

Universitat de Barcelona
Departament de Genètica

ALTERACIONS EPIGENÈTIQUES EN EL CÀNCER COLORECTAL



Jordi Frigola Mas

Juliol 2005



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Alteracions epigenètiques en el càncer colorectal

Memòria presentada per
Jordi Frigola Mas

per optar al grau de
Doctor en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Miquel Àngel Peinado
a l'Institut de Recerca Oncològica.

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia.
Programa de Genètica, bienni 1999-2001.

Tutora: Dr. Florenci Serras.

Miquel Àngel Peinado

Florenci Serras

Jordi Frigola

Barcelona, maig de 2005

**Per anar on no se sap
s'ha d'anar per on no se sap**

Sant Juan de la Cruz

A l'Anna

Als meus pares

Al meu germà i la Vàlia

La vida és un viatge. Un trajecte on tan sols estan definits l'inici i el final; la resta, qui ho sap? Uns diuen que depèn de l'atzar, d'altres del destí; jo, francament, no ho sé. Sigui el que sigui, està clar que cadascú, amb el pas del temps, es va fent el seu propi camí, el seu propi viatge de la vida.

Des d'un punt de vista acadèmic, la tesi representa un punt i a part. Per tant, crec que és un bon moment per mirar enrere i agrair al destí o a l'atzar, tant se val, l'oportunitat de conèixer-vos a tots i a cadascú de vosaltres. A tots plegats aquesta tesi us deu alguna cosa. De la mateixa manera que quan viatges les emocions omplen el buit de les imatges, vosaltres ompliu el buit d'aquestes paraules.

El tret de sortida el va marcar el dia que vaig escollir la meua família. No va ser una decisió atzarosa, sinó més aviat premeditada. Ells representaven i són la millor família que podia desitjar. Ells em donen la força i seguretat necessàries per seguir fent camí. La força, a partir del seu exemple; la seguretat, amb el seu origen en l'essència de la vida. Els vincles entre pares i fills, o bé entre germans, són irracionals, poc científics, massa intensos per ser descrits amb paraules.

Fer camí significa conèixer nous llocs, noves persones. Tanmateix, hi ha certs moments en la vida que un desitja tornar al lloc de sempre, envoltar-se de l'entorn més conegut, aquell on un va passar els primers anys de la seva vida. Els amics, la colla, per mi són un autèntic refugi. He tingut la sort de mantenir l'amistat amb companys amb els quals vàrem començar a anar a l'escola junts. Amb ells vaig compartir una de les etapes més especials de la vida, l'adolescència. Amb el pas del temps, del tronc han brotat noves branques, camins diferents amb un origen comú. Ells són un regal de la vida, un dels tresors que m'estimo més.

L'etapa de Biologia a Girona la recordo tèbia. No és així, pel que respecta a les activitats extraacadèmiques. Les cartes em varen presentar en Josep i la Marisa, i després de repartir-ne a milers, ens ha quedat una amistat entranyable. Durant aquest temps, vaig conèixer en Xavi d'Arenys. Ell em va ensenyar la part més tendra i dolça de la costa. Atributs clarament personals i únics, que es fan estimar. Si bé les classes eren tèbies, les partides de botifarra cremaven. Així ens vàrem conèixer amb en Narcís. A Girona vàrem compartir algunes manilles i de tant en tant algun canari; tanmateix no va ser fins que vàrem anar a estudiar Bioquímica a l'Autònoma on realment ens vàrem descobrir mútuament. La seva lleialtat i noblesa varen fer de la nostra amistat el millor record de l'etapa autonòmica, i a ella li dec un amic dels que es poden comptar amb els dits d'una mà.

Inconscientment, l'etapa de Bioquímica em va determinar dos aspectes clau de la meua vida, que més tard m'ensenyarien que la intel·lectualitat i la irracionalitat no són oposades, sinó complementàries.

El primer va sorgir amb l'oportunitat d'anar a Mèxic. Aquí vàrem conèixer els nostres amics de l'ànima, en Mikel i la Iratxe. Possiblement, amb ells hem compartit un dels moments més intensos de les nostres vides. Conjuntament vàrem descobrir una de les cares més abandonades de la nostra condició humana, l'espiritualitat, en un sentit ampli d'aquesta paraula.

El segon camí va ser el lab MAP. Gràcies a les pràctiques d'estiu, vaig tenir la gran sort de conèixer el grup d'en Miquel Àngel Peinado (MAP). La sort en aquest sentit va ser doble, tant per part d'en MAP, com per la resta de gent del laboratori. Començaré pel despatx que hi ha en diagonal a la meua "poyata". A dins hi treballa en MAP, envoltat de papers i estris antics, que tan sols ell sap perquè serveixen. Tenir-lo de director de tesi crec que és un autèntic privilegi, i explicaré el perquè: per una banda, saps que està darrere teu i que, quan el necessitis, tant se val el moment o el motiu, et donarà un cop de mà i, per l'altra, sap donar-te la llibertat i confiança necessàries a l'hora de treballar; en definitiva, el que tens són unes condicions immillorables de treball. Si a aquesta situació li afegeixes sentit de l'humor, intel·ligència i disponibilitat, al final és quan t'adones que ets un autèntic privilegiat. Personalment, crec que aquesta situació de privilegi només és possible quan darrere del director científic s'hi amaga una persona amb una condició humana excepcional.

Igual d'excepcional ha estat coincidir al llarg d'aquests anys amb la resta de membres del lab. A la meua dreta, la Mar. Una treballadora inesgotable i un cul inquiet que sempre n'està pensant alguna. Una mica més enllà la Gemmix, la persona que més m'ha ajudat en el lab. Ella ha estat per mi un autèntic manual de supervivència. Cal recordar que, quan vaig aterrar al lab, jo era l'únic integrant del sexe masculí. No em puc imaginar què hauria estat de mi sense les seves lliçons magistrals que tant em varen ajudar a entendre l'entorn femení. Just davant meu, la "poyata" d'en JR. Un gran company de "poyata", amb el qual he tingut la sort de compartir un mateix tema de treball i unes mateixes inquietuds científiques. La distància d'Austràlia i la proximitat de Hawaii ens han conduït a una gran relació d'amistat personal. Al costat d'en JR, l'Elena. La infiltrada de la bota, que sempre que pot ens fa dentetes d'alguna illa perduda en el mar. I al costat de l'Elena, l'Eli, amb la qual he tingut la gran sort de compartir tot el doctorat. Una amiga divertida i sincera, amb l'estranya virtut de parlar sempre amb el cor a la mà i a l'hora tenir una ànima blanca, absent de negativitat. Darrere meu, la "poyata" de la Regi, l'últim fitxatge de l'equip. Amb ella hem coincidit

poc temps i des d'aquestes paraules li desitjo tot el millor. Al costat de la Regi, la Cris. Amb ella hem compartit l'afició a l'esport i, de manera destacada, al Barça. La seva tenacitat i perseverança segur que la conduiran a un final feliç. A les taules baixes de més enllà, i només de tant en tant, en PJ, un romàntic enamorat de la vida. Amb ell hem viscut moments extraordinaris, entranyables. Les seves incursions al lab sempre han estat d'una gran ajuda, alenades d'aire fresc. En aquesta descripció del lab, hi falta un personatge clau, en el despatx del fons, amb les ulleres a mig nas i llegint algun article: la Marieta, personatge a qui tant jo com aquesta tesi li devem moltíssim. Els seus savis consells, tant en el contingut com en la forma, han estat determinants en el resultat final d'aquest treball. Per això, crec que l'ànima d'aquesta tesi sempre estarà en deute amb ella. Com que en el fons l'evolució que segueixen els nostres actes no són més que la nostra evolució personal, tan sols puc dir-te que sempre estaràs present; i gràcies per tot.

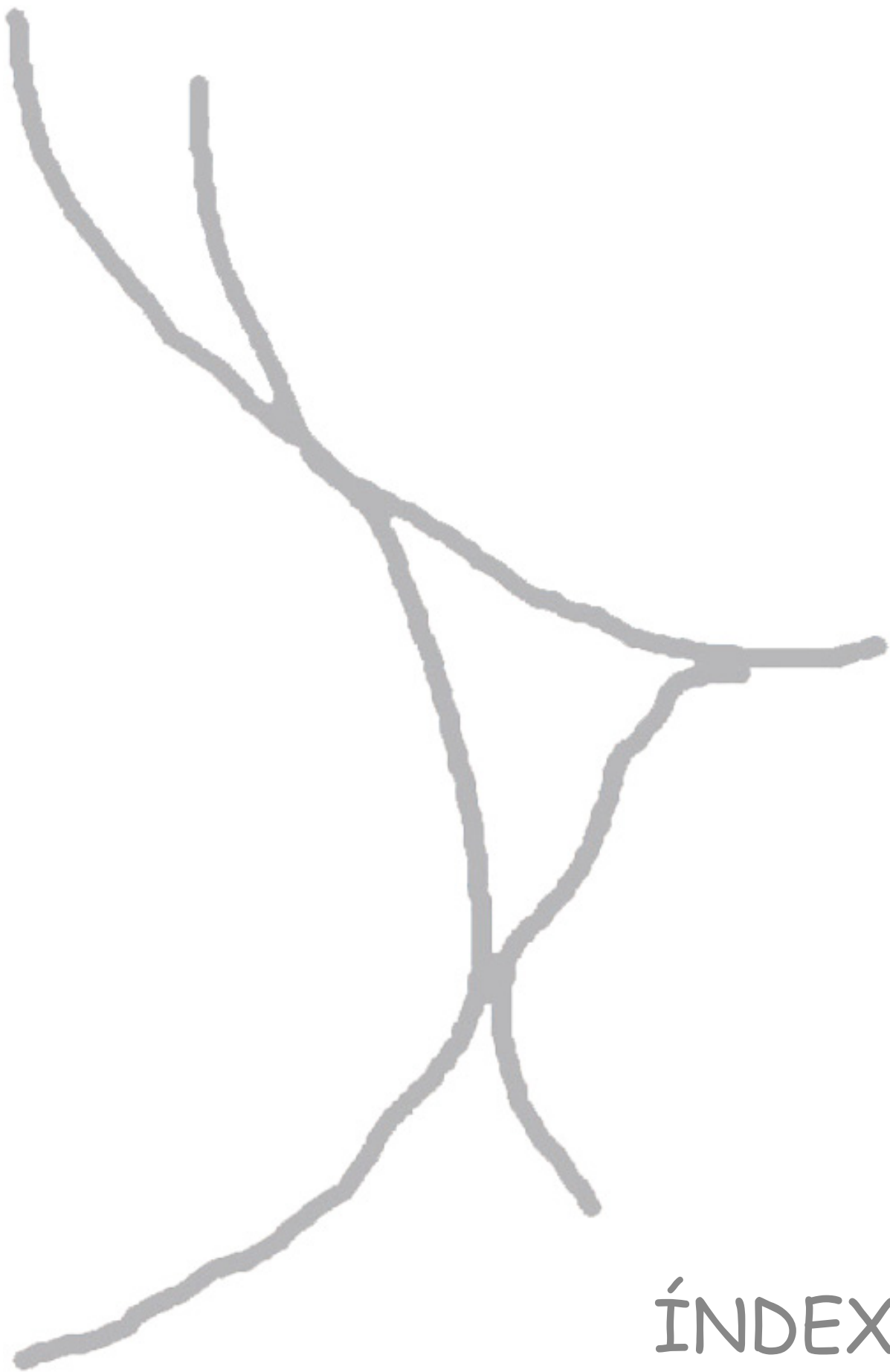
Just a sota la meva "poyata", i a milers de quilòmetres enllà, hi ha el lab de la Sue. A ells els dec una experiència professional i personal increïble. És l'avantatge d'estar fora de casa, on la intensitat de les coses bones i dolentes es multiplica per deu i el resultat final és un record meravellosament dolç. Sé que no vaig aterrar al seu lab en el millor moment però, malgrat tot, sempre em vaig sentir recolzat, fins i tot m'atreviria a dir mimat. Amb el suport incondicional de la Sue, l'ajuda inestimable del membres del seu grup i una idea descabellada planejant pels nostres caps va ser possible passar de la Z a 2q14.2. Conèixer-vos i treballar amb vosaltres ha estat un altre regal de la vida, una d'aquelles sorpreses que les recordes amb noms i cognoms.

A la resta de companys d'altres laboratoris (ICO, COM, Genètica i Clínic), us vull agrair aquell somriure compartit, aquell cop de mà necessari en un moment determinat (especialment a l'Antònia) o, senzillament, el bon dia al matí, imprescindible per començar amb bon peu la jornada. De l'Autònoma, m'agradaria donar les gràcies a la Rosa, primer per acceptar-me com a becari i segon, per donar-me un cop de mà amb la qüestió del paperam, on més d'una vegada, si no hagués estat per ella, faria temps que hauria perdut la beca. No puc oblidar-me de fer una menció a la importantíssima tasca que estan realitzant els nostres companys de D-recerca i per extensió *Precarios*, en la dignificació dels primers estadis de la nostra professió. Gràcies per seguir creient en què una altra situació és possible.

Els viatges, com la vida, si no tenen una raó de ser, no deixen de ser accions buides, absents de sentit. Una quantes anys enrere, el destí em va presentar l'Anna. A causa de la seva importància i empremta en el meu camí, francament se'm fa difícil pensar que va ser qüestió d'atzar. D'ella no en puc destacar cap aspecte determinat, sinó tot

Fent camí

en general. La seva manera de ser, de fer i d'estimar, amb el pas del temps, no han fet més que omplir de felicitat i donar sentit a aquest viatge que és la vida.



ÍNDEX

PRESENTACIÓ	1
ABREVIATURES	3

INTRODUCCIÓ

1 Càncer.	
1.1 Què és el càncer ?	5
1.2 Com es dóna el càncer ?	6
1.3 Qui origina els canvis en una cèl·lula tumoral ?	8
2 Metilació genòmica.	
2.1 Característiques generals.	10
2.2 Concepte d'illa CpG.	12
2.3 Funcions de la metilació de l'ADN.	13
2.4 Inactivació del cromosoma X.	15
2.5 Mecanisme d' <i>imprinting</i> .	17
3 Tècniques d'anàlisi de la metilació genòmica.	18
4 Estudis globals dels canvis de metilació genòmica associats al procés tumoral.	21
5 Hipometilació del càncer.	
5.1 Descripció general.	23
5.2 Mecanismes de contribució de la hipometilació en el càncer.	24
6 Hipermetilació del càncer.	
6.1 Característiques generals.	29
6.2 Mecanismes de silenciament.	32
6.3 Implicacions translacionals.	34

7 Altres mecanismes epigenètics.

7.1	Definició d'epigenètica.	36
7.2	Grups Polycomb-Tritorax.	37
7.3	Modificacions de les histones.	38
7.3.1	Acetilació de les histones.	40
7.3.2	Metilació de les histones.	41
7.3.3	Remodeladors de la cromatina dependents d'ATP.	42
7.3.4	Variants d'histones.	42
7.4	Inestabilitat epigenètica ?	43

OBJECTIUS

RESULTATS

Capítol 1.	<i>Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS).</i>	47
Capítol 2.	<i>Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer.</i>	55
Capítol 3.	<i>Age-dependent association of DNA hypomethylation with cumulated genomic damage and tumor aggressiveness in human colorectal cancer.</i>	64
Capítol 4.	<i>Hypermethylation of the prostacyclin synthase (PTGIS) promoter is a frequent event in colorectal cancer and associated with aneuploidy.</i>	83
Capítol 5.	<i>DNA hypermethylation in cancer: Beyond the boundaries of the CpG island.</i>	104
Capítol 6.	<i>Chromatin remodelling and DNA methylation results in co-ordinate gene suppression across the entire human chromosome 2q14.2 in colorectal cancer .</i>	122

DISCUSSIÓ

EPIGENÈTICA EN EL CONTEXT CEL·LULAR.

Múltiples funcions de la cromatina.	148
Múltiples estats cromatínics.	148
Principals protagonistes dels canvis cromatínics.	149
Com actuen aquests protagonistes ?	151
Paper de la metilació genòmica en el context epigenètic.	154

EPIGENÈTICA EN EL CONTEXT TUMORAL.

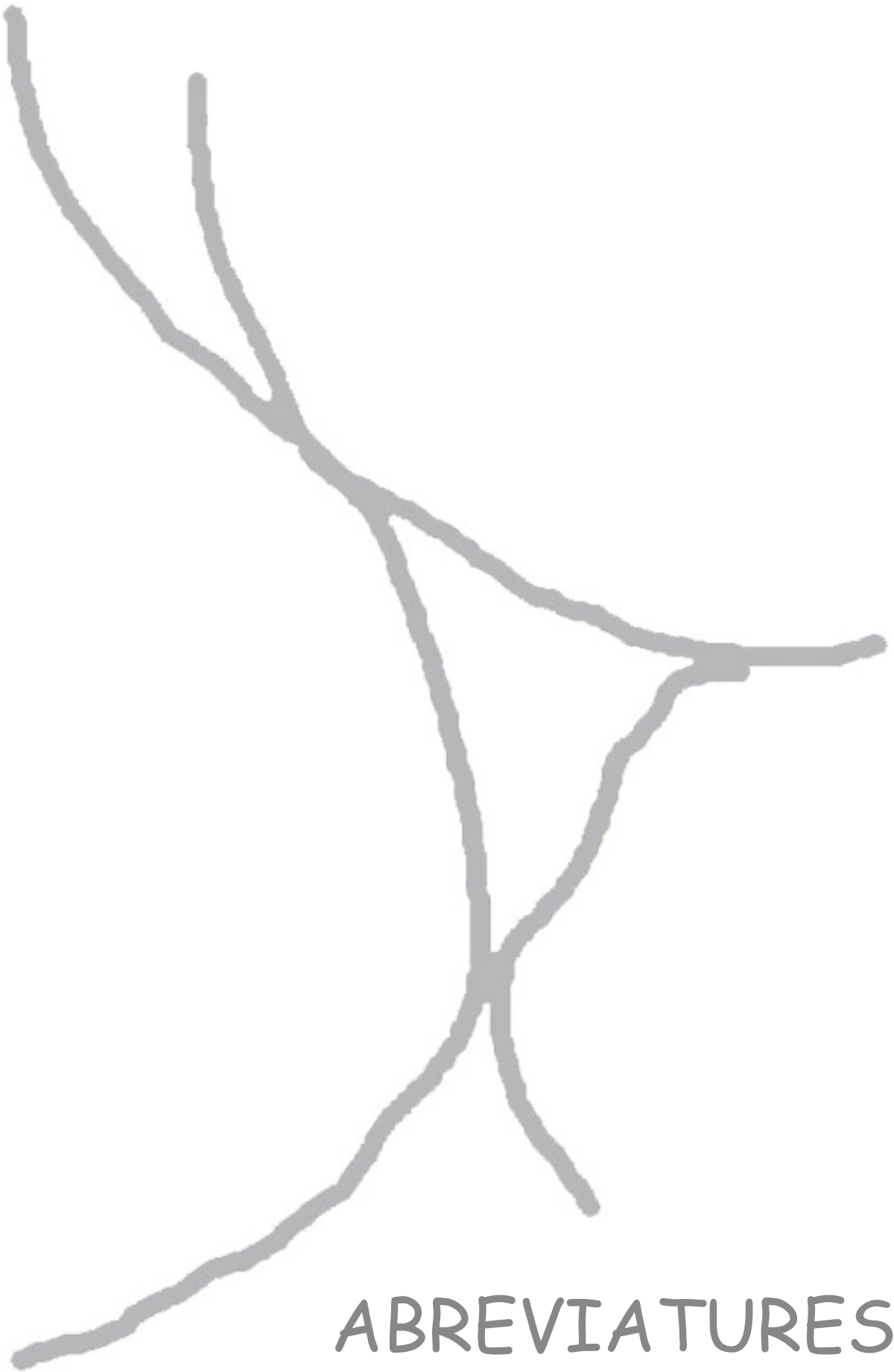
De la Z a 2q14.2.	
Definició.	156
Conseqüències.	157
Possibles causes.	158
Revisió d'alguns canvis epigenètics associats al procés tumoral.	
Guanys i pèrdues globals.	160
Hipermetilació.	161
Hipometilació.	163
Epigenètica, envelliment i càncer.	165

CONCLUSIONS	167
--------------------	-----

APÈNDIX

Apèndix 1. Metilació genòmica i envelliment.	168
---	-----

BIBLIOGRAFIA	172
---------------------	-----

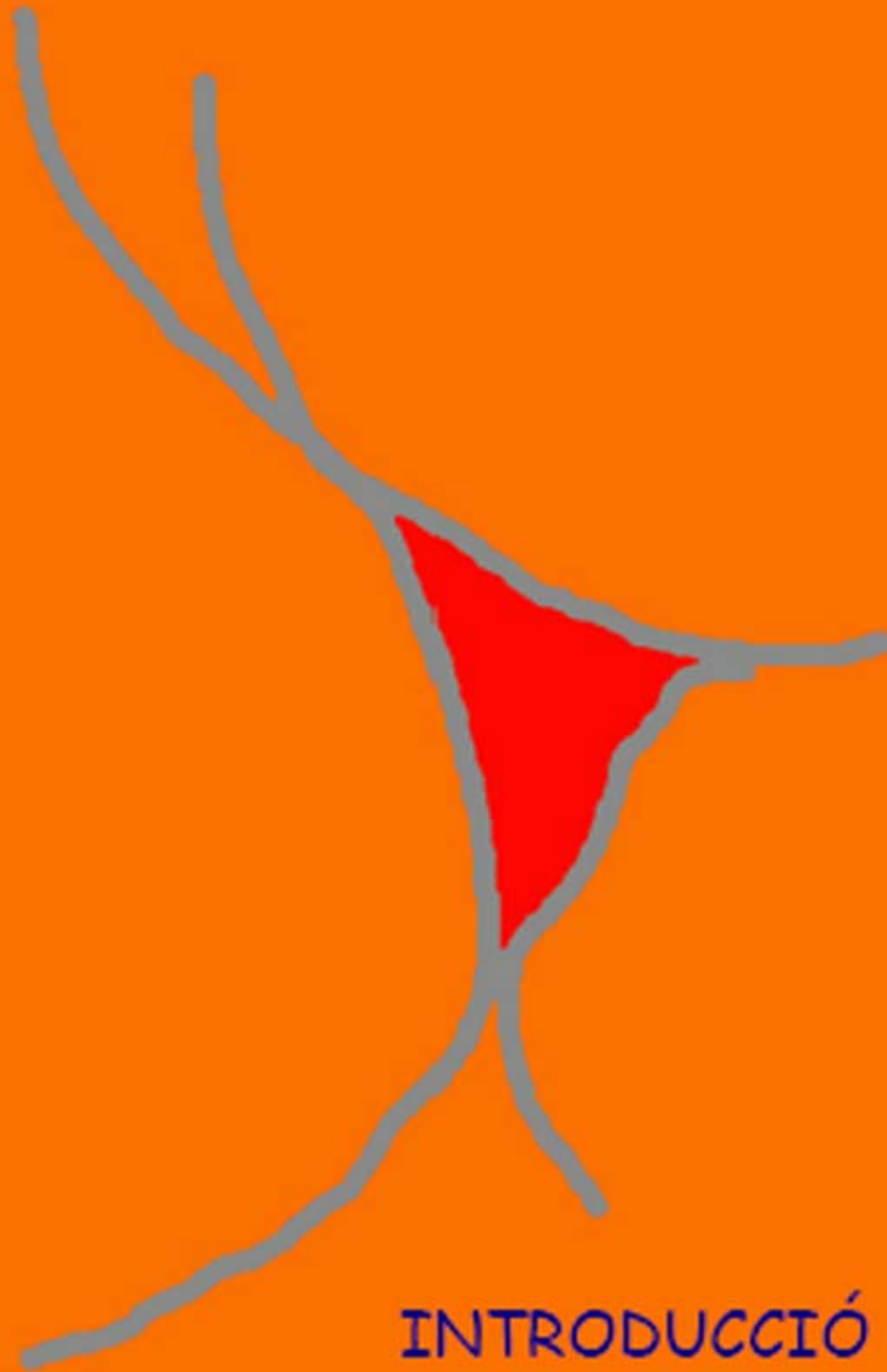


ABBREVIATURES

ABREVIATURES

5-aza-CdR	5-aza-2'-desoxicitidina
5-aza-CR	5-azacitidina
5mC	5-metilcitosina
A	adenina
ADN	àcid desoxiribonucleic
AIMS	<i>amplification of intermethylated sites</i>
APC	<i>adenomatosis polyposis coli</i>
AP-PCR	<i>arbitrarily primed-PCR</i>
ARN	àcid ribonucleic
ARNds	ARN de doble cadena
ARNi	ARN de interferència
ATRX	síndrome de la alfa talasemia i retràs mental lligat al cromosoma X
BRCA1,2	<i>breast cancer 1/2, early onset</i>
C	citosina
CCND2	<i>cyclin D2</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2D	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2D</i>
ChIP	immunoprecipitació de cromatina
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
DDM1	disminució de la metilació d'ADN 1
DDX18	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18</i>
DMH	<i>differential methylation hybridization</i>
DNMT	metiltransferasa d'ADN
DNMT1,3a,3b	metiltransferasa d'ADN 1, 3a, 3b
EN1	<i>engrailed homolog 1</i>
EZH2	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
G	guanina
GLI2	<i>GLI-Kruppel family member GLI2</i>
GST	gen supressor de tumors
H3,H4	histone H3, histona H4
H3K9,K27,K4,K20	histona H3 lisina 9, lisina 27, lisina 4, lisina 20
HAC	<i>histone acetylases</i>
HDAC	<i>histone deacetylases</i>
HERV	retrovirus endògens humans
HMT	metiltransferasa de histones
HP1	proteïna heterocromàtica 1
HPLC	cromatografia líquida d'alta pressió
HRAS	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
IAP	<i>intracisternal A particle</i>
ICF	síndrome <i>immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies</i>
INHBB	<i>inhibin, beta B (activin AB beta polypeptide)</i>
INSIG2	<i>insulin induced gene 2</i>
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>

LINE	<i>long-terminal interspersed elements</i>
LOH	pèrdua d'heterozigositat
LSH2	<i>lymphocyte-specific helicase 2</i>
LTR	repetició terminal llarga
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
Mb, kb, pb	megabase, kilobase, parell de bases
MBD	proteïna d'unió a CpG metilats
MBD1,2,3,4	proteïna d'unió ADN metilat 1,2,3,4
MCA	<i>methylated CpG island amplification</i>
mCpG	metilCpG
MeCP2	proteïna d'unió a metilCpG 2
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MLH1	<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)</i>
MMR	<i>mismatch repair system</i>
MS-AP-PCR	<i>methylation-sensitive arbitrarily primed PCR</i>
MS-RDA	<i>methylation-sensitive-representational difference analysis</i>
MSRF	<i>methylation-sensitive restriction fingerprinting</i>
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
NER	<i>nucleotid excision repair system</i>
PcG	complex proteic <i>Polycomb</i>
PEV	<i>position effect variegation</i>
PRC 1,2	complex repressiu de <i>Polycomb 1,2</i>
PSCG	<i>Proliferation associated SNF-2-like gene</i>
PTGIS	sintasa de prostaciclina
PTPN4	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4</i>
RALB	<i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B</i>
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i>
Rb	retinoblastoma
RdDM	metilació de l'ADN dirigida per ARN
RLGS	<i>restriction landmark genomic scanning</i>
S100A4	<i>S100 calcium binding protein A4</i>
Sat 2	sàtel·lit 2
SCTR	<i>secretin receptor</i>
SERPINB5	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5</i>
SINE	<i>short interspersed elements</i>
STK11	<i>serine/threonine kinase 11</i>
T	timina
THBS1	<i>thrombospondin 1</i>
TIMP3	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
tRNA	ARN de transferència
TrxG	complex proteic <i>Tritorax</i>
TSA	tricostatina A
TSN	<i>translin</i>
UV	llum ultraviolada
Xic	<i>X-inactivation centre</i>
Xist	<i>X-inactive specific transcript</i>



INTRODUCCIÓ

1 CÀNCER

1.1 Què és el càncer?

El cos d'un ésser humà, des d'un punt de vista ecològic, pot ser vist com un ecosistema en el qual els individus són les cèl·lules. Es reproduïxen per divisió cel·lular i s'organitzen en teixits. En el manteniment d'aquests teixits, les principals preocupacions són molt semblants a les que pot tenir un ecòleg estudiant un determinat ecosistema: naixement d'individus o cèl·lules, morts, hàbitats, limitacions territorials, manteniment de la mida de les poblacions, etc. L'ésser humà és una societat de cèl·lules governada per unes normes establertes al llarg de bilions d'anys d'evolució. Els membres cel·lulars d'aquesta societat són altament altruistes: pel bé col·lectiu, són capaços d'alentir o de perdre la seva capacitat proliferativa o, fins i tot, de suïcidar-se.

Mutació, competició i selecció natural dins d'una població somàtica són els ingredients bàsics del càncer, malaltia en la qual les cèl·lules mutants individuals proliferen a expenses de les cèl·lules veïnes, provocant, al final, el col·lapse de tota la societat o organisme. Donat que el preu que es paga per aquesta individualitat és molt elevat, al llarg de l'evolució els animals han anat creant sistemes de protecció que vetllen per l'ús i la validesa de les normes socials.

Durant el darrer quart de segle, la recerca en el càncer ha generat una enorme quantitat d'informació i l'ha mostrat com una malaltia que comporta canvis dinàmics en el genoma humà. Actualment, són moltes les evidències que assenyalen el procés tumoral com un procés amb múltiples etapes, on cadascuna reflecteix les alteracions genètiques que condueixen la transformació progressiva de les cèl·lules normals a derivats cel·lulars cada cop més malignes. S'ha demostrat que tot aquest conjunt d'etapes és necessari per trencar els múltiples sistemes de protecció que regulen la proliferació i l'homeòstasi cel·lular. La descripció detallada d'aquests sistemes de control manifesta una enorme complexitat molecular subjacent, que s'ha vist multiplicada per l'elevat grau d'interrelació entre els diferents sistemes moleculars. Per tant, la comprensió dels sistemes de control cel·lular no només es basa en la identificació dels diversos components de cada sistema, sinó que també fa falta caracteritzar aquelles interaccions que modifiquen la resposta final en vies de senyalització específiques.

Si comparem una cèl·lula normal amb una cèl·lula tumoral, aquesta darrera sembla un autèntic orgue de gats. La simfonia orquestrada de la cèl·lula normal s'ha transformat

en un galliner: gens inactivats, cromosomes extres i/o perduts, múltiples alteracions genètiques i epigenètiques, etc. Davant d'aquest desgavell general, ens fem dues preguntes clau: (1) com s'han donat aquests canvis? i (2) qui els ha provocat?

1.2 Com es dona el càncer?

En altres paraules, podem establir unes normes generals que governin el procés de transformació de les cèl·lules humanes normals, cap el desgavell general d'una cèl·lula tumoral? Al llarg de les últimes tres dècades, s'han proposat diverses hipòtesis com a resposta a aquesta pregunta; de totes elles, m'agradaria destacar-ne dues: una primera, situada en un context més cel·lular i formulada per Hanahan i Weinberg (2000); i una segona, en aquest cas en un context més genètic, plantejada per Vogelstein i Kinzler (2004).

Els primers autors justifiquen la seva simplicitat a partir dels aprenentatges en la biologia cel·lular. Aquests ens han ensenyat que virtualment totes les cèl·lules de mamífers porten la mateixa maquinària molecular per regular la proliferació, diferenciació i mort cel·lular. Els autors suggereixen que la gran quantitat de canvis en la cèl·lula tumoral són la manifestació de sis alteracions essencials en la fisiologia cel·lular: autosuficiència en senyals de creixement, insensibilitat als senyals inhibitoris del creixement, insensibilitat a la mort cel·lular programada (apoptosi), potencial replicatiu il·limitat, manteniment de l'angiogènesi i invasió tissular i metàstasi (Figura 1).

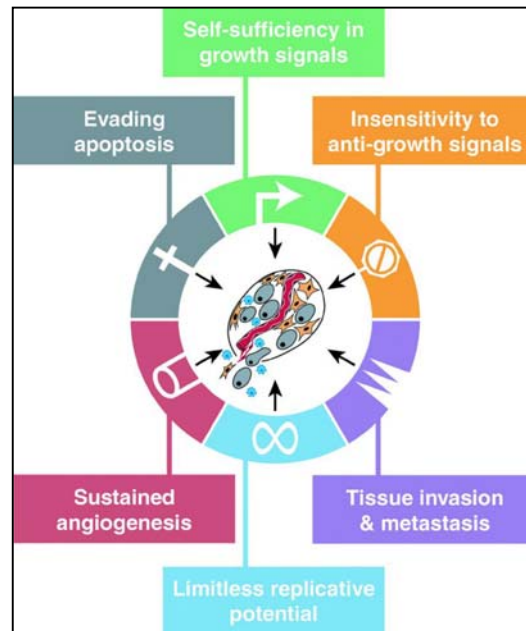


Figura 1. Capacitats adquirides del càncer. La majoria de càncers han adquirit les mateixes capacitats funcionals al llarg del seu desenvolupament, a través de diferents estratègies mecanicistes.

Extret de Hanahan i Weinberg, 2000.

Cadascun d'aquests canvis fisiològics adquirits per la cèl·lula tumoral representa el trencament d'algun dels mecanismes de defensa social anteriorment esmentats (vegeu l'apartat 1.1).

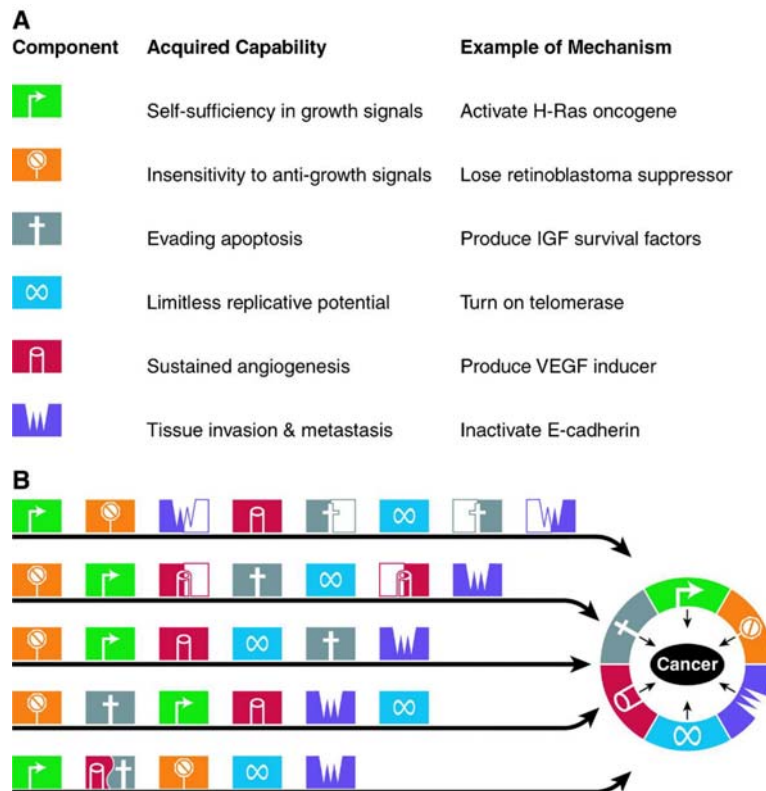
Els camins pels quals les cèl·lules normals esdevenen malignes són molt variables. L'adquisició d'aquestes noves capacitats biològiques pot produir-se a temps diferents

(Figura 2), tant en tumors d'un mateix tipus com d'origens diferents. En qualsevol cas, independentment de com s'adquireixen aquests canvis, les seves conseqüències biològiques finals són compartides per tots els tipus diferents de càncer. La descripció de cadascuna d'aquestes capacitats, així com la seva importància funcional i les estratègies per les quals són adquirides, es pot trobar en el treball original (Hanahan i Weinberg, 2000).

Figura 2.

(A) Vies paral·leles de tumorigènesi. Mentre que la majoria de tumors han adquirit les mateixes capacitats específiques: autosuficiència en senyals de creixement, insensibilitat en senyals d'aturada del cicle cel·lular, etc.

(B) La manera d'aconseguir-ho pot ser molt variable, tant a nivell mecanístic com cronològic. Extret de Hanahan i Weinberg, 2000.



En la segona proposta, Vogelstein i Kinzler destaquen que, a diferència d'altres malalties genètiques, el càncer no es pot atribuir al defecte d'un sol gen. Els múltiples mecanismes de defensa, presents en mamífers, impliquen que només quan s'alteren diferents gens és possible el desenvolupament del càncer. Els autors defensen que hi ha tres grans grups de gens responsables del procés tumoral: oncogens, gens supressors de tumors (GST) i gens estabilitzadors. En els oncogens la seva mutació implica una expressió constitutiva o activa en determinades circumstàncies; circumstàncies en les que el gen normal no ho estaria. Generalment, una mutació somàtica activadora en un dels al·lels és suficient per adquirir un avantatge en el creixement cel·lular. En el sentit oposat, tenim els GST. En aquest cas la mutació redueix el producte gènic. Normalment, es necessita la mutació dels dos al·lels per tal de conferir un avantatge selectiu. Tanmateix, s'ha descrit que en algun GST la mutació

d'un sol al·lel ja ofereix un avantatge selectiu, és a dir, haploinsuficiència (Santarosa i Ashwoth, 2004).

Els oncogenes i GST operen a nivell fisiològic de la cèl·lula, la qual cosa vol dir que contribueixen al procés tumoral tot augmentant el nombre de cèl·lules tumorals a través de l'estimulació de la divisió cel·lular o la inhibició de l'apoptosi o esquivant els diferents controls del cicle cel·lular. Els gens estabilitzadors promouen el procés tumoral en un sentit completament diferent. Aquests mantenen els nivells d'alteracions genètiques el més baixos possible. Per tant, la seva inactivació accelera l'acumulació d'alteracions genètiques, que poden afectar tots els gens. Tanmateix, només les alteracions que afectin els oncogenes i GST conferiran avantatges selectius en el creixement de la cèl·lula mutada. Igual que en el cas dels GST, en els gens estabilitzadors s'accepta que ambdós al·lells han d'estar mutats per conferir avantatges selectius.

1.3 Qui origina els canvis en una cèl·lula tumoral?

Considerant la poca freqüència de mutació en cèl·lules normals i el gran nombre de mutacions presents en cèl·lules tumorals, es fa difícil pensar que aquest increment està motivat per una velocitat de mutació espontània. En aquest sentit, més de trenta anys enrere ja es va proposar la presència d'un fenotip mutador en les cèl·lules tumorals (Loeb *et al*, 1974). Aquest vindria determinat per la mutació de gens clau en el manteniment de l'estabilitat genòmica (gens mutadors) i provocaria un augment significatiu en la velocitat d'adquisició de noves mutacions, és a dir, una inestabilitat genòmica (revisat a Loeb, 2001; Schär, 2001). És important destacar que la mutació d'aquests gens mutadors no ofereix cap avantatge o desavantatge directe, sinó que només afecta la velocitat de mutació d'altres gens.

Alguns autors han suggerit que l'adquisició d'aquesta inestabilitat genòmica és absolutament necessària per a la generació de les múltiples mutacions presents en el càncer. Tanmateix, altres autors diuen que una velocitat de mutació normal, acoblada a ones d'expansió clonal, és suficient per desencadenar el procés tumoral (revisat a Marx, 2002). D'entre els arguments a favor de la inestabilitat genòmica com a motor de la tumorigènesi destaquen: (1) que l'elevada presència de mutacions fa difícil explicar-les per un altre mecanisme; (2) que la probabilitat d'adquirir suficients mutacions per assolir un estat de malignitat elevat és molt petita en un genoma estable; (3) que humans i organismes model amb una inestabilitat genòmica inherent són propensos al

desenvolupament de tumors; i (4) que en alguns tumors hi ha evidències directes que algunes vies implicades en la integritat genòmica estan mutades.

La inestabilitat genòmica pot tenir el seu origen en la pèrdua de funcions genètiques que alteren processos fonamentals per a la viabilitat cel·lular, com ara replicació, reparació i recombinació de l'ADN (Taula 1). Altres processos igualment importants en la cèl·lula, com divisió cel·lular o regulació estructural, també podrien donar lloc a algun tipus d'inestabilitat genòmica. Per tant, es poden associar defectes funcionals específics a patrons característics d'inestabilitat genòmica. Per exemple, la inactivació de funcions que incrementen la fidelitat de la replicació de l'ADN o n'eliminen lesions mutagèniques augmenta la velocitat en l'adquisició d'alteracions en seqüències determinades del genoma. Això es demostra pels fenotips de reparació de *mismatch* postreplicatius (MMR) o defectes en la reparació per escissió de nucleòtids (NER). L'alteració en MMR causa un augment en la velocitat de mutació espontània, concretament inestabilitat en seqüències microsatèl·lit, i una forta predisposició hereditària al càncer (Perucho, 1996). De manera semblant, la inactivació de NER, tal com passa en la malaltia *Xeroderma pigmentosum* i desordres genètics relacionats, provoca un increment en la velocitat de mutació induïda per UV i un increment en el risc de càncer (revisat a de Boer i Hoeijmakers, 2000). Aquests defectes genètics específics en la vigilància del genoma il·lustren molt bé que l'augment d'un tipus determinat d'inestabilitat genòmica pot contribuir al desenvolupament del càncer.

Gene Family	Number of human genes*	Examples involved in human familial cancer
DNA repair	247	
Mismatch repair		hMSH2, hMLH1
Homologous recombinational repair		BRCA1, BRCA2
Non-homologous end joining		NBS
Other		ATM
DNA replication	233	
Chromosome segregation	423	APC
Cell-cycle checkpoint	49	Rb, p53
G ₁ → S		
Intra S		
G ₂ M		
Others (nuclease, recombinase)	52	

(*) Gene numbers are from reference 2.

Taula 1. Fonts d'inestabilitat genòmica en càncers humans. Ref 2: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), 2000. Extret de Anderson et al, 2001.

2 METILACIÓ GENÒMICA

2.1 Característiques generals.

Les primeres evidències de la metilació de l'ADN es van descriure fa més de quaranta anys (Fleissner i Borek, 1963). Aquests autors van exposar que les bases metilades del tRNA es formaven a nivell de polinucleòtid, és a dir, a nivell posttranscripcional. Uns cinc anys més tard, el professor Eduardo Scarano va explicar la distribució no atzarosa de la 5-meticitosina (5mC) en diversos organismes (Grippe *et al*, 1968). Durant la dècada dels setanta, Riggs (1975) i Holliday i Pugh (1975) van predir que la metilació i desmetilació programada de l'ADN podrien estar regulant l'expressió de gens durant el desenvolupament embrionari. Aquesta original hipòtesi tenia una naturalesa clarament especulativa. Els mateixos autors van escriure: “[...] *des de quasi l'absoluta ignorància del mecanisme de regulació dels programes genètics que es donen durant el desenvolupament*” (Holliday i Pugh, 1975). Poc s'imaginaven els autors que les seves especulacions donarien el tret de sortida al que avui dia coneixem com a metilació de l'ADN. Des d'aleshores, una llarga llista de treballs han manifestat la importància d'aquest procés en diferents funcions biològiques, tal com ho demostra la constitució d'un Projecte Epigenòmic Humà a gran escala (Bradbury, 2003).

Un dels requisits per entendre la funció de la metilació de l'ADN és el coneixement de la seva distribució en el regne animal. Tant els nivells com els patrons de la metilació de l'ADN són molt variables. En un extrem tenim el nematode *Caenorhabditis elegans*, en el genoma del qual no s'ha detectat 5mC ni cap gen semblant a les metiltransferases d'ADN (DNMTs). Pel que fa a un altre invertebrat, l'insecte *Drosophila melanogaster*, després d'haver considerat durant molt temps que no presentava metilació genòmica, recentment s'ha descrit que el seu genoma té un gen semblant a la DNMT (Hung *et al*, 1999; Tweedie *et al*, 1999) i s'hi han observat nivells baixos de 5mC (Gowher *et al*, 2000; Lyko *et al*, 2000). Això passa malgrat que la majoria de metilació es troba en el dinucleòtid CpT, en comptes de CpG, que és la principal diana de metilació en mamífers (revisat a Lyko, 2001). Els genomes de molts dels altres invertebrats presenten nivells de metilació moderadament alts de metil CpG concentrats en grans dominis d'ADN metilats separats per dominis equivalents no metilats (revisat a Tweedie *et al*, 1997). Aquest mosaic en la distribució de la metilació ha estat confirmat a elevada resolució en l'ascidia *Ciona intestinalis* (Simmen *et al*, 1999).

En el cas de les plantes i dels fongs, aquests també presenten metilació en altres contextos (revisat a Finnegan *et al*, 2000; Martienssen i Colot, 2001), per exemple, en llocs CpNpG. A l'extrem oposat de *C. elegans* hi ha els genomes de vertebrats, que presenten els nivells més alts de 5mC del regne animal. En aquest cas, la metilació es troba dispersa per la majoria del genoma; d'aquí ve el terme 'metilació global'. La metilació de l'ADN es dona principalment en el context CpG.

La distribució dels patrons de metilació al llarg del procés de desenvolupament també és variable (revisat a Li, 2002). En ratolins, durant els primers estadis de desenvolupament, es desencadena un procés de desmetilació que redueix al 30% els nivells somàtics de metilació genòmica (Monk *et al*, 1987; Kafri *et al*, 1992). La metilació *de novo* restableix els nivells originals de metilació genòmica abans de la implantació de l'embrió a l'úter. Aquesta reducció en els nivells de metilació també s'observa en cèl·lules germinals primordials durant els estadis de proliferació de les oogònies i espermatogònies. A la figura 3 es mostra un resum dels canvis de metilació genòmica que es produeixen al llarg del desenvolupament i que afecten diferents regions genòmiques.

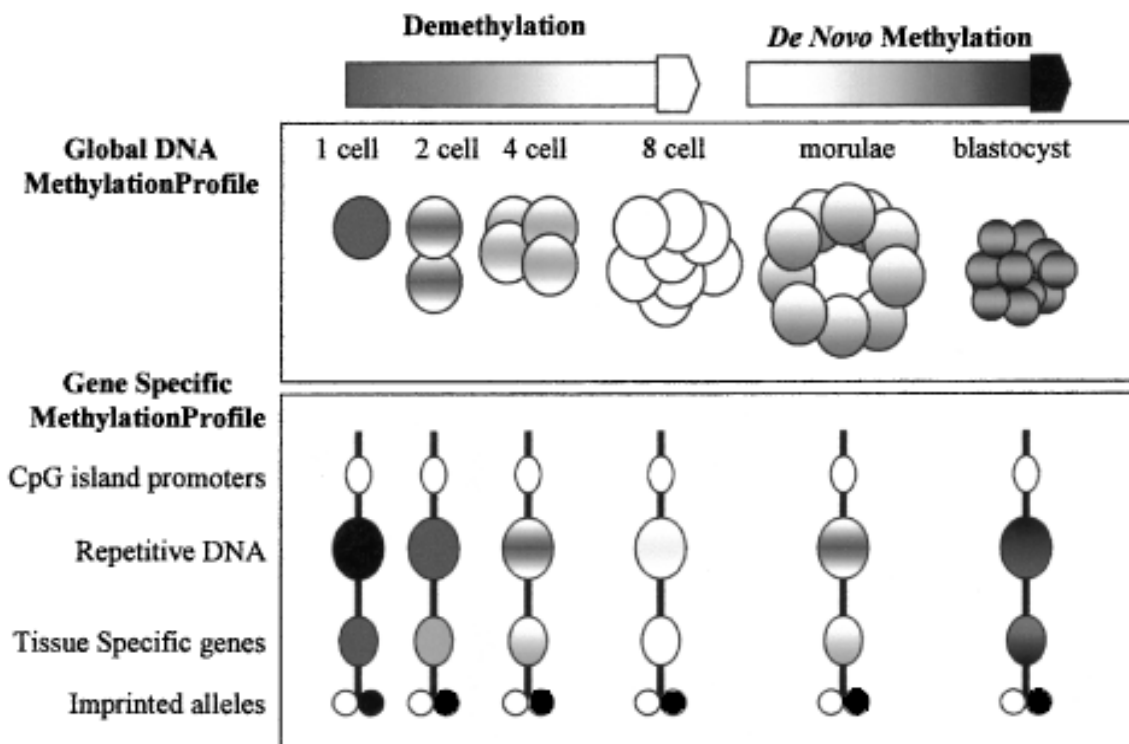


Figura 3. Canvis de metilació genòmica a nivell global i gen específic, al llarg del desenvolupament de l'embrió de ratolí. Durant els primers estadis de desenvolupament els perfils de metilació de l'embrió canvien amb una ona inicial de desmetilació, entre la fecundació i l'estadi de vuit cèl·lules, seguit d'una remetilació *de novo*, entre els estadis de mòrula i blastocist (implantació). La intensitat de la metilació en cada estadi del desenvolupament és indicada amb diferents gruixos de negre. Extret de Clark i Melki, 2002.

2.2 Concepte d'illa CpG.

En els genomes de mamífers, els dinucleòtids CpG presenten una freqüència observada del 25% respecte de la seva freqüència esperada. S'han suggerit dues causes principals per explicar aquesta davallada: (1) en aquests genomes, el 60-90% de les citosines presents en CpG es troben metilades (Bird i Tagart, 1980); i (2) les citosines metilades presenten una major freqüència de mutació a timines (Coulondre, 1978). Aquesta elevada taxa de mutació de CpG a TpG (o CpA a la cadena complementària) ha estat àmpliament confirmada en estudis de polimorfismes i malalties genètiques (Cargill *et al*, 1999; Halushka *et al*, 1999). Alguns estudis de simulació han demostrat que la freqüència observada es correspon exactament amb la que s'esperaria, si es té en compte aquesta elevada taxa de mutació (Duret i Galtier, 2000).

Diversos experiments de digestió de l'ADN amb enzims de restricció sensibles a la metilació de les citosines han revelat l'existència de regions que no eren metilades. Aquestes regions representen entre un 1 i un 2% del genoma humà (Bird, 1986). La clonació i seqüenciació d'aquests fragments va posar de manifest que es tractava d'uns fragments relativament rics en G+C i amb una freqüència del dinucleòtid CpG més elevada (Figura 4; Bird, 1986). Aquests fragments van anomenar-se illes CpG i, a partir de criteris genòmics empírics, se'n va establir la definició (Gardiner-Garden i Frommer, 1987), definició que encara s'utilitza actualment.

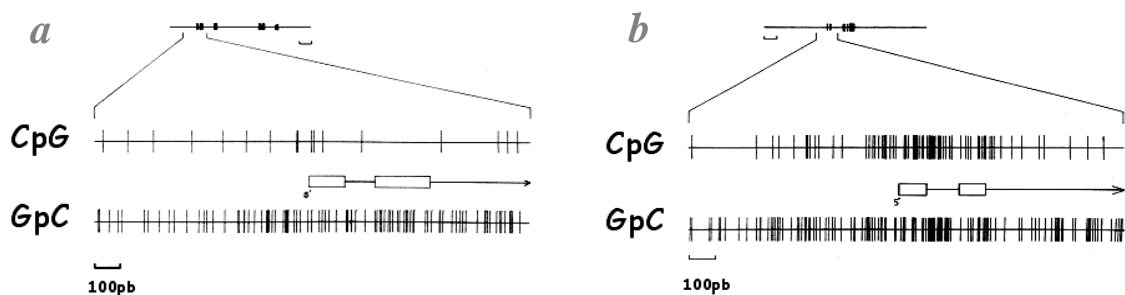


Figura 4. Concepte d'illa CpG. a, gen sense illa CpG en la seva regió promotora (gen de la globina γ -G en humans). b, gen amb illa CpG en el seu promotor (gen transferasa fosforibosil d'adenina en ratolí). Extret de Bird, 1986.

Per tal que una seqüència sigui reconeguda com a illa CpG cal que compleixi els següents requisits: que el contingut G+C sigui igual a 0,50 o més; que el quocient del dinucleòtid CpG observat per l'esperat sigui igual o més gran de 0,60; i que ambdós criteris es produeixin en una seqüència igual o més gran de 200 parells de bases (pb). Segons aquesta definició, s'ha estimat que les illes CpG es troben en la regió

promotora de la meitat de gens presents en el genoma humà (Ioshikhes i Zhang, 2000). Diferents anàlisis computacionals del genoma humà prediuen la presència d'unes 29.000 illes CpG (Lander *et al*, 2001). A partir d'aquesta definició, també s'hi poden incloure les regions promotores riques en CpG d'alguns retroelements. Per això, Takai i Jones, a partir de l'anàlisi de la seqüència total dels cromosomes 21 i 22, van proposar uns nous criteris que exclouien la majoria de regions promotores dels retroelements. Aquests autors van plantejar augmentar el punt de tall de la mida a 500 pb i el del contingut G+C, a 0,55 (Takai i Jones, 2002).

S'ha suggerit que les illes CpG es troben invariablement no metilades (Yoder *et al*, 1997). Malgrat que la base d'aquesta afirmació va ser bastant indirecta, s'hi han aportat poques dades en contra. De fet, hi ha notables excepcions a aquesta norma, com les illes CpG dels *loci imprintats* (Li *et al*, 1993) i les presents en el cromosoma X inactivat (Pfeifer *et al*, 1990a). En els apartats 2.4 i 2.5 es fa un breu resum d'aquests dos processos, respectivament.

S'han descrit diferents hipòtesis per explicar aquest estat lliure de metilació. A Frank *et al*, (1991) i a Macleod *et al*, (1994) els autors van enunciar que la unió de factors de transcripció a les regions promotores en la línia germinal actuaria de mecanisme de protecció a la metilació. En aquest sentit, s'ha proposat que les illes CpG podrien estar associades als orígens de replicació, que es correspondrien amb els promotors actius durant el desenvolupament (revisat a Antequera i Bird, 1999). Recentment, s'ha observat que un 93% dels gens expressats en els primers estadis de l'embrió presenten una illa CpG a la zona promotora (Ponger *et al*, 2001). Una hipòtesi més general exposa que l'absència de metilació és producte de les interaccions entre els factors de transcripció i un enzim amb activitat desmetilasa (Lin *et al*, 2000).

2.3 Funcions de la metilació de l'ADN.

Durant els darrers trenta anys, s'han atribuït diferents funcions biològiques a la metilació de l'ADN. La primera va ser la de regulació de l'expressió gènica. Possiblement aquesta és una de les funcions més controvertides que se li han adjudicat. Una segona funció, menys controvertida però sí matisada, és la de defensa genòmica i integritat estructural. Finalment, s'ha acceptat àmpliament que també té una funció important dins dels processos especialitzats d'expressió gènica al·lel específica. Tot seguit es fa una breu descripció d'aquestes tres funcions principals en mamífers.

(a) *Regulació de l'expressió gènica.* Treballs pioners durant la dècada dels setanta van apuntar cap a un possible paper de la metilació en la regulació de l'expressió gènica teixit específica durant el desenvolupament i diferenciació dels teixits adults (Riggs, 1973; Holliday i Pugh, 1973). Aquesta idea atractiva, en què els gens són transcripcionalment activats a través de l'eliminació dels grups metil i viceversa en el cas de la seva inactivació, ha estat motiu de controvèrsia durant els darrers trenta anys, a causa, principalment, de la manca de dades experimentals directes (Walsh i Bestor, 1999; Costello i Vertino, 2002; vegeu l'apartat de discussió).

Dels diferents treballs que se situen a favor d'aquesta funció, en destaca el realitzat sobre el gen SERPINB5 (Futscher *et al*, 2002), possiblement la prova més directa per avalar aquesta teoria. No vull deixar de banda, però, els nombrosos treballs que han demostrat una associació física entre les diferents proteïnes amb domini d'unió a mCpG (MBD) i les metiltransferases d'ADN (DNMT), a les desacetilases d'histones (HDAC) i a altres complexos repressors (revisat a Hendrich i Tweedie, 2003; Burgers *et al*, 2002). També, estudis bioinformàtics recents (Fazzari i Greally, 2004), així com estudis de metilació globals utilitzant la tècnica RLGS, han descrit exemples de metilació teixit específica, que estarien a favor d'aquesta funció en la regulació de l'expressió gènica (Shiota *et al*, 2002; Kremensky *et al*, 2003; Costello *et al*, 2000; Song *et al*, 2005).

D'entre els treballs que s'oposen a aquesta funció, en destaquen aquells on es descriu una manca de correlació entre metilació i expressió gènica (Warnecke i Clark, 1999; Grunau *et al*, 2000), conjuntament amb la manca de reexpressió de gens teixit específic en embrions de ratolí deficientes en metiltransferasa DNMT 1 (Walsh i Bestor, 1999). Tanmateix, altres experiments on també s'inactiva la mateixa metiltransferasa sí que mostren activació teixit específica (Stancheva i Meehan, 2000; Jackson-Grusby *et al*, 2001; Stancheva *et al*, 2002).

(b) *Defensa genòmica i integritat estructural.* La majoria de dinucleòtids CpG metilats es troben dins de retrotransposons, com retrovirus endogens, elements L1 i seqüències Alu (Bestor *et al*, 1984; Tweedie *et al*, 1997). En el genoma humà s'estima que hi ha tres milions d'elements transposables, que comprenen, més o menys, el 45% del genoma. Un 42,2% d'aquests elements corresponen a retroelements, mentre que la resta està determinada per transposons d'ADN (Bannert i Kurth, 2004). A partir d'aquesta estreta relació entre retrotransposons i dinucleòtids CpG metilats, s'ha proposat que la metilació de l'ADN hauria sorgit com a mecanisme de defensa genòmica per silenciar aquests elements i disminuir la seva expansió en el genoma

(Yoder *et al*, 1997). L'expressió d'aquestes seqüències pot representar múltiples perills per a la integritat genòmica (vegeu l'apartat 5.2). L'associació entre desmetilació i activació de retrotransposons, en condicions no patològiques, ha estat descrita per nombrosos elements transposables: *intracisternal A particle* (IAP) (Walsh *et al*, 1998), LINE (Woodcock *et al*, 1997) i SINE (Liu *et al*, 1994).

El significat biològic de la repressió dels elements transposables al llarg de l'evolució ha estat objecte d'un intens debat. Inicialment, es van plantejar dues explicacions diferents: (1) la repressió és necessària per a la prevenció del dany genòmic provocat per una transposició no controlada (model de defensa genòmica; Yoder *et al*, 1997); i (2) la transcripció d'una gran quantitat de promotors irrelevantes podria implicar un inacceptable nivell de soroll transcripcional que podria interferir en els programes d'expressió gènica (Bird, 1995). Ambdues propostes han provocat un intens debat i intercanvi d'opinions (Bird, 1997; Bird, 2002). Davant d'aquesta bipolarització d'idees, Martienssen, al 1998, ja va suggerir que el paper de la metilació al llarg de l'evolució podia enfocar-se millor si es tenia en compte la relació entre la cromatina i els transposons en un context més ampli que el de la metilació de l'ADN (Martienssen, 1998). Finalment, cal dir que alguns treballs en invertebrats han negat aquest paper de defensa genòmica al llarg de l'evolució i l'han correlacionat més aviat amb el tipus de desenvolupament, concretament amb la quantitat de renovació cel·lular entre meiosis consecutives (Regev *et al*, 1998).

(c) *Expressió gènica al·lel específica*. Els dos exemples paradigmàtics de processos cel·lulars en què la metilació de l'ADN juga un paper important en la seva regulació són: la inactivació del cromosoma X i el fenomen d'*imprinting*. Potser les dues característiques més rellevants dels dos processos són: (1) expressió gènica monoal·lèlica; i (2) mecanisme de silenciament a llarg termini. Tanmateix, ambdós fenòmens comparteixen múltiples característiques comunes (revisat a Lee, 2003). En els dos últims subapartats es presenta un breu resum de la relació dels dos processos biològics amb la metilació de l'ADN.

2.4 Inactivació del cromosoma X.

La importància de la metilació de l'ADN en la inactivació del cromosoma X es va presentar fa molt temps. Històricament, Riggs, al 1975, va predir que les interaccions entre l'ADN i les proteïnes presents en el silenciament del cromosoma X eren sensibles a les citosines metilades.

En els últims trenta anys, s'han realitzat notables avenços en el coneixement del paper de la metilació de l'ADN i dels protagonistes implicats en les principals fases d'inactivació del cromosoma X (iniciació, propagació i manteniment). L'estratègia d'inactivació del cromosoma X en mamífers és única, en tant que en el mateix nucli els dos cromosomes X es troben en estats totalment diferents: un es manté transcripcionalment actiu, mentre que l'altre resta inactiu. Aquest procés té lloc durant els primers estadis de desenvolupament i, una vegada establert, es manté al llarg de les successives divisions cel·lulars (revisat a Avner i Heard, 2001). En el control de la iniciació del procés de silenciament, hi juga un paper determinant el *locus* anomenat *X-inactivation centre* (*Xic*), un *locus* complex que determina quants i quins cromosomes X seràn inactivats (revisat a Clerc i Avner, 2003). Aquest *locus* produeix un dels principals protagonistes en el silenciament, l'ARN anomenat *Xist* (*X-inactive specific transcript*). En el moment de la inactivació, hi ha una sobretranscripció de *Xist* en el cromosoma que serà inactivat.

S'han cartografiat altres ARN no codificants en aquesta regió (Johnston *et al*, 2002; Ogawa i Lee, 2003), d'entre els quals destaca el transcrit antisentit de *Xist*, *Tsix*. Aquest juga un paper fonamental com a regulador negatiu de *Xist*. Diferents estudis indiquen que la transcripció de *Tsix* exerceix un efecte repressor sobre l'acumulació de l'ARN *Xist* abans i durant la inactivació del cromosoma X (revisat a Heard, 2004). Així, la transcripció de *Tsix* es correlaciona amb el cromosoma X que no serà inactivat. Actualment es desconeix el mecanisme d'interacció entre els dos ARN. Una vegada s'ha pres la decisió, *Xist* cobreix el cromosoma en *cis* i dispara la seva inactivació, reclutant complexos silenciadors i induint un seguit de canvis en la cromatina per tal de silenciar de manera estable el cromosoma.

Els canvis seqüencials que es donen després de l'acumulació de *Xist* són: hipoacetilació de les histones H3 i H4, dimetilació de la lisina 9 en histona H3 (H3K9), trimetilació de la lisina 27 en H3 (H3K27) i absència de di- o trimetilació de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4), enriquiment de les histones variants macro H2A i, finalment, metilació de l'ADN a les illes CpG presents en regions promotores (Figura 5; revisat a Heard, 2004; Plath *et al*, 2002). Com a conseqüència d'aquest procés, aproximadament un 85% del cromosoma X adquireix característiques d'heterocromatina. Per tant, no tots els gens que presenten illa CpG en el seu promotor són metilats (revisat a Spatz *et al*, 2004). Estudis recents han demostrat que el complex proteic *polycomb* (PcG; vegeu l'apartat 7.2), que presenta activitat histona metiltransferasa en H3K9 i H3K27, es localitza en el cromosoma X de manera *Xist* dependent (Silva *et al*, 2003). Malgrat que no es coneix com cadascuna d'aquestes

marques epigenètiques contribueix en el silenciament, sembla ser que actuarien de manera sinèrgica (Csankovszki *et al*, 2001).

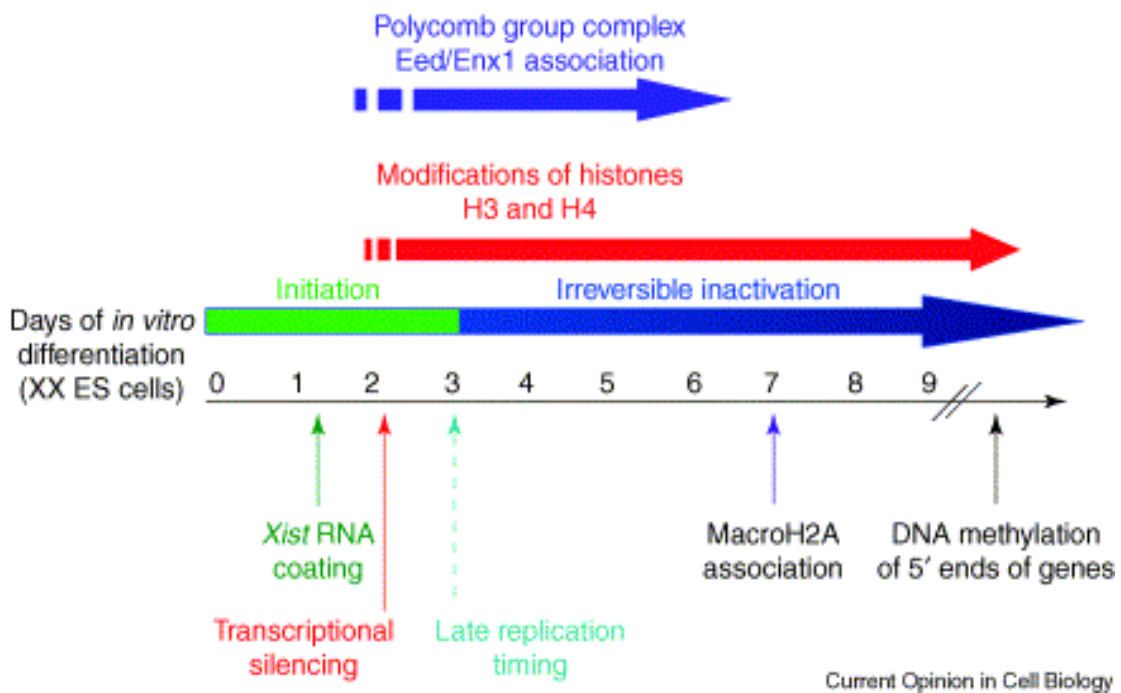


Figura 5. Cinètica de la inactivació del cromosoma X en la diferenciació de cèl·lules embrionàries femenines. S'indica el moment més primerenc en el qual es dona cadascuna de les modificacions. Els períodes de temps corresponen a la transició de l'inici de la fase dependent de l'ARN Xist (en verd) i de la fase irreversible independent de l'ARN Xist (en blau). Extret de Heard, 2004.

2.5 Mecanisme d'*imprinting*.

L'*imprinting* genòmic constitueix un tipus d'herència no-Mendeliana que es troba present en mamífers euterians, marsupials i plantes superiors. És un mecanisme epigenètic de regulació gènica que determina l'expressió d'un grup de gens durant el desenvolupament dependent del seu origen parental. Aquest fet comporta que el genoma patern i el matern no són funcionalment equivalents, i els dos són necessaris pel desenvolupament normal. L'any 2004, uns seixanta gens *imprintats* s'havien aïllat de genomes humans i de ratolins, i s'ha estimat que aproximadament n'hi ha un centenar en el genoma de ratolí (Reik i Walker, 2001). El mecanisme de l'*imprinting* genòmic és complex i no està totalment desembrollat. Tanmateix, es coneix que la metilació de l'ADN hi té un paper principal (revisat a Rand i Cedar, 2003; Murphy i Jirtle, 2003). L'*imprinting* genòmic està sotmès a una sèrie de canvis al llarg de la vida de l'organisme, essent diferent en les cèl·lules germinals i somàtiques (revisat a Li, 2002, Scarano *et al*, 2004).

3 TÈCNiques D'ANÀLISI DE LA METILACIÓ GENÒMICA

Les tècniques d'anàlisi de la metilació de l'ADN es diferencien en dos grans grups. Un primer grup està format per les tècniques de rastreig, que permeten buscar nous marcadors o canvis de metilació entre dues mostres d'ADN diferents, per exemple, teixit normal i teixit tumoral. Un segon bloc està integrat per aquelles tècniques que permeten realitzar estudis a nivell específic d'una o poques seqüències, prèviament conegudes. Generalment, aquest segon grup de tècniques s'utilitza per a estudis específics on es volen confirmar canvis de metilació en fragments coneguts i, per tant, el seu ús en estudis globals és molt limitat (revisat a Cottrell, 2004 i Rein *et al*, 1998).

Les tècniques de rastreig consten de dues parts ben diferenciades. Una primera part serveix per identificar les diferències de metilació entre les dues mostres. Generalment, aquesta part consta d'una digestió enzimàtica amb enzims de restricció sensibles a la metilació. La segona part serveix per visualitzar les diferències de metilació prèviament identificades. Aquesta fase ofereix un ampli ventall de possibilitats, que van des d'una visualització en un gel d'electroforesi fins a una hibridació en un xip. Tanmateix, algunes tècniques utilitzen un pas intermig d'amplificació per PCR, de manera que la sensibilitat del mètode augmenta considerablement (Figura 6).

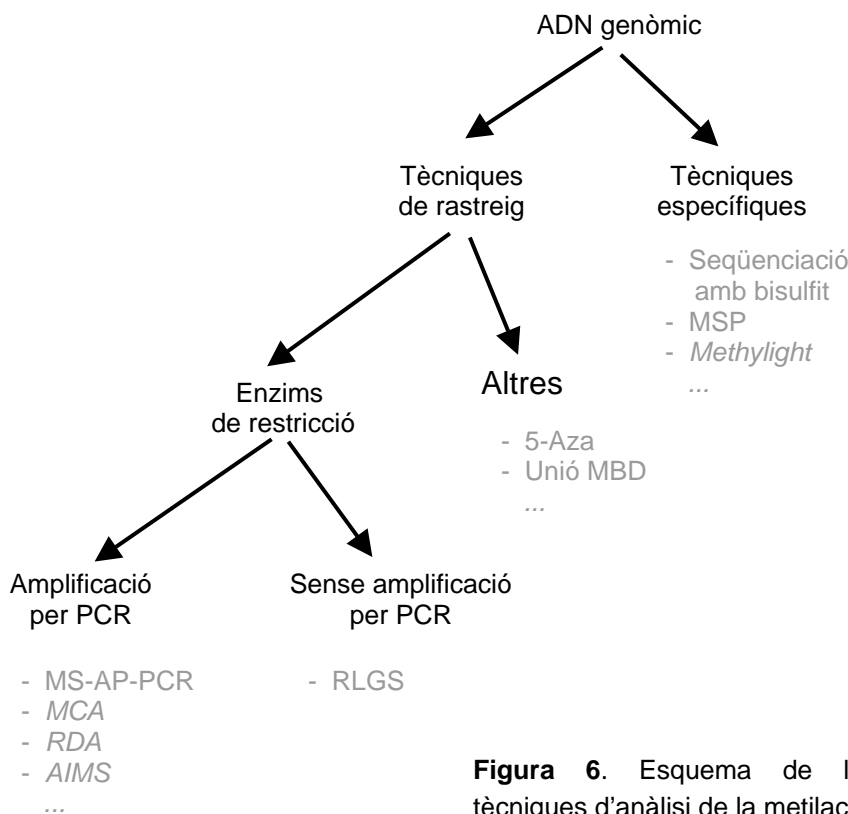


Figura 6. Esquema de les diferents tècniques d'anàlisi de la metilació genòmica.

No hi ha un mètode perfecte de rastreig, ja que cada un ofereix una sèrie d'avantatges i inconvenients. Per tant, l'elecció del mètode dependrà, en cada cas, del tipus d'informació que es vulgui obtenir. En el nostre treball, per poder assolir els objectius que ens havíem plantejat, necessitàvem una tècnica de rastreig que presentés tres característiques principals: (1) informació de múltiples pèrdues i guanys alhora per tal de realitzar l'estudi global; (2) possibilitat de caracteritzar alteracions específiques; i (3) fàcil aplicació, per poder analitzar un nombre elevat de mostres.

Aquesta darrera condició ens va portar a descartar una bona part de les tècniques descrites anteriorment, a causa d'una excessiva complexitat tècnica. Les tècniques descartades van ser: *Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)* (Hayashizaki *et al*, 1993), *Differential Methylation Hybridization (DMH)* (Huang *et al*, 1999), *Methylation-Sensitive-Representational Difference Analysis (MS-RDA)* (Ushijima *et al*, 1997), *Methylated CpG island Amplification (MCA)* (Toyota *et al*, 1999) i, finalment, una de les poques tècniques no basades en digestió enzimàtica i que es fonamenta en columnes d'afinitat amb domini d'unió a CpG metilats (Brock *et al*, 2001). Malgrat tot, exceptuant la tècnica MS-RDA, la resta de tècniques esmentades s'han dissenyat per detectar canvis d'hipermetilació en illes CpG, tot limitant-ne el seu ús en la detecció d'hipometilacions. Un resum de les diferents tècniques de rastreig es mostra a la taula 1. A Cotrell, 2004 i Ushijima, 2005 es poden trobar revisions actuals d'aquestes tècniques.

Altres mètodes, que presenten un ús fàcil en la detecció de guanys i pèrdues, es van descartar pel poc nombre de fragments informatius que donaven. Aquestes tècniques es basaven en l'ús d'encebadors arbitraris, com *Arbitrarily Primed-PCR (AP-PCR)* (Welsh i McClelland, 1990) i *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* (Williams *et al*, 1990) (revisat a Frigola *et al*, 2005a), i eren àmpliament utilitzades en estudis fil·logenètics i de malalties humanes. Concretament, les tècniques descartades van ser: *Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR (MS-AP-PCR)* (Gonzalogo *et al*, 1997 i Kohno *et al*, 1998) i *Methylation-Sensitive restriction Fingerprinting (MSRF)* (Huang *et al*, 1997).

Cal dir que aquests mètodes de *fingerprinting* de l'ADN basats en la PCR presenten una sèrie d'avantatges que encaixaven molt bé en el nostre estudi, com són: poc material de partida, fàcil aplicació a un nombre elevat de mostres i, tant o més important que aquests, la familiarització del nostre laboratori en el seu ús. Aleshores, només calia superar el gran inconvenient d'aquests mètodes: el nombre reduït de fragments informatius. En aquest cas, eren molts els avantatges i pocs els inconvenients com perquè en Miquel Àngel no hi trobés una solució. Encara recordo la

tarda quan, cap al tard, em va venir a dir: “Jordi, ja ho tinc, hem de provar...” i em va dibuixar una història d’enzims de restricció, connectors i encebadors sobre un paper, que jo en aquell moment no entenia massa bé. Li vaig respondre que em deixés l’esquema sobre la taula i que l’endemà ja m’ho miraria amb més calma. L’endemà em va comentar que, després de parlar amb mi, la tarda anterior, havia estat buscant bibliografia i que havia trobat un article en què s’exposava la utilització d’una primera part d’identificació dels canvis de metilació molt semblant a la que m’havia explicat (Toyota *et al*, 1999), però que la part de visualització d’aquests canvis era molt diferent. Poc m’imaginava que aquell dia havia nascut la tècnica de l’AIMS, l’arrel d’on brotaria la meva tesi.

Method	Description	Strengths/weaknesses
MSAP-PCR	methylation-specific restriction digest, arbitrarily primed PCR amplification	limited to enzyme recognition sites
MCA	methylation-specific restriction digest and linker ligation, PCR amplification with linker primers	Limited to enzyme recognition sites
DMH	methylation-specific restriction digest, hybridize digested and undigested DNA to array of CpG islands	limited to CpG island sequences in the array; potential for high throughput
ECIST	methylation and expression measured on same array	information on both methylation and expression
RLGS	methylation-specific restriction digest, two-dimensional electrophoresis	requires high-quality DNA
5-Azacytidine expression	re-expression array analysis of genes reactivated by the methylation inhibitor 5-azacytidine	selection by function
MAD	MCA with microarray-based detection	limited to enzyme recognition sites
<i>Nor1</i> -CODE	<i>Nor1</i> digestion; linker ligation and PCR, subtraction, hybridization to <i>Nor1</i> library array	Simultaneous detection of hypermethylation and deletions
AIMS	MCA-style amplicon generation, visualization by gel electrophoresis	limited to enzyme recognition sites
Size fractionation profiling	methylation-specific restriction digest; size fractionation, hybridization to microarray	requires a lot of DNA (>20 µg)
ICEAMP	Methyl CpG binding domain column, subtractive hybridization	prone to false positives

Taula 2. Mètodes de rastreig de canvis de metilació genòmica. Extret de Cottrell, 2004.

4 ESTUDIS GLOBAIS DELS CANVIS DE METILACIÓ GENÒMICA ASSOCIATS AL PROCÉS TUMORAL

Per poder dur a terme un estudi global dels canvis de metilació en l'ADN associats al procés tumoral cal tenir informació tant de les pèrdues (hipometilacions) com dels guanys (hipermetilacions) de metilació de l'ADN, ja que els dos canvis coexisteixen en la majoria de tumors. Una valoració conjunta d'aquests dos canvis ens permetrà avaluar la contribució de cadascun d'ells al llarg del procés tumoral. Si aquests canvis apareixen o no en la mateixa proporció pot tenir conseqüències diferents a nivell molecular i/o clínic dels tumors. Aleshores, l'elaboració d'una estimació del grau d'hipometilació i d'hipermetilació present en cada mostra tumoral (sempre respecte del seu corresponent teixit normal) ens permetrà analitzar el grau de dependència entre aquests dos canvis. La disposició de dades genètiques i clinicopatològiques de les mostres ens pot ser de gran ajuda a l'hora d'esbrinar el grau d'interdependència entre aquests canvis.

En la literatura, pocs treballs s'han centrat en l'estudi paral·lel de les hipo- i hipermetilacions en el càncer. Concretament, són poc abundants els treballs descriptius de la coexistència de la hipermetilació d'illes CpG amb una hipometilació general (Narayan *et al*, 1998; Ribieras *et al*, 1994; Ushijima *et al*, 1997; Jürgens *et al*, 1996). Malgrat que la descripció de la hipometilació va precedir la de la hipermetilació (vegeu l'apartat 5), aquesta última ha centrat la majoria de l'atenció a causa, principalment, de les seves implicacions en el silenciament de gens supressors de tumors. Aquesta mancança en treballs descriptius s'accentua si tenim en compte els treballs que es centren en l'estudi de la relació entre els dos canvis. Fins a l'any 2002 no hi va haver cap treball que estudiés aquesta associació en qualsevol tipus de càncer (Ehrlich *et al*, 2002).

Aleshores, en aquest estudi pioner dels grups de la Melanie Ehrlich i en Peter Laird s'avalua l'associació entre la hipermetilació de la zona promotora de dotze gens coneguts amb els nivells globals de 5-metilcitosina (mesurats per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC)) en els tumors de Wilms. Una característica important d'aquest tipus de tumor és la manca de teixit normal. El tumor deriva del blastema embrionari metanefric, que normalment és eliminat durant el desenvolupament embrionari. Tanmateix, teixit normal de ronyó pot contenir cèl·lules anormals i, per tant, s'utilitza un conjunt de teixits humans d'adult (Ehrlich *et al*, 2002).

Un any després, el grup de la professora Robyn Ward publicava un article on s'avaluava específicament la relació entre hipo- i hipermetilació en el càncer colorectal (Bariol *et al*, 2003). En aquest cas, l'estudi englobava la relació entre la hipermetilació de sis gens prèviament coneguts i el grau d'hipometilació global (mesurat a partir de la capacitat acceptadora de grups metil de l'ADN (De Smet *et al*, 1996)). Finalment, l'any 2004 es va publicar un estudi de relació entre els dos canvis en càncer de pròstata (Flori *et al*, 2004). En aquest cas, s'estudiava la relació entre la hipermetilació de vuit gens prèviament coneguts i el grau d'hipometilació de les seqüències LINE-1 (mesurat a partir de la realització d'un *southern* amb una sonda específica per seqüències LINE-1).

Respecte dels treballs citats anteriorment, nosaltres vam utilitzar una estratègia d'avaluació dels guanys i de les pèrdues de metilació completament diferent. La utilització de la tècnica de l'AIMS implica una sèrie de diferències importants, de les quals cal destacar: (1) avaluació dels guanys i pèrdues de metilació a partir d'una mateixa tècnica; (2) informació aportada per múltiples fragments prèviament no seleccionats; i (3) possibilitat de conèixer i caracteritzar l'origen de cadascun dels fragments estudiats. També cal dir que la disponibilitat de dades genètiques i clinicopatològiques ens va permetre fer una avaluació conjunta de la relació entre les diferents variables, així com una valoració del valor pronòstic dels diferents canvis de metilació.

5 HIPOMETILACIÓ DEL CÀNCER

5.1 Descripció general.

La pèrdua de metilació de l'ADN va ser la primera alteració epigenètica descrita en càncer. A principis del 1980, molts grups estaven interessats en el paper que podia jugar la metilació en el silenciament gènic teixit específica. L'any 1983, dos grups independents van descriure la disminució en el contingut total de 5-metilcitosina en cèl·lules canceroses. El grup de la Melanie Ehrlich va descriure una hipometilació associada a tumors, mesurada a través de la utilització de HPLC (Gama-Sosa *et al*, 1983), mentre que Andrew Feinberg i Bert Vogelstein descrivien uns resultats similars, en aquest cas mesurats per *Southern Blot* (Feinberg i Vogelstein, 1983). Posteriorment, es va demostrar que aquesta hipometilació afectava qualsevol tipus de tumor estudiat, tant benigne com maligne (Goelz *et al*, 1985); a més, en càncer de còlon, l'estat premaligne d'adenoma també presentava un elevat grau d'hipometilació, que anava d'un 8% a un 10% respecte del teixit normal (Feinberg *et al*, 1988). Des d'aleshores, la hipometilació genòmica global ha estat descrita en molts tipus de càncer (revisat a Ehrlich, 2002).

Alguns treballs han presentat una associació entre el grau d'hipometilació i malignitat del tumor. Per exemple, en càncer de mama, ovari i cèrvix, la hipometilació augmenta progressivament amb el grau de malignitat del tumor (Kim *et al*, 1994; Qu *et al*, 1999a; Gama-Sosa *et al*, 1983). Concretament, en càncer de mama s'ha associat significativament el grau d'hipometilació amb l'estadi, mida i grau de malignitat del tumor (Soares *et al*, 1999). Addicionalment, en el càncer de pròstata s'ha associat a l'estadi clínic del tumor i en metastasi (revisat a Li *et al*, 2005). No obstant això, en alguns treballs s'ha qüestionat aquesta associació (Bernardino *et al*, 1997; Brothman *et al*, 2005).

Contrastant amb aquesta tendència a l'alça dels nivells d'hipometilació respecte de la progressió tumoral, el grau d'hipometilació en pòlips de còlon benignes i adenocarcinoma malignes són quantitativament similars (Feinberg *et al*, 1988). La possibilitat que la hipometilació sigui un reflex de la divisió accelerada de les cèl·lules cancerígenes és poc probable, donat que aquesta relació no s'ha observat entre teixits normals i cèl·lules en cultiu (Gama-Sosa *et al*, 1983). Així doncs, aquestes correlacions fan pensar en un paper predominant de la hipometilació durant l'inici i progressió tumoral. Finalment, cal esmentar que aquestes pèrdues de metilació globals també es

donen durant el procés d'envelliment d'una manera teixit específica (revisat a Richardson, 2003).

5.2 Mecanismes de contribució de la hipometilació en el càncer.

Aquest apartat respon a una pregunta clau: quins són els mecanismes a través dels quals la hipometilació contribueix en el procés tumoral? En aquest sentit, s'han proposat diverses hipòtesis, entre les quals destaquem: activació gènica, activació de retrotransposons i inestabilitat genòmica. Totes aquestes hipòtesis han rebut suport amb la identificació dels llocs genòmics subjectes a hipometilació en el càncer i, per tant, no són excloents entre elles. Tot seguit, es fa un breu resum de les dades aportades per cada hipòtesi.

(a) *Activació gènica.* Holliday i Pugh, a l'any 1975, ja van proposar que la hipometilació podia conduir a l'expressió errònia de gens importants en el procés tumoral. Els primers exemples que trobem descrits afecten els oncogens *HRAS* i *CMYC* (Del Senno *et al*, 1989; Vachtenheim *et al*, 1994). En aquests casos no hi ha evidències clares de correlació entre la pèrdua de metilació i la seva sobreexpressió. Aquesta relació de causalitat sí que ha estat ben establerta en un gran grup de gens agrupats en diferents famílies: *MAGE*, *GAGE*, *CTAG/LAGE* i *SAGE*. Aquests gens codifiquen per antigens tumor específic i són expressats en testicles i algun tipus de càncer, destacant la seva manca d'expressió en una gran varietat de teixits normals somàtics (De Backer *et al*, 1999; De Smet *et al*, 1996; Lethe *et al*, 1998). Altres exemples descrits en càncers gastrointestinals són: *CCND2* (Oshimo *et al*, 2003), *maspin* (Akiyama *et al*, 2003) i *S100A4* (Nakamura *et al*, 1998). Finalment, un altre grup important de gens que sovint presenten alteracions a nivell de metilació de l'ADN i expressió són els gens *imprintats* (revisat a Ehrlich, 2002; Feinberg i Tycko, 2004).

(b) *Activació de retrotransposons.* Aquesta hipòtesi està directament relacionada amb la teoria que una de les funcions primàries de la metilació és la defensa genòmica contra les seqüències mòbils internes i externes del genoma (vegeu l'apartat 2.3). En termes generals, tenim dos grans tipus de retrotransposons, d'acord amb la seva autosuficiència mecànica (vegeu la figura 7). Es tracta d'elements transposables autònoms, que codifiquen per tota la maquinària necessària per tal de poder-se moure, i d'elements no autònoms, la mobilitat dels quals depèn de la presència d'altres elements mòbils (revisat a Prak i Kazazian Jr, 2000; Kazazian Jr, 2004).

D'entre els elements autònoms cal destacar les seqüències LINE o L1 i els retrotransposons LTR. L1 són els elements transposables autònoms més actius en el genoma humà. Aproximadament n'hi ha unes 500.000 còpies, que constitueixen un 17% del genoma humà, moltes de les quals presenten alteracions en la seva seqüència (Smit, 1999). Així, es creu que existeixen unes 4.000 còpies senceres i, d'aquestes, es calcula que només unes 40-60 còpies són actives (Sassaman *et al*, 1997). En humans, els elements més pròxims als retrotransposons LTR són els retrovirus endògens (HERV), molts dels quals han perdut la capacitat de sintetitzar proteïnes retrovirals, especialment de l'embolcall, i per tant, només poden inserir-se dins del genoma en què es troben (revisat a Bannert i Kurth, 2004). Aquests elements constitueixen un 8% del genoma humà (Smit, 1999).

Pel que fa als elements no autònoms, cal destacar els Alu. Es creu que hi ha més d'un milió d'aquests elements en el genoma humà i que representen un 11% del total genòmic (Schmid, 1998). El moviment d'aquests retrotransposons pot provocar alteracions en l'expressió de gens importants en el procés tumoral (revisat a Ehrlich, 2002 i Whitelaw i Martin, 2001). S'han descrit insercions mutacionals de L1 en el gen APC i CMYC en càncer de còlon i mama, respectivament (Miki *et al*, 1992; Morse *et al*, 1988). De les mutacions per inserció d'elements Alu, en destaquen els gens BRCA1 i BRCA2, en famílies que presentaven predisposició hereditària a càncer de mama i ovari (Miki *et al*, 1996; Montagna *et al*, 1999), i el gen MLH1, en famílies amb predisposició al càncer colorectal (Nystrom-Lahti *et al*, 1995).

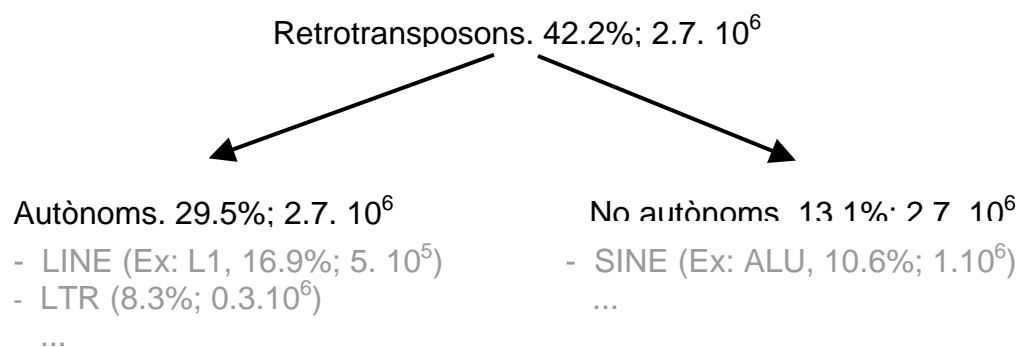


Figura 7. Esquema dels diferents tipus de retrotransposons en funció del grau d'autonomia, en humans. S'indica el percentatge de cada element en el genoma, així com el número de còpies presents. Extret de Bannert i Kurth, 2004.

Finalment, cal recordar que l'efecte deleteri dels retrotransposons en càncer no necessàriament ha d'implicar la transposició. S'ha suggerit que, a través de l'elevada activitat de la 5'LTR o regió promotora de les L1, la hipometilació d'aquestes regions

podria afectar l'expressió dels gens contigus. Aquest tipus d'alteracions podria ser especialment important en el cas dels retrotransposons LTR, que mantenen la seva regió promotora intacte.

(c) *Inestabilitat genòmica*. Donat que tant la hipometilació com la inestabilitat genòmica són dues característiques molt generals i primerenques en el procés tumoral, resulta molt temptador especular que la hipometilació genòmica, a través de la desestabilització del genoma, ofereix un mecanisme d'adquisició de múltiples mutacions per la cèl·lula cancerosa. Aquest raonament, en certa manera molt lògic, actualment segueix essent un tema d'intensa discussió.

El debat està determinat per la dificultat tècnica d'analitzar el possible vincle entre els dos fenòmens. Així, són pocs els treballs que han intentat trobar una resposta a l'especulació inicial i sovint han presentat resultats oposats. Els tipus de seqüències que poden contribuir a una inestabilitat genòmica en el càncer, causada principalment per la seva desmetilació, són seqüències repetides i elements transposables. En l'apartat anterior s'ha descrit l'alteració de l'expressió en gens importants pel procés tumoral motivada per una inserció d'un element transposable. En aquest cas, el moviment d'un element transposable no afecta l'expressió d'un gen determinat, sinó que a partir d'aquest element s'origina una alteració cromosòmica.

Els elements transposables s'han trobat associats a diferents reestructuracions cromosòmiques, com deleccions, duplicacions, inversions, la formació de fragments acèntrics i cromosomes dicèntrics, translocacions i recombinacions dels genomes hostes (revisat a Gray, 2000). L'associació entre el moviment d'aquests elements mòbils i la inestabilitat genòmica s'ha descrit a diferents treballs (Symer *et al*, 2002; Moore i Haber, 1996; Teng *et al*, 1996). Tanmateix, estudis d'híbrids entre espècies d'origen mamífer han constatat l'afavoriment de la inestabilitat cromosòmica a través de la desmetilació d'elements retrovírics (O'Neill *et al*, 1998).

Respecte de la contribució de la desmetilació de seqüències repetides a la inestabilitat genòmica, un dels principals protagonistes és l'ADN satèl·lit. Aquestes seqüències, originalment identificades en gradients de densitat obtinguts per ultracentrifugació de genomes eucariòtics complexos, actualment es defineixen com qualsevol seqüència repetida en tàndem (Csink i Henikoff, 1998). Aquestes seqüències es presenten en blocs de centenars a milers de repeticions. Aleshores, en un cromosoma estàndard, els blocs de repeticions més llargs es troben al voltant del centromer, mentre que les repeticions de microsatèl·lits presenten una distribució més uniforme (Tautz i Schlotterer, 1994; Jeanpierre, 1994; Lohe, 1993).

Els blocs d'ADN satèl·lit al voltant del centromer constitueixen l'heterocromatina constitutiva, que durant la interfase presenta una conformació més condensada, a diferència de les seqüències repetides presents en les regions eucromàtiques. Molts dels treballs que han estudiat la interrelació entre desmetilació i inestabilitat genòmica d'aquestes seqüències repetides en tàndem ho han fet centrant-se en un subtipus determinat d'ADN satèl·lit, el satèl·lit 2 o Sat2. Aquest subtipus es troba majoritàriament a l'heterocromatina pericentromèrica dels cromosomes 1 i 16. En cèl·lules somàtiques normals, Sat2 apareix fortament metilat. No obstant això, en adenocarcinoma de mama, tumors epitelials d'ovari, tumors esporàdics de Wilms i carcinomes hepatocel·lulars, aquestes regions es troben significativament hipometilades i, freqüentment, presenten algun tipus d'inestabilitat (Narayan *et al*, 1998; Qu *et al*, 1999b; Wong *et al*, 2001). Anormalitats cromosòmiques associades a la hipometilació d'aquestes regions heterocromàtiques inclouen isocromosomes, translocacions juxtacentromèriques no balancejades i delecions de braços cromosòmics sencers.

Cèl·lules normals tractades amb 5-azacitidina (5-aza-CR) o 5-aza-2-desoxicitidina (5-aza-CdR), quan són estimulades mitòticament, presenten alteracions semblants en els cromosomes 1 i 16. Curiosament, aquestes alteracions no es donen en altres genotoxines que no impliquen una hipometilació (Hernández *et al*, 1997; Kokalj-Vokac *et al*, 1993). Aquests resultats indiquen que la hipometilació podria ser la causa de la inestabilitat cromosòmica; tanmateix, la necessitat de l'estimulació mitòtica i divisió cel·lular en aquest procés suggereix una possible relació multifactorial.

Troben una associació addicional entre hipometilació i inestabilitat genòmica en el síndrome ICF (*Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies*), una estranya malaltia genètica en humans que és causada per l'heretabilitat de mutacions en la metiltransferasa *DNMT3b* (Xu *et al*, 1999, Hansen *et al*, 1999). En totes les cèl·lules somàtiques dels pacients que presenten ICF, l'heterocromatina pericentromèrica dels cromosomes 1 i 16 es troba hipometilada. L'estimulació mitòtica dels limfòcits obtinguts dels pacients ICF determina una elevada freqüència d'alteracions en aquests cromosomes i, en menor grau, al cromosoma 9 (Jeanpierre *et al*, 1993; Xu *et al*, 1999). En canvi, les persones amb el síndrome ICF no presenten una major probabilitat de desenvolupar càncer (Hansen *et al*, 1999; Xu *et al*, 1999).

Estudis *in vitro*, lluny d'aclarir la relació de causalitat, sovint han donat resultats contradictoris. Ratolins amb mutacions en els dos al·lels de la *DNMT1* no són viables i moren durant la gestació (Li *et al*, 1992). Per superar aquest problema de viabilitat s'han adoptat diferents estratègies. En aquest sentit, s'han realitzat alguns treballs en

cèl·lules totipotents embrionàries de ratolí amb l'activitat DNMT1 anul·lada. Un primer estudi en aquestes cèl·lules mostra que la velocitat de mutació de dos *loci* endògens es veu augmentada unes deu vegades respecte de les cèl·lules control (Chen *et al*, 1998), suggerint que la pèrdua de metilació predisposava a adquirir inestabilitat genòmica. En un segon treball, on es va avaluar la capacitat de mutació de transgens d'origen exogen, utilitzant un sistema de selecció per a la detecció de mutants, no es va detectar ni un excés de mutacions ni cap senyal d'inestabilitat genòmica (Chan *et al*, 2001).

Dos treballs estenen aquests estudis previs en cèl·lules totipotents a cèl·lules somàtiques (Gaudet *et al*, 2003; Eden *et al*, 2003). Per poder fer-ho, generen ratolins amb al·lels hipomòrfics de la DNMT1, cosa que permet obtenir una reducció del 90% en l'activitat de la DNMT1, respecte dels ratolins control. En el treball de Gaudet *et al* s'explica l'observació d'un subtil, però estadísticament significatiu, increment en els guanys i pèrdues de cromosomes en els tumors hipometilats. En el segon treball (Eden *et al*, 2003), aporten proves per al possible paper desestabilitzant de la hipometilació, concretament en un augment de les pèrdues d'heterozigositat.

L'extrapolació d'aquests resultats en ratolí a humans no sembla ser directa. Treballs en la línia cel·lular de càncer colorectal HCT116 demostren que el silenciament de la DNMT1 implica una reducció en el contingut de 5-metilcitosina genòmica (5-mC) menor del 3% (Rhee *et al*, 2000). Sorprenentment, l'anul·lació de la DNMT1 i la DNMT3b alhora implica una reducció del 95% del contingut en 5mC. Aquests canvis dràstics en la metilació genòmica es tradueixen en una desmetilació de les seqüències repetides, pèrdues d'*imprinting* i supressió del creixement (Rhee *et al*, 2002). Tanmateix, en aquestes cèl·lules no s'observa un increment dramàtic en el guany i les pèrdues de fragments (Rhee *et al*, 2002).

6 HIPERMETILACIÓ DEL CÀNCER

6.1 Característiques generals.

La hipermetilació de l'ADN és l'alteració epigenètica més ben caracteritzada en càncer. Avui dia no es discuteix l'associació entre la hipermetilació de zones promotores amb illes CpG i el seu silenciament gènic durant el procés tumoral. Cal emfasitzar que aquesta associació ha estat clarament demostrada només en la metilació de les regions promotores i no en les parts transcrites dels gens (Jones, 1999).

La primera descripció de la metilació d'una illa CpG en zona promotora d'un GST va ser en el gen Retinoblastoma (Rb) l'any 1989 (Greger *et al*, 1989). No obstant això, no va ser fins el descobriment d'altres gens afectats per aquesta alteració tumoral, uns cinc anys més tard, quan es va evidenciar la importància de la hipermetilació al llarg del procés tumoral (Herman *et al*, 1994; Merlo *et al*, 1995; Gonzalez-Zulueta *et al*, 1995). El refinament d'antigues tècniques, així com la introducció de noves metodologies per a l'anàlisi de la metilació en regions específiques del genoma (Clark *et al*, 1994; Herman *et al*, 1996) han contribuït de manera decisiva a incrementar el nombre de gens descrits durant l'última dècada, que es veuen afectats per aquesta alteració al llarg del procés tumoral (Taula 3; revisat a Jones i Baylin, 2002). Les regions genòmiques que sovint es troben hipermetilades en càncer són les illes CpG que es troben en la regió promotora dels gens.

Actualment, està ben establert que en una cèl·lula tumoral hi podem trobar més d'un gen afectat per aquesta alteració (Melki *et al*, 1999). Els gens susceptibles de patir-la són gens implicats en el cicle cel·lular, diferenciació, reparació d'ADN, resistència a drogues, detoxificació, apoptosi, angiogènesi i metàstasi (Costello i Plass, 2001). En total, es creu que s'hi poden veure implicats uns pocs centenars de gens (Costello *et al*, 2000). De tots ells, només uns quants tindran un paper determinant i seran seleccionats durant el procés tumoral. Així, la hipermetilació de l'ADN s'hauria de veure com un procés global en el qual molts gens es veuen afectats, però només uns quants tindran una significació funcional. Per tant, no tots els gens hipermetilats en càncer mostraran propietats de GST i caldrà realitzar estudis addicionals per confirmar els possibles candidats a GST (Baylin i Herman, 2001).

La inactivació d'almenys la meitat dels GST que tenen mutacions germinals en aquells individus que presenten algun tipus de càncer hereditari va associada a la hipermetilació en càncers esporàdics (Baylin i Herman, 2000). En el cas dels GST,

donada l'associació entre la hipermetilació i la seva inactivació al llarg del procés tumoral, s'ha proposat aquesta alteració com a mecanisme alternatiu a la mutació i pèrdua d'heterozigositat (LOH) en la hipòtesi original de Knudson (Jones i Laird, 1999). La proposició d'aquest nou mecanisme es va veure reforçada amb els resultats dels treballs descriptius en el silenciament de gens específics. Per exemple, la línia cel·lular de càncer colorectal HCT116 té una còpia del gen CDKN2A mutada i l'altra no. Aleshores, la hipermetilació del gen només es dona en l'al·lel no mutat (Myohanen *et al*, 1998). Aquesta selectivitat també s'ha observat en altres línies cel·lulars derivades d'altres tumors (Yeager *et al*, 1998). Un estudi en famílies que presenten una mutació germinal en els GST hMLH1, BRCA1 o LKB1/STK11 mostra que la hipermetilació només afecta aquells al·lells no mutats (Esteller *et al*, 2001a).

Gene	Function	Location	Tumour profile	Consequences
hMLH1	DNA mismatch repair	3p21.3	Colon, endometrium, stomach	Frameshift mutations
BRCA1	DNA repair; transcription	17q21	Breast, ovary	Double strand-breaks?
p16 ^{INK4a}	Cyclin-dependent kinase inhibitor	9p21	Multiple types	Entrance in cell cycle
p14 ^{ARF}	MDM2 inhibitor	9p21	Colon, stomach, kidney	Degradation of p53
p15 ^{INK4b}	Cyclin-dependent kinase inhibitor	9p21	Leukaemia	Entrance in cell cycle
MGMT	DNA repair of O6-alkyl-guanine	10q26	Multiple types	Mutations, chemosensitivity
GSTP1	Conjugation to glutathione	11q13	Prostate, breast, kidney	Adduct accumulation?
p73	p53 homologue	1p36	Lymphoma	Unknown
LKB1/STK11	Serine/threonine kinase	19p13.3	Colon, breast, lung	Unknown
ER	Oestrogen receptor	6q25.1	Breast	Hormone insensitivity
PR	Progesterone receptor	11q22	Breast	Hormone insensitivity
AR	Androgen receptor	Xq11	Prostate	Hormone insensitivity
PRLR	Prolactin receptor	5p13-p12	Breast	Hormone insensitivity
RAR β 2	Retinoic acid receptor β 2	3p24	Colon, lung, head and neck	Vitamin insensitivity?
RASSF1A	Ras effector homologue	3p21.3	Multiple types	Unknown
NORE1A	Ras effector homologue	1q32	Lung	Unknown
VHL	Ubiquitin ligase component	3p25	Kidney, haemangioblastoma	Loss of hypoxic response?
Rb	Cell cycle inhibitor	13q14	Retinoblastoma	Entrance in cell cycle
THBS-1	Thrombospondin-1, anti-angiogenic	15q15	Glioma	Neovascularization
CDH1	E-cadherin, cell adhesion	16q22.1	Breast, stomach, leukaemia	Dissemination
CDH13	H-cadherin, cell adhesion	16q24	Breast, lung	Dissemination?
FAT	Cadherin, tumour suppressor	4q34-35	Colon	Dissemination?
HIC-1	Transcription factor	17p13.3	Multiple types	Unknown
APC	Inhibitor of β -catenin	5q21	Aerodigestive tract	Activation β -catenin route
SFRP1	Secreted Frizzled-related protein 1	8p12-p11	Colon	Activation WNT signalling
COX-2	Cyclo-ox genase-2	1q25	Colon, stomach	Anti-inflammatory resistance?
SOCS-1	Inhibitor of JAK/STAT pathway	16p13.13	Liver, myeloma	JAK2 activation
SOCS-3	Inhibitor of JAK/STAT pathway	17q25	Lung	JAK2 activation
GATA-4	Transcription factor	8p23-p22	Colon, stomach	Silencing of target genes
GATA-5	Transcription factor	20q13	Colon, stomach	Silencing of target genes
SRBC	BRCA1-binding protein	1p15	Breast, lung	Unknown
SYK	Tyrosine kinase	9q22	Breast	Unknown
RIZ1	Histone/protein methyltransferase	1p36	Breast, liver	Aberrant gene expression?
DAPK	Pro-apoptotic	9q34.1	Lymphoma, lung, colon	Resistance to apoptosis
TMS1	Pro-apoptotic	16p11	Breast	Resistance to apoptosis
TPEF/HPP1	Transmembrane protein	2q33	Colon, bladder	Unknown
HOXA9	Homeobox protein	7p15-p14	Neuroblastoma	Unknown
IGFBP3	Growth factor-binding protein	7p14-p12	Lung, skin	Resistance to apoptosis
EXT1	Heparan sulphate synthesis	8q24	Leukaemia, skin	Cellular detachment

Taula 3. Llistat d'alguns dels gens silenciats per hipermetilació de la seva regió promotora, en diferents tipus de càncer. Extret de Esteller, 2005.

Així doncs, sembla bastant clar que la hipermetilació constitueix una alteració funcional en el genoma de la cèl.lula tumoral. Ara bé, el mecanisme pel qual es dona

aquest tipus d'alteració no està massa clar. Mentre que el paper de la metilació en el manteniment del silenciament gènic ha estat clarament demostrat en els darrers anys (Rhee *et al*, 2002; Robert *et al*, 2003), la implicació de la metilació en el silenciament inicial ha estat molt qüestionada (Bestor, 2003). En aquest sentit, diversos treballs han ressenyat la importància d'altres mecanismes en el silenciament inicial dels gens (Hajra *et al*, 1999; Clark i Melki, 2002; Bachman *et al*, 2003).

Els patrons de metilació de les illes CpG no es donen a l'atzar; mentre que la hipermetilació d'alguns gens es produeix en múltiples tumors, d'altres són metilats de manera tumor específica (Costello *et al*, 2000). Aquesta distribució no uniforme suggereix que darrere d'aquesta susceptibilitat variable hi podria haver mecanismes que influïrien diferencialment els tumors. Així, s'ha proposat la utilització de perfils d'hipermetilació específics per cada tipus de tumor per tal d'entendre els mecanismes subjacents en l'evolució tumoral, així com la seva possible utilització en la detecció del càncer (Esteller *et al*, 2001b).

Una altra característica remarcable de la hipermetilació ha estat la seva associació amb el procés d'envelliment. Estudis quantitius en càncer de còlon han mostrat que molts dels gens altament hipermetilats en càncer també tenien petites, però mesurables, quantitats de metilació en la mucosa de còlon normal i que aquesta hipermetilació augmentava de forma lineal amb l'edat (Issa *et al*, 1994; Ahuja *et al*, 1998). Alguns exemples dels gens que segueixen aquesta tendència en càncer de còlon són: CDKN2A (Herman *et al*, 1997), un inhibidor d'angiogènesi THBS1 (Li *et al*, 1999), el supressor de metàstasi TIMP3 (Cameron *et al*, 1999) i el gen reparador de *mismatch* MLH1 (Kane *et al*, 1997).

Finalment, m'agradaria destacar l'estreta relació entre canvis genètics i canvis en la metilació de l'ADN que es produeix en alguns casos concrets. Un dels vincles més clars entre els dos tipus d'alteracions té lloc en la inactivació epigenètica dels gens reparadors de l'ADN. Per exemple, el silenciament de MLH1 en càncer colorectal esporàdic es tradueix en una deficiència reparadora del *mismatch* (Kane *et al*, 1997). S'ha estimat que en un 84% dels casos aquest silenciament està provocat per la hipermetilació de la zona promotora (Herman *et al*, 1998). Un altre exemple el constitueix el gen *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)*, una proteïna reparadora de l'ADN que es troba freqüentment hipermetilada en càncer de còlon (Esteller *et al*, 1999). Aquesta inactivació s'associa a la manca de reparació en les transicions de guanines a adenines en l'oncogen k-ras (Esteller *et al*, 2000) i el GST p53 (Esteller *et al*, 2001c; Wolf *et al*, 2001). Per tant, aquests dos gens són dos

exemples paradigmàtics de com una alteració epigenètica inicial desencadena un augment en les alteracions genètiques posteriors.

6.2 Mecanismes de silenciament.

S'han plantejat dues maneres diferents en les quals la metilació pot reprimir la transcripció, i és molt probable que les dues siguin biològicament rellevants. Una primera proposta es fa a través de la interferència directa del grup metil en la unió entre les proteïnes reguladores de l'expressió i la seqüència d'ADN corresponent. Es coneixen molts factors que s'uneixen el dinucleòtid CpG, i alguns d'aquests no s'hi poden unir quan la seqüència de reconeixement està metilada.

Resultats importants a favor d'aquesta proposta són els obtinguts en l'estudi de la proteïna CTCF en el *locus imprintat* H10/Igf2 en ratolí (Bell i Felsenfeld 2000; Hark *et al*, 2000; Szabo *et al*, 2000; Holmgren *et al*, 2001). CTCF és un factor de transcripció del tipus *Zing-finger* (factor d'unió CCCTC) que s'ha vist implicat en la formació dels límits i l'aïllament cromatínic dels gens *imprintats* (Bell i Felsenfeld, 2000). Malgrat que hi ha treballs en què es posa de relleu la presència d'altres processos en el control d'aquesta regió *imprintada* (Ferguson-Smith i Surani, 2001), el paper desenvolupat per la proteïna CTCF representa un dels exemples més clars de regulació transcripcional per metilació de l'ADN (revisat a Ohlsson *et al*, 2001). A part de CTCF, es coneixen altres factors de transcripció l'acció dels quals es bloqueja per la metilació (Tate i Bird, 1993), però les conseqüències biològiques d'aquest procés són desconegudes.

La segona manera de repressió és totalment oposada a la primera, ja que en aquest cas no hi ha un efecte de repulsió, sinó tot el contrari, atracció envers unes proteïnes determinades. La caracterització de MeCP2 (Lewis *et al*, 1992) i els seus relatius, proteïnes que presenten domini d'unió al dinucleòtid CpG metilat (mCpG) MBD1-MBD4 (Hendrich i Bird, 1998), així com la proteïna no relacionada Kaiso (Prokhortchouk *et al*, 2001), han estat claus per entendre el mecanisme de repressió (revisat a Wade, 2001; Hendrich i Tweedie, 2003). Estudis diversos han identificat un domini comú d'unió específica a mCpG (excepte per MBD3). Un segon grup d'experiments de gran importància per entendre el mecanisme d'acció d'aquestes proteïnes ha estat la descripció de la interacció entre MeCP2 i un complex co-repressor en el qual hi havia HDAC (Jones *et al*, 1998; Nan *et al*, 1998). També s'ha descrit l'associació de MBD2 amb HDAC (Ng *et al*, 1999; Feng *et al*, 2001).

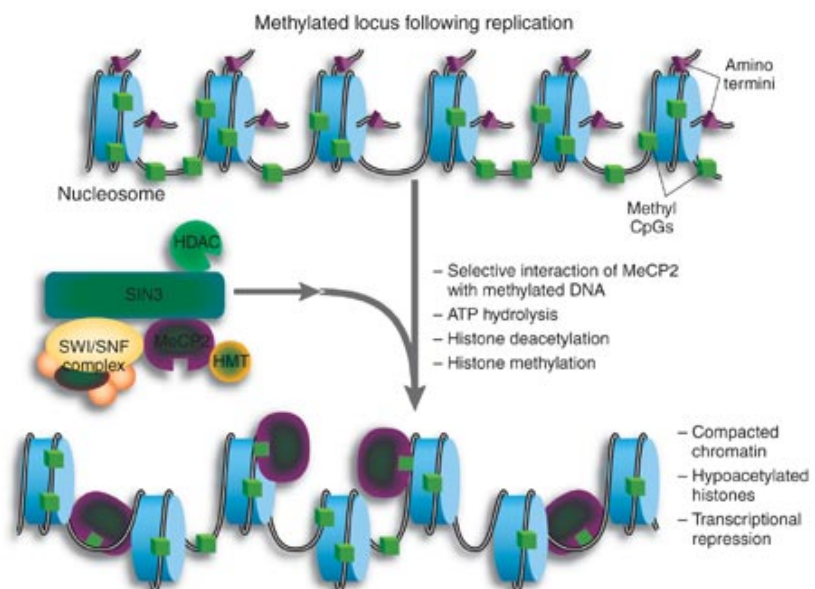
Aquest vincle entre metilació i repressió va representar una fita històrica que oferia una resposta a una gran qüestió en el camp de la metilació a finals dels anys noranta.

Tanmateix, el descobriment que les DNMT també es podien associar directament amb altres proteïnes modificadores d'histones va afegir un esglaó més de complexitat en la relació entre la metilació de l'ADN i l'estructura cromatínica (revisat a Burgers *et al*, 2002). Molt recentment, en humans, s'ha demostrat la interacció entre una MBD (MeCP2) i *Brahma*, una subunitat ATPasa del complex SWI/SNF, establint-se un nou vincle entre metilació genòmica i estructura cromatínica (Harikrishnan *et al*, 2005).

Actualment, aquesta relació entre els dos fenòmens epigenètics constitueix un dels grans temes de debat (vegeu el darrer apartat d'aquesta introducció). Així, tenim treballs a favor del paper predominant de la metilació respecte de les modificacions de les histones (Stirzaker *et al*, 2004; Hashimshony *et al*, 2003; Fahrner *et al*, 2002) i viceversa (Bachman *et al*, 2003; Tamaru *et al*, 2001; Jackson *et al*, 2002). En càncer, de manera general, s'accepta que els complexos repressors estan localitzats a la regió promotora hipermetilada a través de les proteïnes MBD (El Osta *et al*, 2002; Magdinier i Wolffe, 2001). Aleshores, la metilació actuarà de plataforma per tota una sèrie d'esdeveniments posteriors on hi hauria una modificació seqüencial de les histones (desacetilació, metilació i unió de proteïnes reguladores de la cromatina) que culminarien amb un estat no actiu de la zona promotora (vegeu la figura 8). Aquest conjunt de canvis presenten una qüestió inicial bàsica: qui determina la hipermetilació de illes CpG específiques? Donada la manca d'especificitat en les DNMTs (Yoder *et al*, 1997), s'han proposat dues alternatives no excloents: (1) alteracions en l'estructura cromatínica (Bird, 2002; Burgers *et al*, 2002), i (2) proteïnes d'unió a seqüències específiques (Di croce *et al*, 2002; Brenner *et al*, 2005).

Figura 8.

Un dels escenaris possibles en els quals MeCP2 i el complex SWI/SNF cooperen en l'establiment o manteniment de la repressió transcripcional d'un *locus* metilat. El resultat final és una estructura cromatínica tancada. Extret de Wade, 2005.



6.3 Implicacions translacionals.

La diferència entre un silenciament gènic provocat per una mutació o bé, un canvi epigenètic, és que aquesta darrera inactivació és reversible. És aquesta reversibilitat la que confereix al canvi epigenètic una oportunitat única per al tractament clínic del càncer. El desenvolupament d'estratègies per revertir el silenciament gènic pot ajudar en la prevenció i tractament del procés tumoral. Una segona implicació translacional és la de marcador molecular. La hipermetilació presenta tota una sèrie de característiques associades que la fan especialment atractiva per aquest ús. A continuació, es fa un breu resum d'aquestes dues principals implicacions translacionals:

(a) *Reversibilitat del silenciament gènic.* A partir de la importància biològica dels gens implicats en el silenciament epigenètic al llarg del procés tumoral, resulta obvi que la seva reexpressió pot tenir un efecte antitumoral important. Fins i tot, donat que aquests canvis són molt primerencs, es podria pensar com un efecte de prevenció. S'han descrit moltes substàncies com a agents desmetilants o modificadors de les histones (vegeu taula 4), i algunes d'aquestes substàncies s'estan provant a nivell clínic (revisat a Egger *et al*, 2004; Herman i Baylin, 2003). Els vincles entre metilació de l'ADN i modificació de les histones ha obert noves possibilitats terapèutiques.

Target	Drug	Clinical trials
DNA methylation	5-Azacytidine	Phase I/II/III
	5-Aza-2'-deoxycytidine	Phase I/II/III
	FCDR	
	Zebularine	
	Procainamide	
	EGCG	Phase I
	Psammaplin A	
	Antisense oligomers	Phase I
Histone deacetylase	Many ⁵⁶ , including:	
	Phenylbutyric acid	Phase I/II
	SAHA	Phase I/II
	Depsipeptide	Phase I/II
	Valproic acid	Phase I/II

EGCG, epigallocatechin-3-gallate; FCDR, 5-fluoro-2'-deoxycytidine; SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid.

Taula 4. Llistat de drogues epigenètiques. Extret de Egger et al, 2004.

El sinergisme observat entre la desmetilació i la inhibició de les HDAC (Cameron *et al* 1999; Suzuki *et al* 2002; Yamashita *et al*, 2002) ha propiciat el desenvolupament de nous assaigs clínics dirigits a aquestes dues modificacions (Shaker *et al*, 2003; Claus i Lubbert, 2003). En el cas dels agents desmetilants, aquests presenten importants problemes associats, que sens dubte caldrà superar si es volen utilitzar a nivell clínic. Un primer problema és la seva toxicitat, en part provocada per la seva incorporació a l'ADN (Ferguson *et al*, 1997; Jackson-Grusby *et al*, 1997). La manca d'especificitat segueix essent una de les principals preocupacions, ja que pot desencadenar una expressió no desitjada a oncogens, elements transposables i gens *imprintats* o del cromosoma X, sense descartar un possible augment de la inestabilitat genòmica (vegeu l'apartat 5). Desafortunadament, pocs treballs han estudiat els efectes d'aquestes substàncies en cèl·lules normals. Finalment, l'avantatge que representa la reversibilitat d'aquests canvis en tractaments llargs pot provocar importants problemes. Així, en sistemes experimentals s'ha observat que l'aturada del tractament va acompanyada d'una nova metilació del promotor i posterior silenciament del gen (Pfeifer *et al*, 1990b).

(b) *Marcador molecular*. La hipermetilació presenta una sèrie d'avantatges que la fan especialment atractiva com a marcador molecular. Al tractar-se d'ADN, aquest presenta una estabilitat major respecte l'ARN i algunes proteïnes. A més, aquest canvi és comú a tots els tipus de càncer, així pannels de gens poden ser dissenyats per tal que l'anàlisi d'uns pocs gens doni positiu en més d'un 70 % de tots els tipus de càncer (Esteller *et al*, 2001b). Un important aspecte pràctic el determina la seva anàlisi. Mentre que les mutacions es poden donar en múltiples llocs al llarg del gen, la hipermetilació només es dona a la zona promotora del gen. A nivell pràctic, això comporta que un sol assaig permet analitzar tots els pacients. Alhora, la seva detecció constitueix un senyal positiu enfront d'una no metilació en situació normal. Aquest fet confereix un cert avantatge en la seva detecció si ho comparem, per exemple, a les pèrdues d'heterozigositat, on un senyal negatiu ha de ser reconegut en un fons positiu. Finalment, cal destacar un dels seus principals avantatges: l'aparició primerenca d'aquesta alteració al llarg del procés tumoral. Tot aquest conjunt d'avantatges han facilitat que els canvis de metilació s'hagin proposat com a marcadors moleculars de detecció, pronòstic i risc (revisat a Sidransky, 2002; Rashid i Issa, 2004; Herman i Baylin, 2003).

7 ALTRES MECANISMES EPIGENÈTICS

7.1 Definició d'epigenètica.

L'origen etimològic del terme 'epigenètica' el trobem en l'autor Waddington el 1942 (Waddington, 1942). El va definir com l'estudi de la interrelació entre genotip i fenotip. En el seu article proposava una definició general del terme, que englobava l'estudi de tots els processos en els quals el genotip originava el fenotip. Aquesta definició s'ha mantingut durant diverses dècades. El 1987, en un article publicat a la revista *Science*, l'australià Robin Holliday, escrivia textualment: *“Les propietats dels gens en organismes superiors poden ser estudiades a dos nivells: l'estudi del mecanisme de la seva transmissió de generació en generació, que és el component central de la genètica i que és ben conegut; i a un segon nivell, l'estudi dels mecanismes durant el desenvolupament dels organismes que van des d'un òvul fecundat fins a un individu adult, que són pràcticament desconeguts. Els canvis en l'activitat gènica durant el desenvolupament sovint són anomenats epigenètics.”*

Uns quants anys després, el mateix Holliday va suggerir dues variacions o puntualitzacions. En la primera, l'autor destacava que els canvis en l'expressió genètica no només s'originen durant l'etapa de desenvolupament, sinó que també es poden donar en l'etapa d'adult d'un organisme. D'acord amb això, ell suggereix l'ús del terme 'epigenètica' per a l'estudi dels canvis en l'expressió gènica, que es produeixen en organismes amb cèl·lules diferenciades i mitòticament heretables. L'autor emfasitza que la seva definició no diu res sobre els mecanismes i, per tant, hi són inclosos tots els tipus d'interaccions ADN-proteïna, així com els canvis a nivell d'ADN.

Aquesta nova definició comporta un nou problema: què entenem per heretabilitat? Com es veu afectada aquesta heretabilitat? L'autor recorda que l'ADN pot estar subjecte a canvis permanents de seqüència durant el desenvolupament, i que d'aquests canvis s'esperaria que fossin heretats a través de la divisió cel·lular. L'autor menciona que els canvis heretats en l'expressió gènica poden ser revertits a estadis posteriors, algunes vegades després de la meiosi. És en aquest context que Holliday suggereix un segon canvi: una definició suplementària al terme 'epigenètica' per poder incloure transmissió de la informació d'una generació a una altra, diferent a la seqüència d'ADN; en altres paraules, herència nuclear, que no està basada en diferències en la seqüència d'ADN. Finalment, si ajuntem les dues puntualitzacions, obtindrem la definició actual del terme 'epigenètica'. Així doncs, el terme combina el concepte de canvis en l'expressió gènica i la seva implicació en l'herència mitòtica

(primer suggeriment) i també a través de generacions, és a dir, herència meiòtica (segona puntualització), quedant la definició actual com l'estudi dels canvis en la funció gènica que són heretats mitòticament i/o meiòticament i que no impliquen un canvi en la seqüència de l'ADN.

Basant-se en aquesta definició, fins fa poc només hi havia dos sistemes epigenètics que complien els criteris d'heretabilitat mitòtica: la metilació de l'ADN i els complexos de proteïnes dels grups *Polycomb-tritorax* (*PcG/trxG*) (Bird, 2002). En els darrers dos anys, dins de les múltiples modificacions de la cromatina, la metilació de les histones ha passat a formar part dels sistemes epigenètics. La resta de modificacions presenten alguns atributs dels processos epigenètics. De tots aquests sistemes epigenètics, l'heretabilitat meiòtica encara s'ha de resoldre. De la metilació de l'ADN ja se n'ha parlat extensament al llarg d'aquesta introducció, per tant, la darrera part la dedicaré a desglossar les principals característiques dels altres dos sistemes: *PcG/trxG* i modificacions de les histones.

7.2 Grups *Polycomb-tritorax*.

Els gens del grup *PcG* i *trxG* formen part d'un sistema de memòria cel·lular que es troba evolutivament conservat des de *Drosophila* fins a mamífers. Ambdós grups (*PcG* i *trxG*) estan formats per complexos multiproteics que són dirigits a regions específiques del genoma, on mantenen l'estat d'expressió embrionari d'un o diversos grups de gens, sigui actiu o inactiu, al llarg del desenvolupament. Així, aquests patrons d'expressió són establerts durant la vida embrionària i sostinguts durant la resta del desenvolupament i vida adulta. Els gens que es veuen afectats per aquesta regulació epigenètica van des de gens clau en el cicle cel·lular fins a gens importants en el desenvolupament.

Un exemple en són els gens *homeobox*. Es calcula que hi ha almenys 200 gens *homeobox* en el genoma humà, dividits en diferents famílies (Tupler *et al*, 2001). La funció d'aquests gens és essencial per al creixement i diferenciació cel·lular; la seva desregulació sovint s'ha descrit en el procés tumoral (revisat a Abate-Shen, 2002; Cillo *et al*, 2001). La implicació del sistema *PcG* en el manteniment de les característiques totipotents de les cèl·lules mare i la seva relació en el procés tumoral també ha estat objecte de nombrosos treballs (revisat a Valk-Lingbeek *et al*, 2004).

Les proteïnes que codifiquen per *PcG* actuen normalment com a repressors de l'expressió gènica. D'altra banda, els gens *trxG* solen tenir efectes activadors d'aquesta expressió. Cal dir que alguns gens tenen ambdós fenotips, *PcG* i *trxG*, i per

tant, l'associació de trxG amb només activació i PcG amb repressió no deixa de ser una simplificació (Brock i van Lohuizen, 2001).

El gran nombre de proteïnes PcG i trxG, juntament amb la mida dels complexos que formen i la naturalesa de la cromatina, han propiciat que el mecanisme d'actuació PcG/trxG hagi estat desconegut durant molt temps (Francis i Kingston, 2001). Malgrat tot, la recerca intensa durant la darrera dècada en l'estructura de la cromatina i les proteïnes que la modifiquen ha posat de relleu la importància d'aquest canvi en el seu mecanisme d'acció. En el cas de PcG, s'han descrit dos complexos multiproteics: el complex repressor de *Polycomb 2* (PRC2), que està implicat en el procés d'iniciació del silenciament; i el complex repressor de *Polycomb 1* (PRC1), que està implicat en el manteniment del silenciament gènic (revisat a Lund i van Lohuizen, 2004a).

La descripció del component de PRC2, E(Z), com a *histone methyl transferases* (HMT) de la lisina 27 en la histona H3 (revisat a Cao i Zhang, 2004) és un exemple molt clar de la interrelació entre PcG/trxG i estructura cromatínica. La conservació de les proteïnes que formen part d'aquests complexos remodeladors de les histones, així com de les seves interaccions i activitats en mamífers, fa pensar en un mecanisme d'actuació conservat al llarg de l'evolució, malgrat que els gens diana i la composició dels complexos puguin ser diferents (revisat a Lund i van Lohuizen, 2004a). Fins fa pocs anys, la seva acció s'atribuïa al fet de mantenir els gens reprimits en un entorn heterocromàtic, que exclouïa els activadors transcripcionals, amb un estat no transcripcional com a resultat final (Paro, 1990). Tanmateix, els treballs presentats en els darrers anys manifesten una visió més dinàmica del procés de silenciament, on el resultat final ve donat per l'equilibri de forces transcripcionals oposades (Orlando, 2003). Inesperadament, dins d'aquest sistema de memòria cel·lular complex s'hi han vist implicats factors de transcripció generals, com el complex de la RNA pol II i, possiblement, RNA no codificant. Tot plegat denota un sistema de regulació gènica molt més complex i elaborat, en el qual la cromatina hi juga un paper principal.

7.3 Modificacions de les histones.

Trenta anys enrere, una fotografia al microscopi electrònic mostrava clarament que el genoma eucariòtic presentava una estructura repetitiva, el nucleosoma (Oudet *et al*, 1975). En el mateix treball ja es comentava la possible relació del nucleosoma amb la funció del genoma eucariòtic: “*És temptador relacionar la fracció del genoma empaquetada dins de nucleosomes amb la fracció genòmica que mai és expressada. [...] És possible que [...] la fracció de DNA lliure es correspongui a la fracció de genoma*

que s'expressa en un moment determinat i per a un tipus cel·lular determinat'. Aquesta predicció encaixa perfectament amb les observacions recents, en què es mostren les zones promotores actives amb l'ADN lliure de nucleosomes (Boeger *et al*, 2003). Malgrat aquest exemple, la visió actual de la funció del nucleosoma és bastant més complexa (revisat a Khorasanizadeh, 2004). Durant les últimes quatre dècades, s'ha descrit un gran nombre de modificacions posttraduccionals de les histones. No obstant això, la descripció detallada de certes modificacions correlacionades amb regulacions específiques dels nucleosomes, conjuntament amb la identificació de les proteïnes que porten a terme aquests canvis, s'ha dut a terme principalment durant la darrera dècada. Les modificacions covalents que poden tenir lloc a les histones són l'acetilació de les lisines, la metilació de les lisines i arginines, la fosforilació de les serines i treonines, l'ubiquïtinització de les lisines, la sumolització de les lisines i l'ADP-ribosilació dels àcids glutàmics (vegeu la figura 9; revisat a Peterson i Laniel, 2004). Afegint complexitat al sistema, tenim el fet que cada lisina pot acceptar un, dos o tres grups metil, mentre que les arginines poden estar mono- o dimetilades. La majoria d'aquestes modificacions posttraduccionals afecten els dominis amino- i/o carboxiterminals, malgrat que cada vegada són més els exemples de modificacions en els dominis centrals de les histones (van Leeuwen i Gottschling, 2002).

El mecanisme d'actuació de les modificacions posttraduccionals no sembla ser una reestructuració directa dels nucleosomes. Treballs comparatius a nivell estructural entre histones modificades posttraduccionals i histones recombinades, que no presenten cap d'aquestes modificacions, mostren estructures pràcticament idèntiques (Zhang *et al*, 2002). El mecanisme d'actuació respon a un principi biològic general, inicialment establert en les cascades de senyalització dependents de fosforilació (Fischle *et al*, 2003; Schreiber i Bernstein, 2002). Aquest mecanisme es basa en uns senyals que són dipositats, en aquest cas, sobre les histones. Al seu torn, aquests senyals són reconeguts per proteïnes que tenen un mòdul estructural capaç de reconèixer-los i que, alhora, són capaces d'aglutinar més proteïnes, originant un complex que donarà lloc a una resposta biològica (revisat a De la Cruz *et al*, 2005). Un altre fenomen biològic general observat en les modificacions de les histones és el de la redundància de senyals, possibilitant una resposta quantitativa (Fischle *et al*, 2003). Seguidament, es fa una breu descripció de les dues primeres modificacions covalents citades, acetilació i metilació de les histones, i també s'expliquen les modificacions no covalents de les histones.

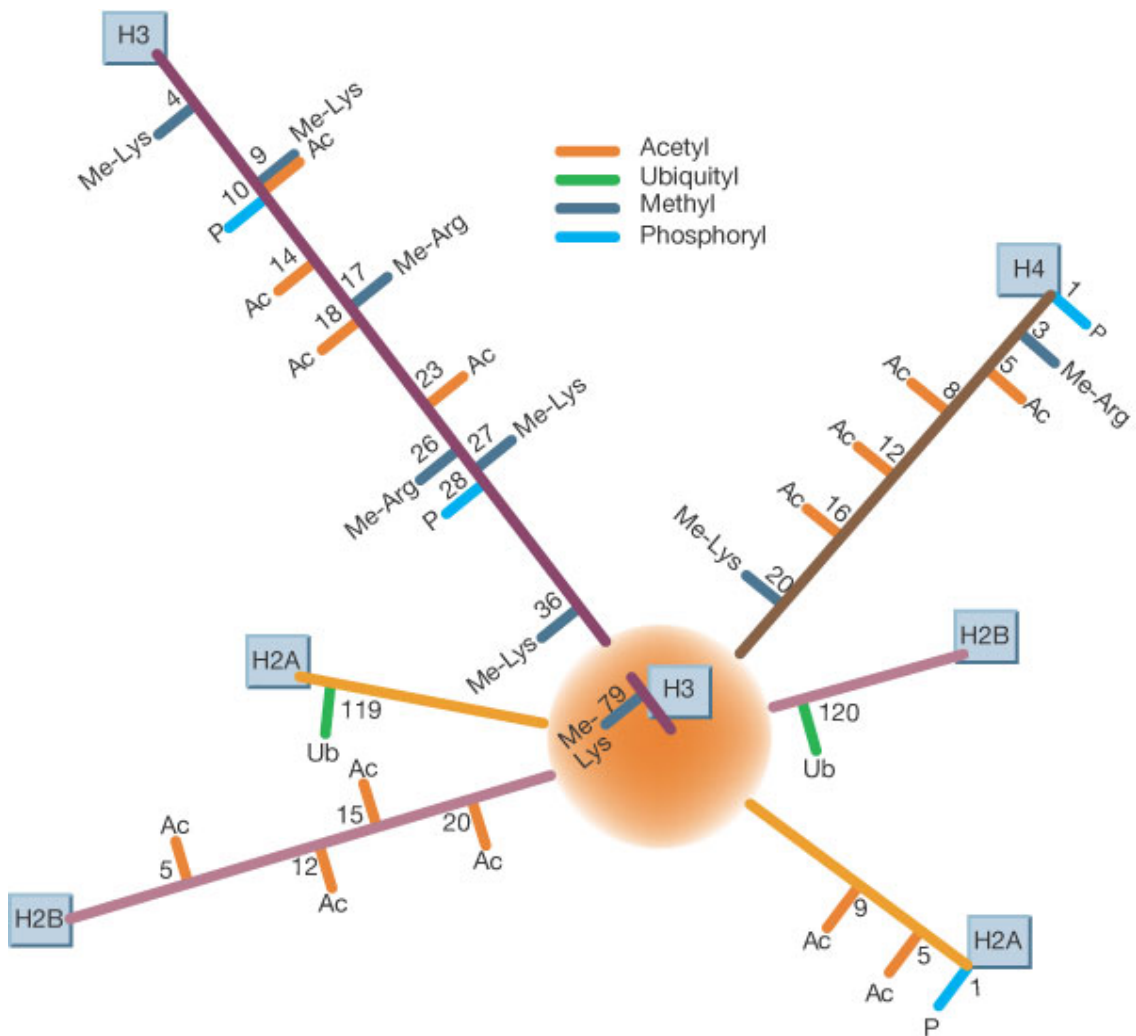


Figura 9. Modificacions de les histones. Cada modificació presenta un color diferent. S'indica la posició de l'aminoàcid canviat. Extret de Felsenfeld i Groudine, 2003.

7.3.1 Acetilació de les histones.

L'acetilació de les histones correlaciona amb l'activació transcripcional i és un equilibri dinàmic governat per accions oposades de les *histone acetyltransferases* (HAC) i les *histone deacetylases* (HDAC) (Vogelauer *et al*, 2000). El domini HAC és el responsable de l'acetilació de les histones (revisat a Roth *et al*, 2001) i aquesta modificació és revertida per les HDAC (revisat a Marmorstein, 2001). Aquests dominis generalment es troben en el context de grans complexos proteics, originant una gran diversitat d'accions en contextos diferents. Tanmateix, una lisina acetilada presenta un residu bàsic que permet el seu reconeixement a través del mòdul *bromodomain*, una seqüència de cent aminoàcids conservada en moltes proteïnes associades a cromatina, fet que encara augmenta més la diversitat funcional de l'acetilació de les histones (Khorasanizadeh, 2004). Concretament, aquesta modificació posttraduccional

s'ha vist implicada, a part de la regulació en la transcripció gènica, en la regulació de la replicació de l'ADN, en la deposició de les histones i en mecanismes de reparació de l'ADN (Iizuka i Smith, 2003), entre d'altres.

7.3.2 Metilació de les histones.

Els enzims responsables de la metilació de les histones són les *HMTs* i són específiques per lisines o bé arginines. Des de la primera HMT, identificada a l'any 2000 (Rea *et al*, 2000), fins a l'actualitat, s'han descrit tot una sèrie de HMT (revisat a Schotta *et al*, 2004 i Sims *et al*, 2003). Contrastant amb l'acetilació, la metilació de les histones s'associa tant a activitat transcripcional com repressora, depenent específicament del residu d'arginina o lisina implicat.

L'exemple paradigmàtic d'aquesta doble actuació és que la metilació de H3 lys4 s'associa a eucromatina i gens transcripcionalment actius, mentre que la metilació de H3 lys9 s'observa en heterocromatina i gens transcripcionalment reprimits (Lachner i Jenuwein, 2002). Exceptuant la HMT Dot1, que no presenta domini SET (van Leeuwen *et al*, 2002), la resta de HMT presenta el domini SET, que conté l'activitat enzimàtica responsable de la metilació (revisat a Kouzarides, 2002). El mòdul encarregat de llegir el senyal de metilació de les histones és l'anomenat *chromodomain* (revisat a Brehm *et al*, 2004). Aquesta estructura és altament específica, essent capaç de distingir entre els diferents graus de metilació d'un residu determinat.

No obstant això, aquests dominis es troben associats a una gran diversitat de proteïnes com són: proteïnes modificadores de nucleosomes, proteïnes que presenten dominis HAT, SET i/o dominis ATPase. La identificació d'enzims que catalitzen la desmetilació de les histones és molt recent (Shi *et al*, 2004). Durant molt temps, s'ha pensat que la metilació de les histones, a diferència d'altres modificacions posttraduccionals, era un senyal permanent, la qual cosa justificava un paper principal d'aquesta modificació en l'herència epigenètica. Encara que l'acció desmetilasa descrita no presenta activitat desmetilasa respecte de les lisines trimetilades, sembla clar que la descripció de més proteïnes amb activitat desmetilasa és qüestió de temps (Kubicek i Jenuwein, 2004). Malgrat tot, la metilació de les histones ha estat directament implicada en l'herència epigenètica (revisat a Lachner *et al*, 2003).

Certs activadors i repressors juguen un paper important en l'expansió i manteniment dels estats genètics, de manera que són mantinguts a les següents generacions. En són dos exemples diferents: (1) la unió de la proteïna HP1 (*Heterochromatic Protein*) a la metil-lisina 9 de la histona H3 i el seu paper en la condensació cromatínica i silenciament gènica (revisat a Maison i Almouzni, 2004); i (2) la proteïna *Polycomb* que

s'uneix a la metil-lisina 27 de la histone 3 a través del seu *chromodomain* per portar a terme el silenciament gènic durant les etapes de desenvolupament (revisat a Cao i Zhang, 2004). La metilació de les histones, així com l'acetilació, no només ha estat implicada en la regulació transcripcional, sinó també en altres processos com: silenciament dels telòmers (Garcia-Cao *et al*, 2004) i reparació de l'ADN (Sanders *et al*, 2004).

La modificació covalent de les histones no és l'únic mecanisme capaç de reestructurar la cromatina. Aquest procés també pot originar-se a partir de dos mecanismes que no impliquen un canvi covalent a les histones: (1) utilitzant remodeladors de cromatina dependents d'ATP i (2) a partir de la utilització de variants de les histones convencionals.

7.3.3 Remodeladors de cromatina dependents d'ATP.

Aquests remodeladors operen a nivell de nucleosoma i són capaços de pertorbar l'estructura cromatínica a partir de la hidròlisi de l'ATP. Aquest mecanisme d'actuació es troba conservat des d'en llevats fins en humans (revisat a Flaus i Owen-Hughes, 2003). Molts d'aquests complexos remodeladors pertanyen a la família SWI/SNF. Generalment, actuen en grans complexos moleculars on hi ha una àmplia varietat de proteïnes cromatíniques, incloses les HDAC (Narlicar *et al*, 2002). En els darrers anys, s'ha observat que un gran nombre de gens supressors de tumors regulen la transcripció gènica a partir de la unió amb aquests modificadors de la cromatina, manifestant una estreta relació entre aquests remodeladors i el procés tumoral (revisat a Roberts i Orkin, 2004; Gregory i Shiekhhattar, 2004).

7.3.4 Variants d'histones.

L'expressió de les histones principals està subjecta a una estricta regulació al llarg del cicle cel·lular. Aquestes histones són agrupades al voltant de l'ADN a partir d'un fort acoblament amb el procés de replicació. Les variants d'histones, en canvi, no estan subjectes a aquesta regulació específica. La seva expressió té lloc al llarg del cicle cel·lular, sintetitzant-se durant i després de la fase S. Algunes d'aquestes variants presenten propietats biofísiques diferents, que donen propietats diferencials als nucleosomes; d'altres presenten localitzacions genòmiques específiques. A diferència de les histones principals, els gens de les variants presenten introns i els transcrits sovint són poliadenilats. S'ha suggerit que aquestes característiques podrien ser importants en la seva regulació posttranscripcional. Aquest conjunt d'observacions suggereix que les variants d'histones podrien tenir un paper destacat en la regulació de l'estructura cromatínica (revisat a Kamakaka i Biggins, 2005; Sarma i Reinberg,

2005). Així, per exemple, les variants d'histones H2A.X, H1.2 i CENP-A juguen un paper destacat en els processos de reparació de l'ADN, d'apoptosi induïda per dany genòmic i de mitosi, respectivament (Gregory i Shiekhattar, 2004).

7.4 Inestabilitat epigenètica?

Al principi d'aquesta introducció es parla del concepte d'inestabilitat genètica com a mecanisme o força motora del procés tumoral. Després d'introduir el terme 'epigenètica' i fer una breu descripció dels sistemes que en formen part. Em sembla molt oportú tancar aquesta introducció parlant del concepte d'inestabilitat epigenètica, i de la seva possible vinculació al procés tumoral.

A l'apartat 1.3, apuntava com a origen de la inestabilitat genètica la pèrdua de funcions cel·lulars bàsiques. En aquest sentit, el descobriment d'una complexa xarxa de mecanismes implicats en la regulació de la funció gènica sense alterar la seqüència d'ADN, és a dir, mecanismes epigenètics, no ha fet més que confirmar i posar de relleu el paper principal de la cromatina i, per tant, de l'epigenètica en processos tan essencials com replicació, reparació, recombinació i regulació transcripcional.

Les primeres descripcions d'alteracions epigenètiques es van realitzar setanta-cinc anys enrere, quan H.J. Muller va descriure diversos exemples de mosques de *Drosophila*, que presentaven fenotips de colors d'ull variegats, després de la irradiació amb raigs X. Aquestes diferències es van atribuir a reorganitzacions cromosòmiques que juxtaposaven regions eucromàtiques a regions heterocromàtiques, originant una diferència d'expressió dels gens a prop del punt de trencament, fenomen que s'anomenà *Position-Effect Variegation (PEV)*. Els fenotips PEV han estat un misteri fins fa pocs anys ja que la seva naturalesa estocàstica i clonal no estava contemplada en els paradigmes d'expressió gènica estàndard (Dillon i Festenstein, 2002). El problema va créixer amb el descobriment d'altres fenòmens epigenètics, incloent efecte de posició telomèrica, silenciament gènic induït per repeticions, així com variegació transgènica (Ahmad i Henikoff, 2002). El cert és que fenòmens epigenètics que mostren fenotips inestables semblants es poden trobar pràcticament en tots els llinatges eucariòtics, i això fa pensar en un mecanisme comú subjacent.

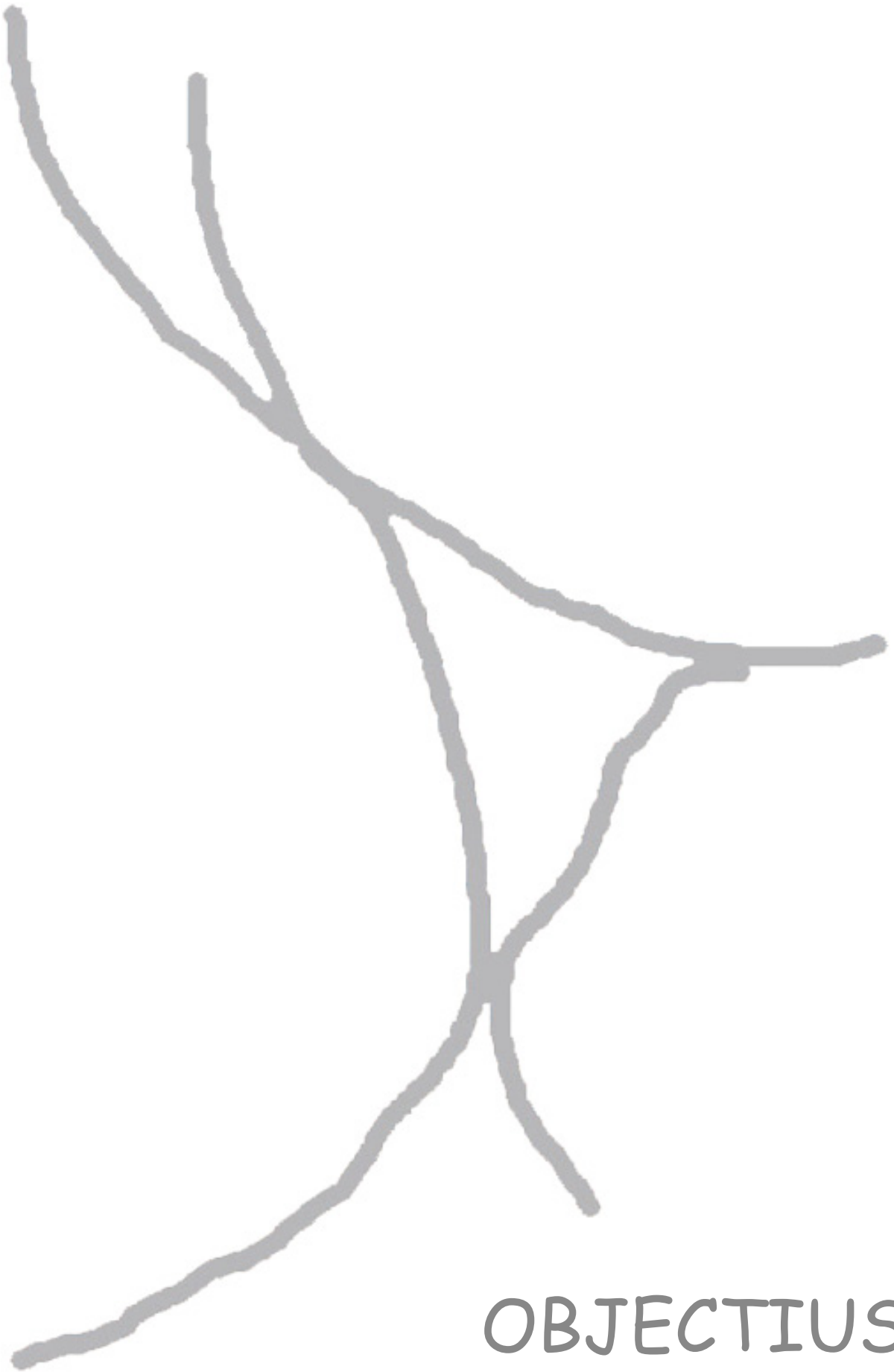
En els darrers anys, s'ha evidenciat una complexa xarxa d'interaccions entre els diferents mecanismes de control de la cromatina. Un exemple d'aquest nivell de complexitat i interrelació es mostra a la figura 10 (resumit a Craig, 2005). Aquesta figura no deixa de ser una simplificació dels mecanismes que alteren la cromatina, ja que no tenen en compte la replicació epigenòmica (resumit a McNairn i Gilbert, 2003;

Gilbert , 2002) i la posició de la cromatina dins del nucli, és a dir, regulació a nivell nuclear (revisat a Misteli, 2004, O'Brien TP *et al*, 2003; van Driel *et al*, 2003). Així doncs, davant d'aquest entramat molecular, on els mecanismes epigenètics tenen un paper principal, crec que no resulta gens agosarat pensar en la inestabilitat epigenètica com una important força de progressió tumoral. De fet, la relació entre els mecanismes epigenètics i el procés tumoral ha estat objecte d'interessants revisions (Lund i van Louhizen, 2004b; Hake *et al*, 2004; Gregory i Shiekhattar, 2004).



Figura 10. Mapa d'interaccions dels principals grups de proteïnes implicades en l'establiment i manteniment de l'heterocromatina. Les interaccions de qualsevol tipus entre qualsevol membre de cada grup s'indiquen mitjançant línies contínues i les interaccions probables, mitjançant línies discontinües. Extret de Craig , 2005.

Finalment, m'agradaria acabar aquesta introducció amb una analogia molt senzilla però que il·lustra molt bé la diferència d'escala entre la realitat humana i la cel·lular, diferència que sovint es descontextualitza. Imagineu com es poden posar dins una pilota de bàsquet uns 16.000 quilòmetres d'espagueti (és a dir, de Barcelona a Wellington). Si això no és prou difícil, intenteu trobar dins d'aquesta pilota un sol fragment de 2,5 centímetres o bé intenteu duplicar tot l'espagueti, desenredant-lo i separant-ne les dues cadenes individuals per extrems oposats (Peterson i Laniel, 2004).



OBJECTIUS

OBJECTIUS

En el nostre grup, un dels principals objectius és la identificació i posterior caracterització de les vies principals de progressió tumoral en el càncer colorectal. Aquest objectiu es basa principalment en dues premisses: (1) la inestabilitat genòmica juga un paper fonamental en els processos d'iniciació i progressió tumoral, (2) el conjunt d'alteracions genètiques i/o epigenètiques estan determinades pel tipus d'inestabilitat subjacent. Per tant, pensem que la identificació d'aquestes alteracions ens pot ajudar a definir el tipus d'inestabilitat present i, en conjunt, a utilitzar les diferents vies de progressió tumoral com a models d'evolució biològica. Un segon objectiu és la identificació d'alteracions recurrents en les mostres tumorals i l'avaluació de la seva capacitat de diagnòstic i/o pronòstic.

Per assolir aquests objectius es disposa d'un banc de tumors format per més de 200 carcinomas colorectals, col·lectats de forma prospectiva entre 1991 i 1994. Del conjunt d'aquestes mostres es recullen dos tipus principals d'informació: dades anatomopatològiques i dades genètiques.

Uns cinc anys enrere, la metilació genòmica s'estava consolidant com un ferm protagonista en la progressió tumoral. Els vincles entre aquesta modificació posttranscripcional i el càncer eren múltiples: (1) el silenciament de gens supressors de tumors per hipermetilació del seu promotor es proposava com una alternativa a les pèrdues d'heterozigositat (LOH) i mutació, en la hipòtesi original de Knudson (Jones i Laird, 1999); (2) la hipometilació es correlacionava amb la inestabilitat cromosòmica (Qu *et al*, 1999b); i (3) es descrivia una relació directa entre la metilació genòmica i l'estructura cromatínica, a nivell d'acetilació de les histones (Jones *et al*, 1998 i Nan *et al*, 1998).

Davant d'aquestes evidències científiques, es va pensar que la realització d'un estudi global dels canvis de metilació genòmica podia ser un bon complement a les dades genètiques de les quals ja disposàvem en el grup. Aquesta informació epigenètica ens podia ajudar a definir les vies de progressió tumoral i, de manera simultània, teníem la possibilitat d'identificar alteracions epigenètiques recurrents. D'aquesta manera quedaven definits els dos principals objectius d'aquesta tesi:

- (1) Realització d'un **estudi global** dels canvis en la metilació genòmica associats al càncer de còlon.
- (2) Anàlisi i caracterització d'**alteracions recurrents** en la metilació genòmica associades al càncer de còlon.



RESULTATS

Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS)

Jordi Frigola, Maria Ribas, Rosa-Ana Risques, Miguel A. Peinado

Nucleic Acids Research, 2002, Vol.30, No. 7 e28



CAPÍTOL 1

A l'hora d'assolir els dos principals objectius d'aquesta tesi hi havia un punt de partida molt clar, i era la necessitat d'una tècnica d'anàlisi de la metilació de l'ADN amb tres característiques principals: (1) informació de múltiples guanys i pèrdues de metilació alhora, (2) possibilitat de caracteritzar alteracions específiques i (3) fàcil aplicació.

La inexistència d'una tècnica en la bibliografia que reunís aquests tres requisits va fer-nos decidir a intentar buscar-ne una de nova. Així, en aquest article presentem la descripció d'una tècnica que vam anomenar *Amplification of InterMethylated Sites* (AIMS). Una part important de l'article la dediquem a qüestions pròpiament tècniques: fonament teòric, reproductibilitat, sensibilitat, etc., mentre que la resta presenta els resultats de la seva aplicació a un nombre limitat de mostres tumorals. Aquesta darrera part no és res més que una prova pilot per avaluar les possibilitats que ens ofereix aquesta nova tècnica per tal d'aconseguir els nostres objectius: (1) realització d'un estudi global i (2) caracterització d'alteracions recurrents.