. Los pellets se resuspendieron en PBS y volvieron a centrifugarse a 600xg, 4°C durante 10 minutos para eliminar posibles restos de PBS-EDTA. Se retiró el

sobrenadante y se añadió a cada muestra 2ml de lysis buffer. Se incubó durante 20 minutos en hielo y a continuación se centrifugó en la microcentrífuga a 4000rpm, 4°C, 5 minutos, resuspendiendo después los pellets en 400ul 0.4N H₂SO₄. Además, en este paso se vortexearon las muestras y se dejaron en hielo durante 40min. Después se centrifugaron a 10.000 rpm, 4°C durante 10 minutos para formar pellets de material insoluble que fue desechado. El sobrenadante, rico en histonas, de los tres tipos celulares diferentes se movió a un nuevo eppendorf al cual se añadió 100ul de TCA 100%. Se dejó que las histonas precipitasen durante 1 hora en hielo. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13000rpm, 4°C, durante 10 minutos obteniendo pellets de histonas. Se desechó el sobrenadante de TCA 100% y se limpiaron las muestras con dos centrifugaciones seguidas a 10000rpm, 4°C durante 5 minutos. La primera de ellas, tras añadir 500ul de acetona ácida a los pellets, y la segunda tras haber añadido 500ul de acetona. En ambos casos se retiró el sobrenadante. Las muestras se secaron durante 20 minutos al aire, volteando los eppendorf hasta que los pellets quedaron secos. Tras este paso, se resuspendieron en 100ul de DEPC water y se dejaron durante 10 minutos, hasta que las muestras estuvieron bien disueltas. Finalmente se congelaron a -80°C.

Análisis del patrón de trimetilación de Histona H3 en células tumorales mediante Western Blot.

Para comparar las diferencias de trimetilación en residuos de lisina en histona H3 se realizó Western Blot; una técnica que mediante el uso de anticuerpos específicos permite identificar proteínas que han sido previamente separadas según su tamaño o carga al realizar una electroforesis en gel. Posteriormente, estas proteínas, son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (polyvinylidene fluoride) al aplicarse nuevamente una corriente que las empuja a moverse y adherirse a la misma. De este modo, la membrana se convierte en una réplica del gel, permitiendo estudiar las proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos. En este caso se analizaron en tres líneas celulares diferentes (C26, tumor primario y tumor metastásico) la trimetilación de tres residuos de lisina: H3K4me₃, H3K9me₃, H3K27me₃. Teniendo en cuenta la cantidad de proteína aislada de cada tipo celular (ver Tabla 2 en Resultados), se prepararon las muestras en las proporciones indicadas a continuación:

Tipo celular	Muestra (ul)	2-β-mercaptoetanol +Laemmli (ul)	Agua destilada (ul)
C26	60	20	20
Tumor Primario	20	20	60
Tumor Mestastásico	60	20	20

Tabla 1. Preparación de las muestras de proteína histona aisladas a partir de cada línea celular para la realización de Western Blot.

Se cargaron 3 pocillos con histona de cada tipo celular, siguiendo siempre el orden: C26, tumor primario y tumor metastásico. Éste orden se repitió 3 veces. En cada pocillo se cargó un volumen total de 25ul. Previamente se llenó la cubeta de buffer de electroforesis 1x y se rodeó de hielo para evitar el excesivo calentamiento del buffer. Se realizó la electroforesis a 120V durante 20 minutos y una vez las muestras salieron de los pocillos, se subió la intensidad a 200V durante 45 minutos. Una vez finalizada la electroforesis se montó el casete con las esponjas, los filtros, la membrana previamente equilibrados en buffer de transferencia y el gel colocándolos en la cubeta con buffer de transferencia 1x. La transferencia se llevo a cabo a 150V durante 1 hora. Cuando finalizó, se puso la membrana con el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en movimiento. A continuación se lavó con TBS-T 1x durante 10 minutos y finalmente se cortó en tres partes, cada una de ellas con una muestra de histona asilada a partir de cada línea celular (C26, tumor primario y tumor metastásico).

Los anticuerpos primarios utilizados para detectar las 3 trimetilaciones de lisina en histona H3 fueron Anti H3 trimethyl K4 (diluido 1:2000), Anti H3 trimethyl K9 (diluido 1:1000) y Anti H3 trimethyl K27 (diluido 1:3000). Dichos anticuerpos se diluyeron en una disolución de TBS-T 1x al 2% de BSA y se incubaron en movimiento a 4°C overnight. Transcurrido este tiempo se lavaron las membranas dos veces (5 minutos cada vez) con TBS-T 1x y se añadieron los anticuerpos secundarios Goat Anti-Mouse (diluido 1:1000) y Goat Anti-Rabbit (diluido 1:3000), ambos diluidos en una disolución de TBS-T 1x al 2% de BSA. Se incubaron durante 1 hora en movimiento a temperatura ambiente y finalmente se volvieron a lavar con TBS-T 1x.

Revelado.

Para el revelado se utilizó ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). Para ello, se preparó una mezcla de 750ul de reactivo 1 y 750ul de reactivo 2 y acto seguido se añadió sobre los 3 fragmentos de membrana.

Stripping

El stripping se realizó para eliminar de los 3 fragmentos de membrana de PVDF del Western Blot los anticuerpos primarios y secundarios. El objetivo de éste procedimiento es detectar y demostrar la presencia de histona H3. Para ello se pusieron los fragmentos de membrana durante 1 hora a 37°C con el buffer de stripping. Después se añadió el bloqueo durante 7 horas a temperatura ambiente y en movimiento. A continuación se añadió el anticuerpo primario Anti-Histona H3 diluido 1:1000 con el TBS-T 1x al 2% BSA y se dejó en movimiento a 4°C durante toda la noche. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con TBS-T 1x y se añadió el anticuerpo secundario Goat Anti- Rabbit diluido 1:3000. Se dejó actuar durante 1 hora y finalmente se realizaron 2 últimos lavados con TBS-T 1x durante 5 minutos cada uno.

Revelado .

Para el revelado se utilizó de nuevo ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). Se preparó una mezcla de 750ul de reactivo 1 y 750ul de reactivo 2 y acto seguido se añadió sobre los 3 fragmentos de membrana.

RESULTADOS

Cuantificación de histona

La cantidad de proteína histona aislada a partir de cada línea celular se cuantificó en el Nanodrop antes de realizar el Western Blot (Tabla 1).

Línea celular	Concentración histona (ugr/ul)
C26	0.44
Tumor Primario	1.24
Tumor Metastásico	0.38

Tabla 2. Concentración de proteína histona aislada a partir de cada línea celular.

Trimetilación de Histona H3

El análisis realizado mediante Western Blot para estudiar del patrón de trimetilación de los tres residuos de lisina en las 3 líneas celulares fue variable según el aminoácido de lisina y la línea celular estudiados (Fig. 3).

Trimetilación de Histona H3 en Lisina 4 (H3K4me3).

En el análisis de la trimetilación de la Histona H3 para el aminoácido lisina 4 no se encontró ninguna trimetilación en ninguna de las tres líneas celulares estudiadas.

Trimetilación de Histona H3 en Lisina 9 (H3K9me3).

Se observó el mismo patrón de trimetilación del aminoácido lisina 9 para las 3 líneas celulares; C26, tumor primario y tumor metastásico.

Trimetilación de Histona H3 en Lisina 27 (H3K27me3).

El patrón de trimetilación encontrado en el aminoácido lisina 27 fue diferente para las 3 líneas celulares; en C26 y tumor primario se observó presencia de la trimetilación de lisina 27, mientras que en la línea celular metastásica no hubo presencia de la misma.

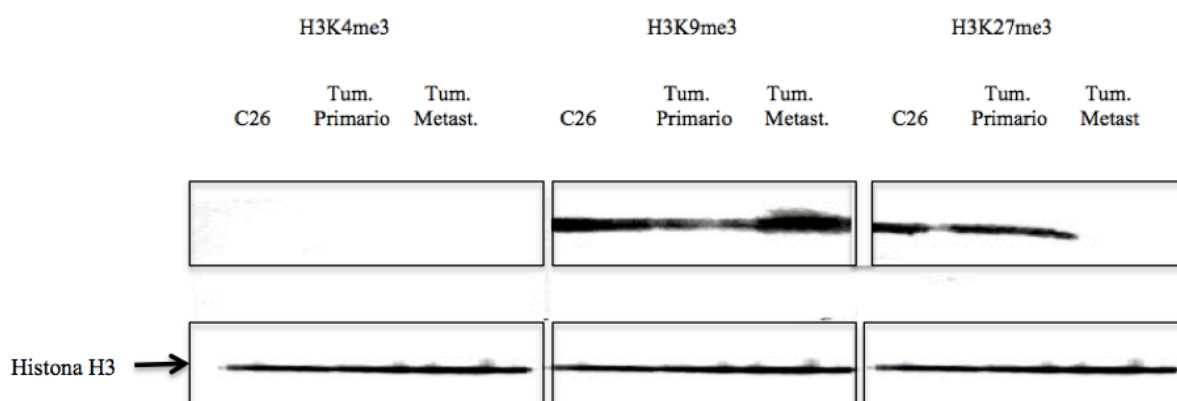


Fig.3. Patrones de trimetilación observados mediante Western Blot en las 3 líneas celulares estudiadas (C26, tumor primario, tumor metastásico) y stripping de Histona H3.

DISCUSIÓN

Las alteraciones epigenéticas como la modificación de histonas juegan un papel importante en la carcinogénesis al estar directamente implicadas en el control de la expresión génica. Las modificaciones covalentes que sufren las histonas remodelan la estructura de la cromatina y permiten o limitan la accesibilidad de los factores de transcripción (10). Las principales dianas de los enzimas histona metiltransferasas son H3K4, H3K9 y H3K27. En el estudio comparativo de las tres trimetilaciones de la histona H3 se observaron diferencias en el patrón de trimetilación según la línea celular y el aminoácido de lisina estudiados: la trimetilación H3K4 no se encontró en ninguna de las 3 líneas celulares, ocurriendo justamente lo contrario para la trimetilación H3K9, que apareció en las 3 líneas celulares. Finalmente, la trimetilación H3K27 fue detectada en las células C26 y células de tumor primario, mientras que en la línea tumoral metastásica no hubo presencia de la misma, siendo este el resultado más interesante tanto en cuanto nos abre las puertas para adentrarnos a fondo en su estudio.

Como se ha dicho anteriormente, las diferentes modificaciones covalentes en los residuos aminoacídicos de la cola de las histonas se relacionan con diferentes complejos protéicos que están directamente implicados en la regulación de la estructura cromatínica y por lo tanto también en la transcripción. Tal es el caso de los complejos protéicos codificados por los genes de los grupos Trithorax y Polycomb (PcG), que actúan activando y reprimiendo la expresión génica respectivamente.

Los productos de Polycomb forman complejos multiprotéicos que contribuyen al silenciamiento génico mediante cambios en la cromatina. En concreto, el complejo 2 represor de polycomb (PRC2) está implicado en el inicio del silenciamiento génico; contiene enzimas histonas metiltransferasas que añaden grupos metilo a H3K9 y H3K27, ambos marcadores de silenciamiento génico (15).

Al contrario de lo que ocurre con H3K9 y H3K27, H3K4 está asociada a expresión génica. H3K4me3 parece estar relacionada con un descenso en la malignidad del cáncer gástrico (13) y altos niveles de H3K4me2 en pacientes con metástasis hepática se asocian también con aumento en la esperanza de supervivencia a la enfermedad (16). Sin embargo, en el modelo murino de CCR con metástasis hepática aquí estudiado, no se ha detectado H3K4me3 en ninguna de las líneas celulares, lo cual podría ser un indicador de la elevada agresividad de las líneas celulares tumorales estudiadas.

Como se ha dicho anteriormente, no se han encontrado diferencias en H3K9me3 entre las 3 líneas celulares estudiadas, siendo diferente el caso de la H3K27me3. Esta trimetilación se ha encontrado en las líneas celulares C26 y tumor primario, mientras que no se ha detectado en las células metastásicas. En el carcinoma de próstata, los niveles de H3K27me2 son más bajos en las células metastásicas que en las células localizadas en el tumor original (17). Este mismo patrón se ha observado en las células metastásicas hepáticas respecto a las células tumorales primarias del colon (15). La metilación de la lisina 27 en la histona H3 está asociada con represión de la transcripción. Por lo tanto, el hecho de que las células metastásicas tengan una menor cantidad de genes transcripcionalmente reprimidos, podría causar la adquisición de características genéticas que a su vez imprimen sobre estas células la capacidad de intravasación, extravasación, proliferación y consiguiente formación de la masa metastásica. Serían por tanto caracteres que otorgan a las células metastásicas una mayor capacidad proliferativa, mayor resistencia y adaptación al medio en comparación con las células tumorales primarias.

De esta manera, según la hipótesis planteada en el trabajo, se han encontrado diferencias significativas entre los tumores primarios y los tumores metastásicos en el patrón de trimetilación de la histona H3. Estas diferencias aparecen en la H3K27me3, mientras que para la H3K4me3 y H3K9me3 no se detectan variaciones.

En cuanto a los resultados obtenidos para la H3K27, sería de gran interés realizar un estudio comparativo más profundo, que permita dilucidar qué genes son transcripcionalmente activos en las células tumorales metastásicas y no lo son en las células tumorales primarias. Para ello, el siguiente paso que se propone es emplear técnicas de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), de tal manera que mediante el uso del mismo anticuerpo utilizado en el Western Blot (Anti H3 trimethyl K27) se detecte la H3K27me3 y consecuentemente también el DNA asociado. Tras realizar la precipitación, mediante secuenciación podrían identificarse el o los genes que presentan diferencias transcripcionales entre las células que conforman el tumor primario y las células que conforman el tumor metastásico. Así mismo, la realización de investigaciones que permitan desgranar los pasos implicados en el proceso de modificación covalente de las histonas otorgarían una idea más clara y global de cómo y porqué se producen dichas modificaciones en lugares y condiciones determinadas. Esto generaría una perspectiva más amplia en el campo de la regulación epigenética de los genes y por lo tanto también en la posibilidad de desarrollar tratamientos dirigidos, más eficaces y menos agresivos que consigan hacer frente a una enfermedad como es el cáncer.

En conclusión, la implicación de la epigenética en la regulación celular está presente en las células sanas y también en las células enfermas. Tal es el caso del CCR, donde diferentes alteraciones epigenéticas, y concretamente alteraciones en el patrón de modificaciones covalentes de las histonas están directamente implicadas en la aparición y progresión de la enfermedad. La forma más agresiva de la enfermedad va acompañada por la metastatización de las células, y las respuestas a por qué dichas células tienen esta capacidad de migrar, podrían encontrarse con gran seguridad en el campo de la epigenética.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) A. Jemal, DVM, PhD; R.Siegel, MPH; E.Ward, PhD;Y. Hao, PhD; J. Xu, MD; T. Murray; J.Thun, MD, MS “Cancer Statistics”CA Cancer J Clin 2008;58:71–96.) American Cancer Society,Volume 58, Number 2 (2008)
- 2) L. Migliore, F. Migheli, R. Spisni, F. Copede.“Genetics, Cytogenetics, and Epigenetics of Colorectal Cancer” Review Article 2010. Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011, Article ID 792362, 19 pages doi:10.1155/2011/792362 (2010).
- 3) Folkman J. “The role of angiogenesis in tumor growth”. Semin. Cancer biol. 1992; 3, 2, 65-71
- 4) Konstantinos A. Paschos, D.Canovas, Nigel C. Bird “The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis”. Cellular Signalling (2009).
- 5) Konstantinos A Paschos, A. Majeed, Nigel C. Bird “Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer - pathobiological pathways with clinical significance”World J Gastroenterology. (2014).
- 6) Jones, P. A. and Baylin, S. B.”The fundamental role of epigenetic events in cancer”. Nat. Rev., 3, 415–428 (2002)
- 7) Z. Herceg. “Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors”. Mutagenesis vol. 22 no. 2 pp. 91–103, 2007 doi:10.1093/mutage/gel068 Advance Access Publication (2007)
- 8) T.Jenuwein C. David Allis “Translating the Histone Code”Vol 293 Science (2001)
- 9) D. Strahl, C. D. Allis. “The language of covalent histone modifications” Nature. Vol 403 (2000)

- 10) A.H. Lund M. van Lohuizen "Epigenetics and cancer" *Genes & development* 18:2315–2335 (2014)
- 11) Y.Yokoyama, M. Hieda, Y. Nishioka, A. Matsumoto, S. Higashi, H. Kimura. "Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo". *Cancer Sciences*. Volume 104. Number 7. (2013).
- 12) Jia-Yi Yao, L.Zhang, Xin Zhang, Zhi-Ying He "H3K27 Trimethylation Is an Early Epigenetic Event of p16^{INK4a} Silencing for Regaining Tumorigenesis in Fusion Reprogrammed Hepatoma Cells". *Journal of biological chemistry*. Volume 285 Number 24 (2010)
- 13) L. Li, L.Wang, P. Song, X. Geng, X. Liang, M. Zhou, Y. Wang, C. Chen, J. Jia Jiping Zeng. "Critical role of histone demethylase RBP2 in human gastric cancer angiogenesis" *Molecular Cancer*. (2014)
- 14) D. Shechter, H. L. Dormann, C.D. Allis "Extraction, purification and analysis of histones". *Nature protocols*. Vol.2 no.6 (2007)
- 15) H. Tamagawa , T. Oshima , M. Numata , N. Yamamoto , M. Shiozawa , S. Morinaga , Y. Nakamura , M. Yoshihara , Y. Sakuma , Y. Kameda , M. Akaike , N. Yukawa Y. Rino , M. Masuda , Y. Miyagi "Global histone modification of H3K27 correlates with the outcomes in patients with metachronous liver metastasis of colorectal cancer." *EJSO* 39 (2013) 655e661
- 16) H.Tamagawa H, Oshima T, Shiozawa M, et al. The global histone modification pattern correlates with overall survival in metachronous liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2012;27(3):637–42.
- 17) J.Ellinger, P. Kahl, C. Mertens, S. Rogenhofer, S. Hauser, W. Hartmann, P. J. Bastian, R. Büttner, S.C. Müller and A. von Ruecker. "Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma". *Int. J. Cancer*: 127, 2360–2366 (2010) VC 2010 UICC

18) P.Cheung, C. David Allis, P. Sassone-Corsi “Signaling to Chromatin through Histone Modifications”. *Cell*, Vol. 103, 263–271 (2000).

