

Un procés reversible: la metilació del DNA en càncer

Elisabet Figuerola Bou. Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

La metilació del DNA és un mecanisme epigenètic que afegeix grups metil a les citosines del genoma i, en conseqüència, modifica l'estructura del DNA i del que s'està expressant. S'ha observat que la metilació estaria implicada en el fet que uns gens s'expressin més que altres si es compara el teixit sa del tumoral. Així, la troballa de marques químiques que desmetilarien el DNA fa que es plantegi com a eina diagnòstica preclínica.

Darrerament l'epigenètica ha assolit un gran interès. Tal com el nom indica, *epi*, significa que està 'per sobre' de la genètica, i fa referència a tota modificació en l'estructura tridimensional del genoma, la cromatina, que genera un canvi en l'expressió dels gens sense alterar-ne la seqüència genòmica fonamental. Per tant, es genera un nou concepte revolucionari dins el món de la genètica: l'expressió dels gens ja no només pot ser alterada per mutacions (canvis en la seqüència), sinó que també hi ha un factor extra, anomenat *epigenètica*.

El terme *epigenètica*, malgrat que havia estat ja citat anteriorment, va adquirir un significat amb la metàfora de Conrad H. Waddington, el 1940. En aquell moment encara no havien descobert la seqüència fonamental del DNA Watson i Crick, que va tenir lloc anys més tard, ni es coneixia la naturalesa dels gens ni la seva heretabilitat; no obstant això, Waddington va formular un model anomenat *epigenetic landscape* o de l'entorn epigenètic, per explicar com a partir d'una cèl·lula es poden acabar originant tots els tipus cel·lulars presents a l'organisme. La metàfora de Waddington diu que si es llança una bola des de dalt d'un cim aquesta pot caure per diferents camins fins al fons d'una vall; cada camí que escull implica un compromís cap a una destinació que és definitiva, ja que la bola no pot ascendir el pendent. Compara, doncs, una cèl·lula mare amb un nivell màxim de pluripotencialitat, que va perdent a mesura que va diferenciant-se. Per tant, cada decisió, condicionada per l'entorn, en determina parcialment el destí.

La metilació del DNA, un mecanisme epigenètic

La metilació del DNA és un dels mecanismes epigenètics que regulen l'estructura del

DNA i és un procés vital per a la cèl·lula. Així es regula com s'expressen determinats gens i com es transmeten regions del genoma que han d'estar metilades a les cèl·lules filles (empremta genòmica); té a veure amb la inactivació del cromosoma X en les femelles i, finalment, amb el silenciament de transposons (també coneguts com a paràsits gènics). Les proteïnes encarregades de metilar el DNA són les DNA-metiltransferases (DNMT), que, per una modificació química en les citosines del genoma en regions CpG (C seguida de G), formaran el nucleòtid 5-metilcitosina (5-mC). I la metilació de les citosines no ocorre a l'atzar, sinó que es dona en locus rics en CpG, o illes CpG, que es troben distribuïts sobretot en regions promotores (reguladores) de determinats gens i en les regions altament repetitives del DNA. El mecanisme molecular responsable de la regulació de l'expressió dels gens feta per la 5-mC encara no es coneix amb exactitud, però se sap que factors modificadors d'histones i remodeladors de la cromatina reconeixerien la 5-mC i impedirien espacialment que la maquinària de transcripció tingui accés al gen.

Alteracions en el patró de metilació en el càncer

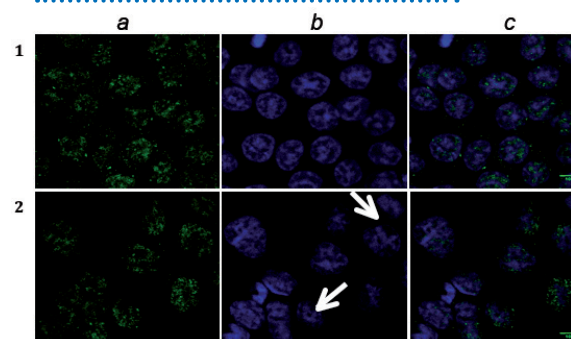
En els darrers anys s'ha descobert la relació de diverses malalties amb una alteració en el patró de metilació del DNA, una d'aquestes el càncer. En concret, hi ha alteracions en la metilació de gens que regulen el funcionament correcte de la cèl·lula (per exemple, gens reguladors del cicle cel·lular), anomenats *gens supressors de tumors*, que presenten un grau més alt de metilació a la regió promotora, i, per tant, no s'expressen com en condicions normals. També, com s'ha comentat anteriorment, la metilació també es troba en regions no codificants, com ara seqüències repetitives o transposons. I, en

el context del càncer, s'ha vist que el nivell de metilació del genoma és més baix, s'ha hipometilat. Per tant, aquestes dues alteracions explicarien com la cèl·lula tumoral pot adquirir avantatges a escala proliferativa o d'invasió, i també presentar la seva característica inestabilitat cromosòmica.

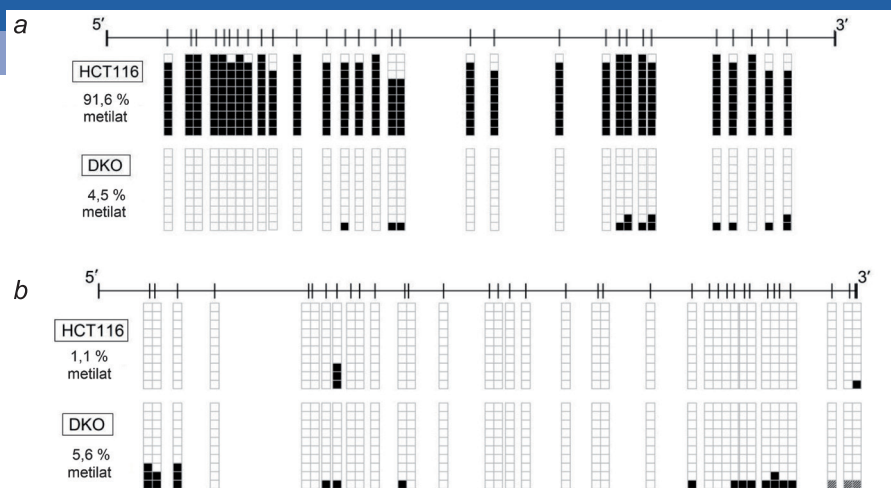
Recentment diversos estudis han indicat l'existència d'activitats enzimàtiques, fins al moment desconegudes, que desmetilarien el DNA i, també, de nucleòtids derivats de la 5-mC, com la 5-hidroximetilcitosina (5-hmC). L'existència d'una possible via desmetiladora del DNA seria de gran interès per a la recerca de marcadors de la malaltia.

Un model cel·lular per estudiar la metilació en el càncer

Per estudiar la metilació en el càncer es van utilitzar dos models cel·lulars. El primer és un model humà molt utilitzat de càncer de còlon, HCT116 i el seu doble genoanul·lat (DKO) per a dos tipus de DNA-metiltransferases. Així poden comparar-se quins gens es troben hipermetilats en la línia HCT116, ja que amb el doble genoanul·lat només difereix en la seva activitat DNA-metiltrans-
.....
+ **Figura 1.** Immunodetecció de 5-mC (a) al nucli de les cèl·lules HCT116 (1) i DKO (2) obtingudes amb el microscopi confocal. El nucli està marcat amb el 4'-6-diamino-2-fenilindiol o DAPI (b). A la dreta (c) es mostra el merge o el solapament de les dues imatges b i c per estudiar la colocalització de 5-mC al nucli. Les fletxes indiquen la morfologia de «dònut» del nucli de les cèl·lules DKO, per una manca de regulació de l'arquitectura nuclear a causa de la genoanul·lació de les DNMT, i per tant pel dèficit global de 5-mC.
.....



Un procés reversible: la metilació del DNA en càncer



← Figura 2. Mapa de metilació de l'illa CpG de la regió promotora dels gens HOXD1 (a) i CDH1 (b). Cada ratlla de la seqüència de 5' a 3' és una citosina susceptible a la metilació, representada en columnes; també cada fila de quadrats és un tipus de mostra seqüenciada que provenia de la línia HCT116 o de la línia DKO. Els quadrats negres signifiquen que la citosina està metilada, i en blanc tenim l'absència de metilació. Cal destacar el 91,6 % de metilació de la línia HCT116 en el promotor de HOXD1, en comparació amb el 4,5 % de metilació en el seu model comparatiu DNA-metiltransferasa deficient (a). I també el baix grau de metilació del promotor de CDH1 en els dos models, que és equiparable (b).

ferasa. En segon lloc, s'utilitza un model de transició tumoral de ratolí que inclou diferents línies de queratinòcits immortalitzats que representen la transició d'una cèl·lula no tumorigènica fins a una cèl·lula altament tumoral i invasiva (línies MCAD3, PAM212 i CARB). Aquest model ofereix informació més àmplia sobre quines alteracions epigenètiques evolucionen en un procés tumorigèn.

S'ha trobat que la immunodetecció de la marca 5-metilcitosina en la línia del doble genoanul·lat de càncer de còlon és menor en HCT116 (vegeu la figura 1); és a dir, que presenta una hipometilació respecte a la línia HCT116. D'altra banda, en la mateixa línia s'observa amb claredat una alteració en la morfologia nuclear, molt característica per la seva forma de «dònut», que remarca com la

metilació manté l'arquitectura nuclear.

Per estudiar la hipermetilació s'han analitzat gens importants en càncer, com el gen del desenvolupament *HOXD1* i el gen d'adhesió cel·lular *CDH1*. Mitjançant seqüenciació per bisulfit s'ha pogut identificar que la regió promotora del gen *HOXD1* es troba hipermetilada en la línia HCT116 respecte a la línia del doble genoanul·lat (vegeu la figura 2a). També, s'ha comprovat que el gen *CDH1*, important en alguns tipus de càncers, en el càncer de còlon no està hipermetilat, i per tant, almenys la metilació, no tindria implicacions en la seva activitat (vegeu la figura 2b).

En les línies de ratolí es va observar que la disminució de 5-metilcitosina a mesura que el model es va fent més tumorigèn està acompanyada d'un increment de 5-hidroximetil-

citosina. I per tant, s'evidencia una estreta relació entre la pèrdua de metilació i el guany d'un nucleòtid descrit recentment, com la 5-hidroximetilcitosina.

Ja per concloure, s'ha pogut estudiar com la metilació altera l'expressió de gens com *HOXD1* en el càncer i com la disminució en el contingut global de metilació té implicacions en l'arquitectura nuclear; i a més, la disminució de 5-metilcitosina al nucli està acompanyada d'un increment de 5-hidroximetilcitosina, fet que aporta més evidències de la via desmetiladora del DNA anunciada recentment. •

Bibliografia

- BALLESTAR, E.; ESTELLER, M. (2002). «The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing». *Carcinogenesis*, 23 (7): 1103-1109.
- EHRlich, M. (2002). «DNA methylation in cancer: too much, but also too little». *Oncogene*, 21: 5400-5413.
- ESPADA, J.; ESTELLER, M. (2010). «DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21: 238-246.
- ESTELLER, M. [et al.] (2004). «A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors». *Cancer Research*, 64: 5527-5534.
- NIVELEAU, A. [et al.] (2012). «Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis». *Gut*, 47: 689-693.



Elisabet Figuerola Bou (Girona, 1990) és graduada en ciències biomèdiques per la Universitat de Barcelona (2013). El seu camp d'interès és el paper de l'epigenètica en la regulació de gens implicats en tumorigènesi. El maig de 2013 va guanyar el Premi de Recerca per a Estudiants Gemma Rossell i Romero pel seu treball de fi de grau sobre el paper de la metilació del DNA en càncer. Actualment cursa el màster de genètica i genòmica impartit per la Universitat de Barcelona, i fa les pràctiques del màster al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) al grup de mecanismes epigenètics de regulació transcripcional implicats en la diferenciació i transformació cel·lulars, en el grup d'Immaculada Hernández-Muñoz, de l'Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM).