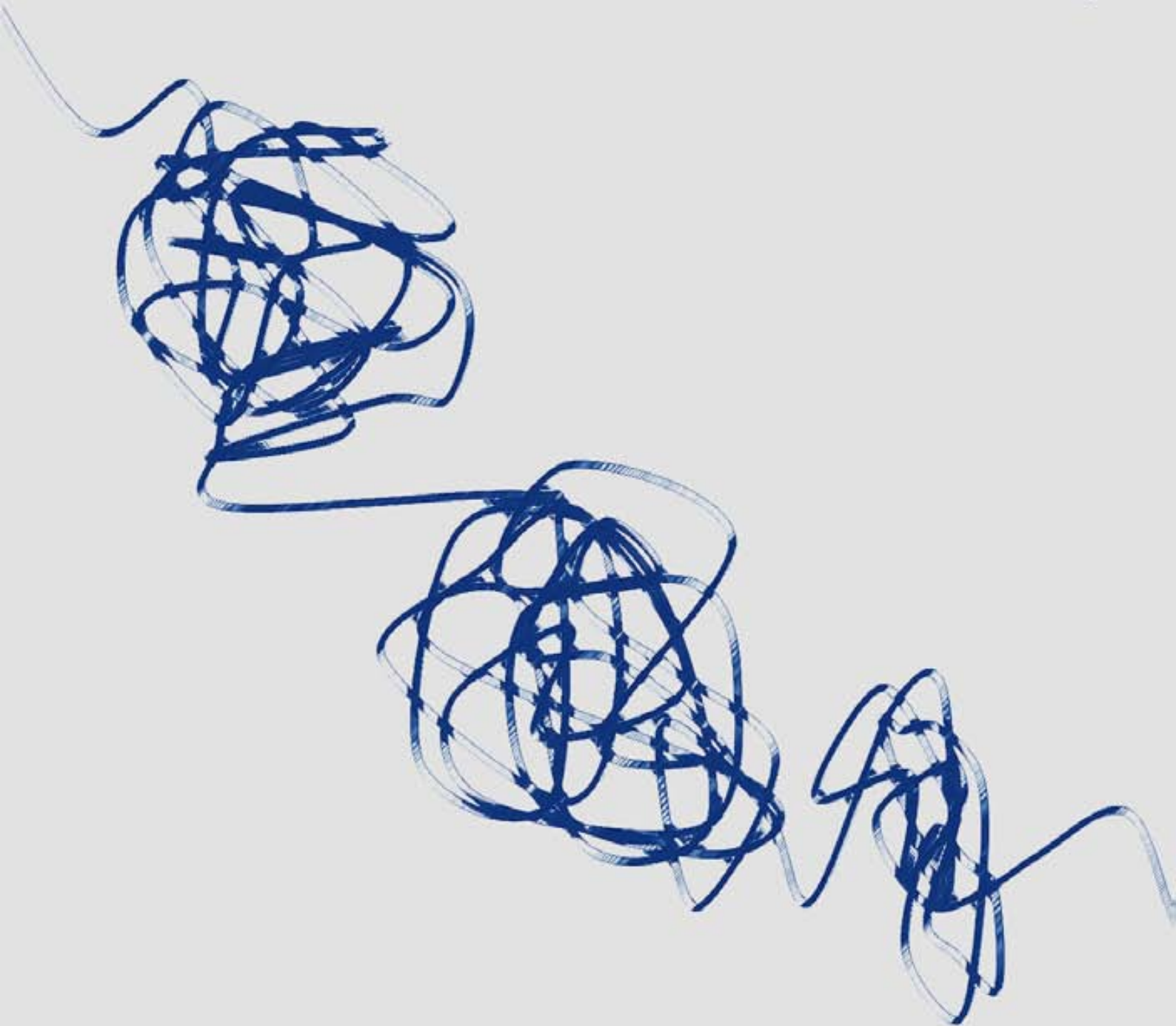


Mecanismes de silenciament epigenètic en càncer colorectal



Mecanismes de silenciament epigenètic en càncer colorectal

Memòria presentada per

Marta Forn Bernaus

per optar al grau de

Doctora en Biologia Cel·lular

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Miquel Àngel Peinado Morales
a l'Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer

Tesi adscrita al Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i
d'Immunologia de la Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
bienni 2011-2012

Director

Tutora

Doctoranda

Miquel A. Peinado Morales

Rosa Miró Ametller

Marta Forn Bernaus

Barcelona, abril de 2012

Tot està per fer i tot és possible

Ara mateix - Miquel Martí i Pol

A la mare i al pare

Al Pep i l'Alba

Ja fa uns anys que ens coneixem i són molts els moments compartits, així que tot el que pugui dir a continuació es quedarà curt, perquè m'és impossible plasmar en quatre línies tot el que aquest temps ha significat per mi i tot el que he après al vostre costat i gràcies a vosaltres.

Vaig donar unes quantes voltes fins arribar al MAP lab, però per sort la ruta va ser circular. Gràcies Miquel Àngel per deixar-me formar part del grup, que independentment de la seva localització ha mantingut sempre l'esperit de col·laboració i suport mutu. Em sento *lucky* d'haver pogut aprendre al teu costat, perquè m'has donat molta llibertat, però sempre has estat allà.....sobretot a l'altre banda de la pantalla....sort dels skypes!!!!

Mar! No cal que digui que aquesta tesi no hagués estat el mateix sense tu, a tots nivells, eh?! Moltes gràcies no només per les hores dedicades sinó per la teva implicació, les ganes i l'energia invertida. Treballar al teu costat és un luxe i fas que malgrat tot, cada dia sigui un *beautiful day* i sigui molt fàcil tirar pa'lante!

Mireia, no se que hagués fet sense els teus consells, gràcies per estar sempre disposada a discutir i xerrar de tot, per dir les coses tal com raja, perquè parlant un mal dia es pot transformar en un *perfect day*. Berta, *Do you remember the first time?* Ens em vist en mil i un contextos diferents: entre vinils, ungles, cotxes desfrenats, xinatowns....per sort sempre maridat amb el teu riure contagiós. L'*aging* pren una l'altre sentit quan coneixes a la Mònica [broma interna], sempre amb *tantes coses a fer* però superorganitzada i pràctica...els teus consells valen un imperi. Es podria dir que a mi normalment *me sobren paraules*, però en aquest cas em falten adjectius per l'home que crea debat d'arreu i "transgiversa" tot i més...ets únic Llorenç. A la planta de sota he de donar les gràcies *a un tipo listo*....merci Víctor per donar un cop de mà (o cotxe) sempre que ha fet falta. Anna! Jo allà R que R demanant i tornant a demanar taules i gràfics...moltes de les imatges d'aquesta tesi són obra teva...gràcies per fer-me el *camí fàcil* i fer-ho sempre amb el teu bon rotllo. I a l'altre víctima de les meves visites a la primera...Sergi amb un bon humor insuperable i uns tàpers envejables vas transmeten *alegria* a tort i a dret. I no m'oblido d'un parell que han entrat *trepitjant fort*: Yaiza, la guapi més carinyosa de l'edifici i la inescotable Raquel. Cal dir que el *dia a dia a dia* compartint tesi i escriptori amb la Inês ha estat tota una lliçó de seguretat i *coolness*. Però també he estat molt afortunada de compartir taula, dubtes científics, mals de cap i *playlists* amb el Quim i el seu *Hakuna Matata*. Aix pituriuaaaa....dj Carry On: *cert clar i breu*....ha estat un plaer!

At the *beginning of a great adventure*, vaig tenir la sort de trobar-me a un grup de gent que em va acollir i facilitar un munt les coses, entre d'altres moltes gràcies a l'Elena i el Jairo pels bons consells, a la Laura per la seva simpatia i les dots de copilot, i a la Regi, amb qui he tingut la fortuna de compartir més moments i gaudir del seu "don de gentes". A més, durant aquest temps ha passat molta gent pel grup: Núria, Dèlia, Sara, Berta i Adrià....seguiu endavant i *que tingueu sort* amb tot el que us proposeu.

Agraïments

Buf! Ara ve quan necessitaria pàgines i més pàgines per agrair a tota la gent de l'IMPPC des dels consells científics (suerte de tu sabiduría, Bea) fins a les xerradetes, somriures i carinyu que m'heu transmès durant aquest temps, ja sigui pels passadissos del centre o en qualsevol bar gaudint d'una cerveseta amb l'Ernest&co. *Benvolguts*, em refereixo a tots: la gent de la segona (cracks indiscutibles del futbol), de la primera, genòmica, administració, ITs, recepció, seguretat, el Javi i l'Antònia quan dic queworking with you is a privilege. Thanks!

Moltes gràcies a l'Anna per les hores davant del *sorting*; a la Vero, la Rosa i el Jorge per facilitar-me la vida amb els ratolins; a l'Anna pel suport amb els *arrays* d'expressió; a la gent de genòmica de l'IGTP; and to Rebecca and Heinz for their professionalism and *help* with the sequencing of impossible samples. Thanks to Wouter for introducing me to the 4C world, to Petra for the technical support and Blaise and Harmen for the time in front the computer....Dank U Wel!

Els meus dies a Utrecht van ser tota una experiència. La *resistance* al lab va ser possible gràcies als consells i l'ajuda de la Meri i la Sylvia, sempre al meu costat...moltíssimes gràcies! Y los días nublados fueron *de luz y de color* gracias a la gente de la Peña Clandestina Barcelonista de Utrecht, gracias a tod@s!!!!

Hi ha més gent que té part de culpa de que jo estigui on sóc ara...en especial la Verena, la Rebeca, l'Eder, l'Antònia i la gent del COM, que em van ensenyar a "gatejar" en el món de la ciència; i la Raquel i els companys de l'IBB, on vaig aprendre anar sense rodetes. Malgrat haguem agafat diferents *camins* els moments compartits segueixen sent molt valuosos per mi.

I tot i que *la vida te da sorpresas, sorpresas te da la vida*.....sempre són fàcils d'encarar amb el carinyu i professionalitat de la gent de la setena de Can Ruti...merci!

Pipilyn, Kminal, Nui, Helen, Mertx, Xarlo, Ester & co.....gràcies per totes les tones de braves compartides, els concerts gaudits, les divagacions al ferrocarril, les *delicatessens* del pis Congrés, els pics d'activitat del Sagrada, el bon karma del pis Guinardó i els milers de kilòmetres conduïts, caminats, pedalejats, navegats, volats....i és que anar *per mars i muntanyes* amb vosaltres és inigualable.

JJ, Virolès, Layi, Miriam, Cris i Mònica....la veritat, és que tot els que us pugui dir, ja està escrit en un carpeta o un cançoner, però per mi són imprescindibles les trucades interminables, els lucanies, les cervesetes regeneradores, les sortides gafapastes i els diumenges iaieros. Tinc present les capsulitis amb el joc de la mònica, quan dic que estar amb vosaltres és sempre *una estona de cel*.

I res d'això hagués estat possible sense el suport incondicional de la família i els padrins...gràcies de tot cor! Cal dir que tot pren una altre sentit quan pots gaudir de l'energia i la imaginació dels petits de casa.....en el fons sou els més grans! Alba i Pep.....vosaltres marqueu *la diferencia*. Gràcies per tots els moments compartits però sobretot perquè sempre he tingut la certesa de que esteu allà, independentment dels Km i els mals de cap que ens separin. Però els autèntics culpables de tot plegat sou vosaltres: pare i mare. Gràcies per donar-me ales en tot moment i ajudar-me a aixecar el *vol* quan ha estat necessari. Sou els millors.

Que res, moltes gràcies a tots per haver posat música a la meva tesi.

Per si no us ho havia dit abans sou STUPENDUS!!!

<http://grooveshark.com/#!/playlist/Gr+cies/62881047>

Índex de continguts

ABREVIACIONS EMPRADES	15
PRÒLEG	17
INTRODUCCIÓ	21
1. ARQUITECTURA DE L'INTESTÍ.	22
1.1 Compartiments de l'intestí.	22
1.2 Vies de senyalització implicades en el control de l'homeòstasi.	24
2. CÀNCER COLORECTAL.	26
2.1 Conceptes generals.	26
2.2 Bases moleculars del CRC.	27
2.3 Propietats claus de les cèl·lules canceroses.	29
2.4 Cèl·lules mare canceroses.	30
3. MECANISMES EPIGENÈTICS.	31
3.1 La metilació del DNA.	31
3.2 Les modificacions d'histones i les implicacions en la cromatina.	34
3.2.1 Les histones i les seves modificacions post-traduccionals.	34
3.2.2 Proteïnes Polycomb i Trithorax.	38
3.2.3 Diferents criteris de classificació de la cromatina.	40
3.3 Posicionament dels nucleosomes.	43
3.4 Epigenètica de l'RNA.	44
3.5 Organització nuclear.	45
4. ALTERACIONS EPIGENÈTIQUES EN CÀNCER.	47
4.1 La metilació del DNA en el procés tumoral.	47
4.2 Alteracions en les proteïnes de la cromatina.	49
4.3 Silenciament Epigenètic de Gran Abast.	50
5. EPIGÈNICA EN LA DIFERENCIACIÓ.	51
6. ACTIVINES I INHIBINES EN CÀNCER.	54
OBJECTIUS	59

MATERIALS I MÈTODES	63
1. MOSTRES EMPRADES.	64
1.1 Mostres de ratolí.	64
1.1.1 Purificació de cèl·lules intestinals.	64
1.2 Mostres humanes.	67
2. CULTIUS CEL·LULARS.	68
2.1 Diferenciació de les CaCo2.	68
2.2 Silenciament gènic transitori.	69
2.3 Assaig d'activitat cel·lular.	69
2.4 Assaig de migració.	70
2.5 Assaig d'invasió.	70
3. ANÀLISI DE METILACIÓ DEL DNA.	71
3.1 Extracció del DNA.	71
3.2 Seqüenciació directa de bisulfit.	71
3.3 AIMS-Seq.	72
4. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ D'RNA.	75
4.1 Anàlisi d'expressió de gens específics.	75
4.2 Anàlisi d'expressió a escala global.	76
5. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ PROTEICA.	77
6. ASSAIG D'IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (CHIP).	78
6.1 CHIP seqüencial (reChIP).	80
7. RESUM TÈCNIC.	81
RESULTATS	83
1. CANVIS DE METILACIÓ A ESCALA GENÒMICA.	84
1.1 Detecció de la metilació del DNA mitjançant AIMS-Seq.	85
1.2 Canvis de metilació propis de la diferenciació intestinal i la tumorigènesi.	87
1.3 Alteracions en la metilació en estadis inicials de la tumorigènesi.	94
1.4 Variacions en l'expressió gènica en estadis inicials de la tumorigènesi.	98
1.5 Expressió dels gens diferencialment metilats.	101
2. SILENCIAMENT EPIGENÈTIC REGIONAL DE GRAN ABAST (LRES).	102
2.1 Perfil epigenètic de la regió 2q14.2 durant la diferenciació de les cèl·lules CaCo2.	102
2.2 LRES en la línia cel·lular murina de càncer colorectal CT26.	107
2.2.1 Regions analitzades.	107
2.2.2 Perfils d'expressió i estat de metilació del DNA.	110
2.2.3 Dominis bivalents de cromatina.	111
2.2.4 Heterocromatinització en la regió 1qE2.3.	114
2.2.5 Barreres físiques de la cromatina en la regió 1qE2.3.	115
2.3 Perfil epigenètic en la diferenciació epitelial.	116
2.4 Perfil epigenètic en estadis inicials del procés tumoral.	120
3. ACTIVINA B (INH- β_B) EN CÀNCER INTESTINAL.	123

DISCUSSIÓ	129
1. CANVIS DE METILACIÓ A ESCALA GENÒMICA.	130
1.1 AIMS-Seq: qüestions tècniques.	130
1.2 Heterogeneïtat de les mostres analitzades.	132
1.3 Guanys de metilació durant la diferenciació d'intestí prim i la tumorigènesi.	133
1.4 Estadis inicials de la tumorigènesi: metilació del DNA i expressió gènica diferencials.	135
2. SILENCIAMENT EPIGENÈTIC REGIONAL DE GRAN ABAST.	137
2.1 Regulació de dominis cromosòmics en diferenciació cel·lular i carcinogènesi: el cas de LRES.	137
2.2 El ratolí, un model per l'estudi de LRES en càncer.	138
2.3 Implicacions del LRES en diferenciació intestinal i estadis inicials de la carcinogènesi.	139
2.4 Model de regulació de les zones amb LRES durant la diferenciació i la tumorigènesi.	141
3. CARA I CREU DE L'ACTIVINA B EN CÀNCER INTESTINAL.	143
CONCLUSIONS	147
BIBLIOGRAFIA	151
APÈNDIX	167
1. PRIMERS EMPRATS.	168
2. METILACIÓ A ESCALA GENÒMICA.	172
3. SILENCIAMENT EPIGENÈTIC REGIONAL DE GRAN ABAST (LRES).	174
3.1 Dades de metilació.	174
3.2 Dades d'expressió d'RNA.	181
3.3 Immunoprecipitació de cromatina: consideracions tècniques.	185
3.4 Valors d'H3K4me3 i H3K27me3 en mostres de ratolí.	187
4. ACTIVINA B (INH- β_B) EN CÀNCER INTESTINAL.	193

Abreviacions emprades

5hmC:	5-hidroximetilcitosina
Ac:	acetilat
AIMS:	<i>amplification of intermethylated sites</i>
AIMS-Seq:	seqüenciació massiva d'AIMS
ATP:	adenosina trifosfat
BLOC:	<i>Broad Local Enrichments H3K27me3</i>
C:	citosina
ChIP:	<i>chromatin immunoprecipitation</i>
CpGi:	illa CpG
CRC:	<i>colorectal cancer</i>
DNA:	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNMT:	DNA metiltransferasa
Dpc:	dies post-confluència
FAP:	<i>familial adenomatous polyposis</i>
FDR:	<i>false discovery rate</i>
G:	guanina
H (nucleòtid):	adenosina, citosina o timina
H:	histona
HAT:	histona acetiltransferasa
HCP:	<i>high CpG promoter</i>
HDAC:	histona deacetiltransferasa
HIF:	<i>hypoxia inducible factor</i>
HNPCC:	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
ICP:	<i>intermediate CpG promoter</i>
K:	lisina
Kb:	kilobase
LCP:	<i>low CpG promoter</i>
LINE:	<i>long interspersed nucleotide element</i>
LOCK:	<i>Large Organized Chromatin H3K27me2</i>
LOH:	<i>loss of heterozygosity</i>
LOI:	<i>loss of imprinting</i>
LRES:	<i>long range epigenetic silencing</i>
LTR:	<i>long terminal repeat</i>
Mb:	megabase
MBD:	<i>methyl-CpG binding domain</i>
Me:	metilat
MeDip:	<i>methylated DNA immunoprecipitation</i>
Pb:	parell de bases
PcG:	<i>polycomb group</i>
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i>
PRC1/2:	<i>polycomb repressor complex 1 and 2</i>
reChIP:	<i>sequential chromatin immunoprecipitation</i>
RNA:	<i>ribonucleic acid</i>
SC:	<i>stem cells</i>
SINE:	<i>short interspersed nucleotide element</i>
siRNA:	<i>small interfering RNA</i>
Trx:	<i>trithorax group</i>

Pròleg

A l'hora d'entendre els mecanismes biològics de moltes malalties és possible fer símils amb circumstàncies i fenòmens socials. Salvant les distàncies podríem comparar el nostre cos amb un poble amb una estructura social i econòmica, on les cèl·lules podrien ser persones com a elements de la societat. El poble té una legislació (material genètic, DNA) que fixa el seu funcionament i assegura la convivència, el seu creixement i continuïtat. Cada individu, però, fa una lectura pròpia d'aquesta legislació en funció de les seves necessitats, convenis, drets i deures (epigenètica). Això promou que cadascú realitzi diferents tasques, tingui diferents responsabilitats i punts de vista que fan tirar endavant la societat. En aquest poble hi ha gent amb molt poder i capacitat de decisió (cèl·lules mare adultes) i d'altres que tenen funcions més específiques, però indispensables pel funcionament de la comunitat (cèl·lules diferenciades). Si algun individu no desenvolupa correctament la seva tasca, ja sigui per un alteració en la legislació (mutació en el DNA) o un error en la lectura de la legislació (alteració epigenètica) aquest pot esdevenir tumoral. L'efecte que aquest individu té sobre el conjunt del poble depèn de la seva posició dins de la societat, essent molt problemàtic que una persona amb molt de poder es corrompi. Així doncs, quan els més poderosos no desenvolupen les seves tasques de forma convenient és fàcil trencar el benestar social i entrar en una situació de crisi (càncer). La severitat de la crisi i possible tractament ve normalment donada per l'extensió d'aquest comportament anòmal a d'altres punts de la comunitat, que poden arribar a fer irreparable la recuperació de l'equilibri.

En aquest treball ens hem centrat en l'estudi del càncer colorectal, concentrant-nos en els canvis que es donen a nivell epigenètic. Cal destacar, però, que la cèl·lula tumoral no s'inventa res de nou, simplement hi ha una pèrdua de determinats mecanismes de control que resulta en un funcionalment alterat (una lectura o interpretació anòmala) de vies implicades en el desenvolupament i la diferenciació cel·lular (aquests programes cel·lulars són els equivalents a la "legislació" en una societat). És per això que hem estudiat tant el procés de diferenciació de cèl·lules normals com la progressió tumoral.

En aquest context, el nostre treball va adreçat a entendre com són interpretats alguns dels mecanismes que governen el comportament normal de les cèl·lules quan aquestes es transformen en tumorals. Concretament s'han estudiat els mecanismes de silenciament epigenètic treballant a diferent zoom: escala global, regió cromosòmica i gen específic. Aquest tres nivells delimiten els objectius d'aquesta tesi, i es desenvolupen mantenint l'estructura de tres blocs diferenciats en els apartats de resultats i discussió.

A escala global ens hem centrat en determinar els canvis de metilació del DNA que succeeixen durant la diferenciació de l'intestí prim, els propis d'estadis inicials de la progressió tumoral en intestí prim, i els presents en línies cel·lular de càncer colorectal murí. Així com s'ha analitzat quina correlació existeix entre les variacions de metilació i l'expressió gènica.

A nivell regional s'ha aprofundit en la dinàmica del silenciament regional mitjançant el *Long Range Epigenetic Silencing* (LRES), descrit prèviament en càncer colorectal per membres del grup. S'han analitzat els canvis a nivell d'expressió i perfils epigenètics al llarg de la diferenciació de la línia cel·lular d'adenocarcinoma colorectal CaCo2. Així com s'ha determinat que el LRES és un mecanisme conservat en càncer colorectal murí, fet que ha permès estudiar la seva implicació en la diferenciació de teixit normal i estadis primerencs de la tumorigènesi.

Finalment, ens hem interessat per l'INH- β_B , citoquina que dimeritza formant Activines, ja que aquest gen està silenciada en càncer colorectal mitjançant LRES i la seva hipermetilació està associada a una reducció de la supervivència del pacient. L'observació d'un patró d'expressió complex al llarg de la progressió tumoral ha promogut l'estudi funcional d'aquest gen *in vitro*.



INTRODUCCIÓ

1. Arquitectura de l'intestí.

L'intestí conté varis tipus cel·lulars que s'organitzen mitjançant l'activació i silenciament de diferents vies de senyalització. A continuació es descriurà com estan disposades aquestes cèl·lules al llarg de l'intestí, quines són les seves propietats i les vies de senyalització que mantenen aquesta estructura i, per tant, l'homeòstasi cel·lular.

1.1 Compartiments de l'intestí.

L'intestí està compost per tres capes de teixit organitzades en una estructura concèntrica: la capa externa, varies làmines de múscul llis; el teixit connectiu (estroma); i la mucosa, una capa de cèl·lules epitelials responsable de processar l'absorció de nutrients (Barker et al., 2009). Aquestes capes epitelials estan plegades i es caracteritzen per una velocitat de renovació extraordinària, amb un recanvi de cinc dies en ratolí (Sato et al., 2009). La base d'aquests plegaments, la cripta, conté en la seva part inferior les cèl·lules mare pluripotents (*stem cells*, SC) (Fig. i1.A).

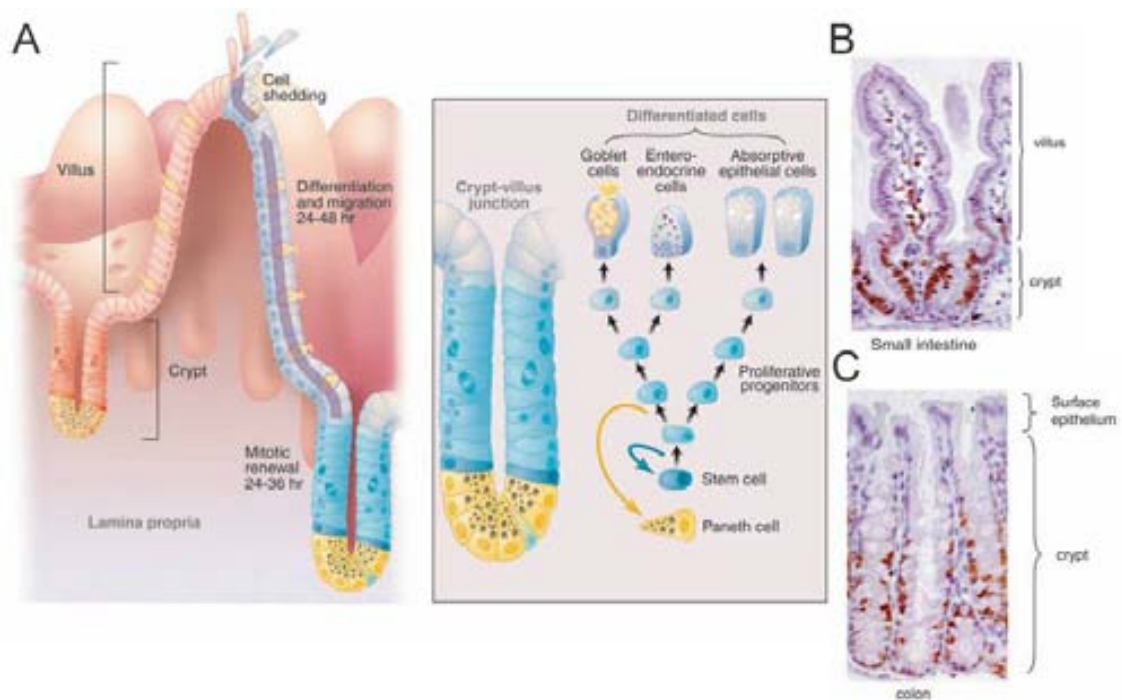


Figura i1. A. Arquitectura de l'epiteli intestinal. Esquema de l'intestí prim il·lustrant el procés de diferenciació. Immunohistoquímica contra Ki67, marcador de les cèl·lules proliferants de l'intestí prim (B) i el còlon (C) (Radtko and Clevers, 2005).

Cada cripta té unes quatre o sis SC adultes, però no hi ha un consens sobre la seva identitat exacta. S'han proposat diferents marcadors d'SC intestinals: les cèl·lules que expressen *Bmi1* i *Hopx* es divideixen lentament i ocupen la posició +4 de la cripta (sobre les cèl·lules de Paneth), mentre que l'expressió de *Hopx* s'observa en totes les criptes, les BMI1+ només es troben en la part anterior de l'intestí prim; les cèl·lules positives per PROM1 i LGR5 estan localitzades a la base de la cripta, les cèl·lules LGR5+ (divisió cada 24h) estan al llarg del tracte gastrointestinal, mentre que les PROM1+ estan només en l'intestí prim (Barker et al., 2009; Sangiorgi and Capecchi, 2008; Takeda et al., 2011; Zhu et al., 2009). Estudis recents han aportat coneixement sobre la relació entre aquests dos tipus cel·lulars mostrant que les cèl·lules BMI1+ són la població quiescent d'SC que en condicions normals origina la població LGR5+ i és capaç de repoblar-la després d'una lesió. Els estudis realitzats amb les cèl·lules *Hopx*+, però, suggereixen que la relació entre ambdues poblacions és bidireccional (Takeda et al., 2011).

Estudis recents donen suport a la hipòtesi que les SC intestinals (LGR5+) es divideixen simètricament i adopten un estat pluripotent o inicien la diferenciació de forma estocàstica (Snippert et al., 2010). En l'intestí prim, les cèl·lules diferencien al llarg de la cripta fins arribar a la intersecció de cripta-*villi*. Després, les cèl·lules terminalment diferenciades migren cap a l'extrem del *villi* (protuberàncies dins la llum intestinal), exceptuant les cèl·lules de Paneth que escapen del flux i resideixen en la base de la cripta. En el còlon, la localització de les cèl·lules de Paneth està ocupada per la població CD24+ (Snippert et al., 2010) i la superfície epitelial està mancada de *villi*, així que les cèl·lules diferenciades es troben en el terç superior de la cripta (Fig. i1.B-C) (Radtke and Clevers, 2005).

Hi ha quatre tipus de cèl·lules diferenciades que duen a terme les funcions de l'epiteli intestinal (Fig. i1.A): les cèl·lules absortives (enteròcits o colonòcits) són les més abundants; les cèl·lules globet mucosecretores estan majoritàriament localitzades al final de l'intestí prim i el còlon; les cèl·lules enteroendocrines controlen la fisiologia de l'intestí, representant la proporció més baixa; i les cèl·lules de Paneth controlen l'entorn microbiològic de l'intestí segregant agents antimicrobians (Barker et al., 2008). Recentment s'ha demostrat que les cèl·lules de Paneth també poden aportar senyals essencials per controlar els nínxols cel·lulars. Les cèl·lules de Paneth i les LGR5+ estan localitzades en la base de la cripta maximitzant el contacte heterotípic. La competència de les cèl·lules LGR5+ per la superfície de les cèl·lules de Paneth s'ha postulat com un possible factor de manteniment de la població d'SC adultes (Sato et al., 2011).

La major part del coneixement actual s'ha obtingut treballant amb models animals de ratolí. Tot i això, les anàlisis de patrons de metilació de les criptes de còlon humanes s'han utilitzat per tal de determinar la dinàmica de les SC adultes. La metilació d'illes CpG (introducció 3.1) associades a gens silenciats ha permès determinar l'herència somàtica i els canvis atzarosos que permeten traçar l'historial de divisions de les SC (Yatabe et al., 2001). S'ha conclòs que cada cripta esdevé una unitat mitòtica clonal que progressivament acumula un conjunt d'errors

independents. Els nínxols de les SC es caracteritzen per un mecanisme d'extinció de llinatge que redueix la diversitat dins la cripta en comparació a la variació entre criptes (Fig. i2) (Shibata, 2009). Algunes evidències senyalen una dinàmica similar en les SC d'intestí prim i còlon, però al llarg del temps s'observa menys acumulació de metilació en l'intestí prim (Kim et al., 2005).

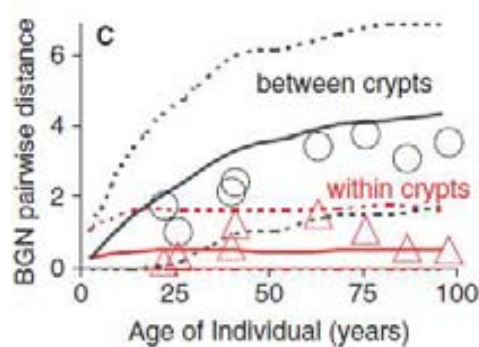


Figura i2. Patró de metilació de les criptes de còlon humà. BGN= gen biglicà del cromosoma X (Shibata, 2009).

1.2 Vies de senyalització implicades en el control de l'homeòstasi.

L'arquitectura de l'epiteli intestinal depèn de les interaccions epitel·li-mesènquima. D'una banda, les cèl·lules epitel·lials alliberen senyals Hedgehog i *Platelet Derived Growth Factor* al mesènquima, controlant el seu comportament i la conformació del *villi*. El bloqueig del senyal Hedgehog comporta l'absència del *villi* i la persistència d'un epitel·li altament proliferant (Crosnier et al., 2006). D'altra banda, la senyalització *Bone-Morphogenic Protein* és constitutiva en el mesènquima i el seu bloqueig es tradueix en l'aparició de noves criptes arreu de l'epitel·li (Radtke and Clevers, 2005).

Per l'organització de l'eix cripta-*villi* són indispensables les vies de senyalització Wnt, Notch i Eph/Ephrin. La via de senyalització Wnt manté la població de la cripta en un estat proliferant. La delecció de TCF4 comporta l'absència de criptes, mentre que la superactivació de la via Wnt degut a mutacions en el gen *Apc* resulta en un elevat nombre de criptes. A més, Wnt i Notch controlen de forma conjunta l'elecció entre esdevenir cèl·lules secretores o absorbives (Crosnier et al., 2006). El sistema Eph-Ephrin és el responsable de la comunicació entre cèl·lules adjacents. Aquests receptors i lligands estan diferencialment distribuïts al llarg de l'eix de la cripta, aportant barreres per mantenir els diferents compartiments. *EphB2* està més expressat en criptes i aquesta expressió disminueix de forma gradual durant el procés de diferenciació a *villi* (Fig. i3). L'expressió d'*EphB3* és exclusiva de la base de la cripta. Contràriament, les Ephrines estan sobreexpressades en les cèl·lules diferenciades. A més, aquests components

estan involucrats en el manteniment de l'arquitectura cel·lular en altres teixits epitelials com les glàndules mamàries (Merlos-Suarez and Batlle, 2008).

Alteracions en l'arquitectura de l'intestí degudes a mutacions o alteracions en els gens implicats en aquestes vies de senyalització són comuns en processos com el càncer d'intestí prim i colorectal.

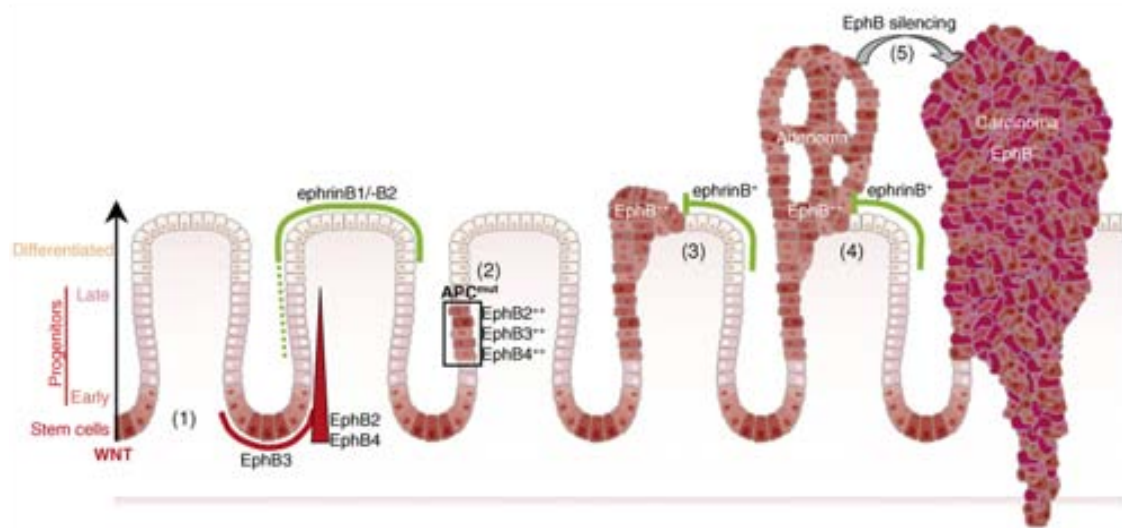


Figura i3. Interaccions EphB-EphrinB en teixit normal i tumoral. EPHB bloqueja l'adquisició de la malignitat durant la progressió del càncer colorectal (Merlos-Suarez and Batlle, 2008).

2. Càncer colorectal.

S'anomena càncer o tumor maligne d'intestí gros la proliferació anormal d'un grup de cèl·lules originàries de qualsevol sector d'aquest òrgan, inclòs el recte, que es reproduïxen molt acceleradament i formen una massa o tumor, que en fases avançades tendeix a infiltrar-se per la paret intestinal i els òrgans propers i a originar metàstasi o tumors secundaris als ganglis limfàtics de la cavitat abdominal i en diversos òrgans o teixits més o menys allunyats de l'intestí gros, com ara el fetge, els ossos, el cervell o els pulmons (Vilardell Tarrés, 1990).

2.1 Conceptes generals.

El càncer colorectal (CRC) és el tercer càncer més comú a nivell mundial, essent el més prevalent en països industrialitzats. A l'Estat espanyol és el segon tipus de tumor amb més incidència i índex de mortalitat, després del càncer de mama en dones i el de pulmó en homes. En el 2006, les morts per CRC representaren el 12,9% de totes les morts per càncer en Espanya. L'elevat índex de mortalitat del CRC és sovint atribuït a les seves metàstasis (Bejar et al., 2009; Borrás et al., 2001).

L'aparició d'un tumor colorectal pot ser conseqüència de factors ambientals i hàbits alimentaris, càncer esporàdic, o pot ser degut a una predisposició genètica, càncer heretable, fet que succeeix en un 15% dels casos. Hi ha dos tipus clínics de CRC heretable en funció de la prèvia presència o absència de tumors benignes en l'intestí gros (pòlips). Així doncs, pot haver-hi absència de pòlips (HNPCC) com el síndrome de Lynch; o presència, com succeeix en: la poliposi adenomatosa familiar (FAP), la poliposi juvenil, la poliposi Peutz-Jeghers i la poliposi MYH (FAP sense mutacions en el gen APC) (de la Chapelle, 2004). El 80% dels pòlips són epitelials i s'originen a partir de la capa de teixit mucós que recobreix la superfície interna de l'intestí gros. Aquests es poden classificar en adenomatosos (90%) caracteritzats per la presència de glàndules secretores, un creixement lent i baixa freqüència d'esdevenir malignes; vellosos (5%) les propietats dels quals són contràries a l'anterior tipus, destacant que un 40% experimenten un procés de malignització; i mixtes. D'altra banda cal tenir en compte que determinats processos inflamatoris crònics intestinals com la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa són sovint un antecedent de càncer, ja que sembla que la continuada descamació i regeneració de la mucosa intestinal, a la llarga, facilita la formació de cèl·lules malignes (Vilardell Tarrés, 1990).

Hi ha diversos tipus de tumors malignes d'intestí gros segons el tipus de teixit a partir del qual s'han originat. El més freqüent, que comprèn més del 95% del total dels casos, és l'adenocarcinoma, un tumor que es forma a partir de la mucosa o capa de teixit mucós que revesteix l'interior de l'òrgan i en el qual hi ha glàndules intestinals que secreten moc. La resta dels casos es reparteixen fonamentalment entre els fibrosarcomes, originaris de les fibres de teixit connectiu de la paret intestinal; els liposarcomes, formats per teixit gras de la paret

intestinal, i els limfomes, que s'originen en les acumulacions limfoides de la paret intestinal. Segons la direcció en què efectuen llur desenvolupament es diferencien dos tipus de tumors malignes d'intestí gros: els estenosants més freqüents al còlon descendent, el sigma i el recte, caracteritzats per créixer en forma d'anell en la superfície interna de la mucosa intestinal i disminuir progressivament la llum de l'òrgan; i els polipoides presents en el còlon ascendent i el transvers, creixen des de la mucosa cap a la llum intestinal i adopten una forma esfèrica o allargada, en que la massa central del tumor sovint només comunica amb al paret de l'intestí mitjançant una tija o un pedicle. Aquests últims a diferència dels anteriors, solen trigar més temps a erosionar-se o infiltrar-se pels teixits profunds de la paret intestinal (Vilardell Tarrés, 1990).

L'aparició del càncer segueix una progressió en molts estadis, tant a nivell molecular com morfològic. L'estadiatge és un dels millors determinants per la supervivència del pacient amb CRC. Al llarg del temps s'han postulat diferents sistemes d'estadiatge, entre els quals cal destacar els estadis de Dukes i la classificació Tumor-Node-Metàstasi, més actual, completa i complexa. Els estadis Tumor-Node-Metàstasi I i II inclouen els càncers invasius que estan confinats en la paret del còlon (Dukes A i B); quan aquests s'estenen als nodes limfàtics regionals es dona l'estadi III (Dukes C); l'estadi IV indica la presència de metàstasis en regions distants (Dukes D) (Compton and Greene, 2004; Puppa et al., 2010).

2.2 Bases moleculars del CRC.

El càncer és conseqüència de l'acumulació de múltiples alteracions genètiques que segueixen el mateix sistema de mutació/selecció involucrat en el procés evolutiu. Aquelles cèl·lules amb mutacions que confereixin un avantatge en el creixement, ja sigui per augment de la capacitat de proliferació com disminució de la mort cel·lular, es propaguen de forma predominant respecte la resta de les cèl·lules (expansió clonal).

El primer model de progressió tumoral que va integrar el concepte de progressió *multistep* amb la identificació d'alteracions genètiques concretes és el proposat per Fearon i Vogelstein (Fearon and Vogelstein, 1990) i va suposar una fita històrica en la recerca sobre el càncer (Fig. i4). En aquest model les diferents etapes del procés tumoral (adenoma primerenc, intermedi i tardà; i carcinoma) estan associades a alteracions moleculars com la pèrdua d'heterozigositat en regions cromosòmiques com 5q, 17p i 18q, i mutacions en el gen K-ras. Aquestes alteracions afecten als gens supressors de tumors (APC i p53, per exemple), la repressió dels quals beneficia la tumorigènesi, i als oncògens (MYC i K-ras, entre d'altres), que a l'activar-se col·laboren amb la transformació neoplàstica. Tot i que el model suggereix un ordre preferent d'aparició de les diferents alteracions genètiques, els models actuals consideren que els elements claus per al desenvolupament del procés tumoral rau en les modificacions de

determinades vies de senyalització més que en l'alteració de gens específics (Vogelstein and Kinzler, 2004).

La inestabilitat genètica ha emergit com un component crític en la transformació cel·lular, que s'ha inclòs en el model *multistep* de progressió tumoral. Aquest mecanisme, encarregat de generar heterogeneïtat, està vinculat a la idea de fenotip mutador de les cèl·lules tumorals, en que mutacions en vies claus augmenten la taxa d'adquisició de noves mutacions (reparació del DNA, dany en els punts de control cel·lular i segregació cromosomal, entre d'altres) (Loeb, 2001).

L'exemple arquetípic d'inestabilitat genòmica com a motor de la progressió tumoral són els tumors HNPCC. Aquests es caracteritzen per mutacions en la maquinària de reparació dels errors en el DNA, fet que implica un elevat índex de mutacions en les repeticions simples en tàndem comportant delecions i insercions en seqüències microsatèl·lits (Perucho et al., 1994).

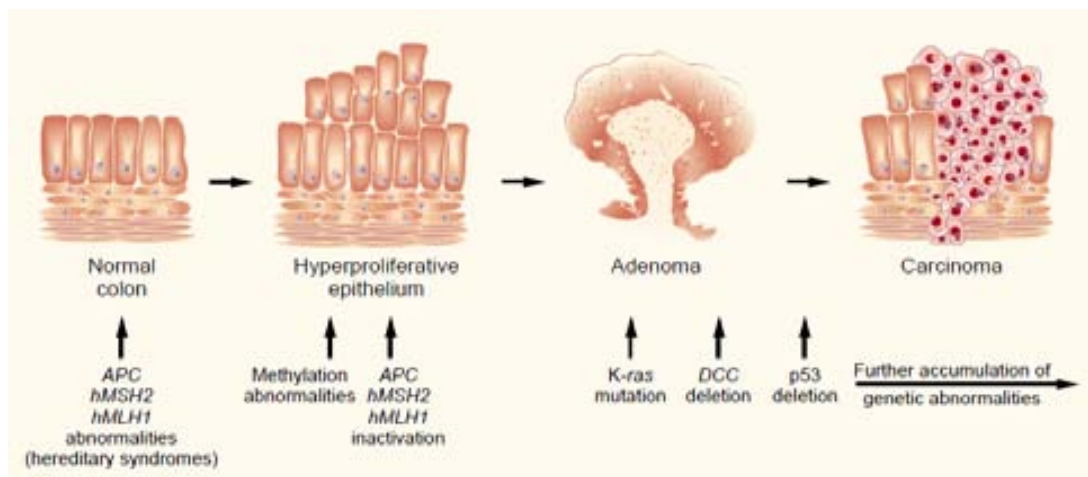


Figura i4. Model de Vogelstein revisat per la progressió de CRC. Diferents estadij tumorals estan associats a alteracions genètiques i epigenètiques (Toribara and Sleisenger, 1995).

2.3 Propietats claus de les cèl·lules canceroses.

La transformació de teixits normals a estadis de malignitat requereix la participació de dos personatges: les cèl·lules canceroses i el seu microambient. Durant el procés tumoral, les cèl·lules neoplàstiques i l'estroma adjacent canvien progressivament, degut al bescanvi de senyals heterotípics entre elles. Molts d'aquests senyals que determinen el fenotip de teixits primaris es repeteixen en teixits distants quan les cèl·lules canceroses disseminades procedeixen a la colonització (Hanahan and Weinberg, 2011; Psaila and Lyden, 2009).

Per tal d'evolucionar cap a un estat neoplàstic, les cèl·lules normals han d'adquirir diferents propietats biològiques. Recentment, Hanahan i Weinberg han revistat aquestes característiques bàsiques que permeten el creixement del tumor i la disseminació metastàtica (Fig. i5): manteniment dels senyals proliferants, evasió de la supressió del creixement, resistència a la mort cel·lular, permissivitat a la immortalitat replicativa, inducció de l'angiogènesi, activació de la invasió i metàstasi, deregulació energètica cel·lular i elusió a la destrucció immune. De forma subjacent cal destacar la contribució de la inestabilitat genètica i la inflamació (Hanahan and Weinberg, 2011).

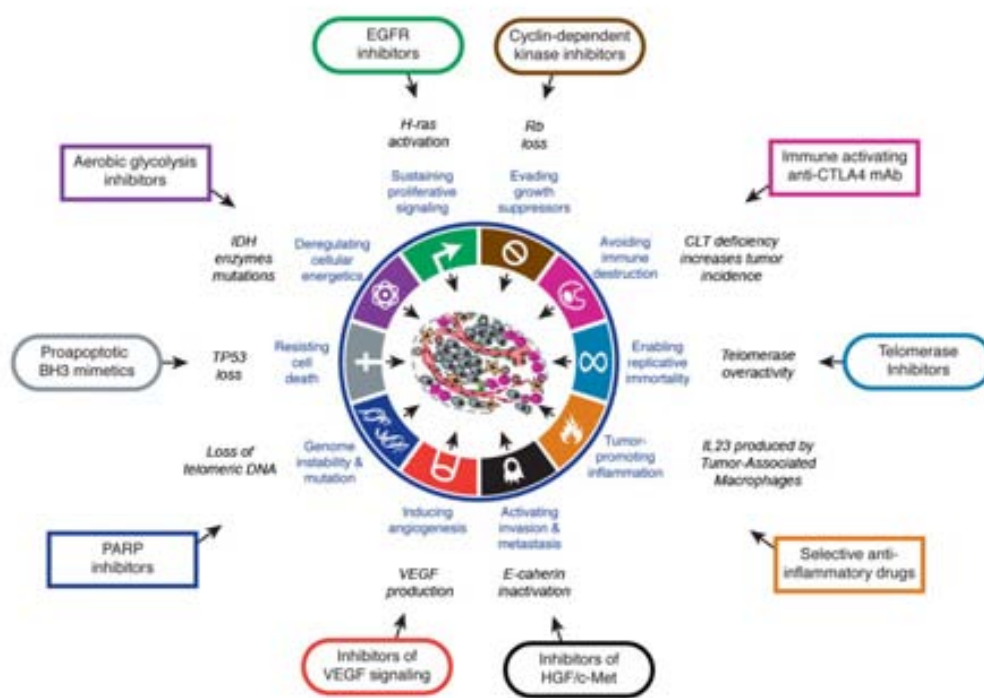


Figura i5. Característiques indispensables del procés tumoral. Hi ha un exemple de cada una de les capacitats necessàries per al creixement i progressió tumoral en cursiva. Dins els quadrats i formes ovals hi ha exemples de les drogues que interfereixen en aquests processos que estan en proves clíniques o ja s'utilitzen en clínica. Modificat de (Hanahan and Weinberg, 2011).

2.4 Cèl·lules mare canceroses.

La identificació de les cèl·lules responsables de la propagació tumoral és un dels objectius principals per tal de dissenyar una aproximació terapèutica efectiva. En contraposició al model estocàstic de mutació i expansió clonal, estudis recents senyalen el model d'SC cancerosa com el responsable de la progressió tumoral (Barker et al., 2009; Zhu et al., 2009). Aquest model proposa que les cèl·lules tumorals mantenen una organització jeràrquica basada en una població de cèl·lules amb capacitat de renovació pròpia que dona lloc a varies poblacions cel·lulars amb propietats diferents: més SC canceroses amb capacitat pròpia de renovació; cèl·lules progenitores amb una capacitat limitada de proliferació; i finalment cèl·lules diferenciades defectuoses, mancades de potencial proliferant (Vries et al., 2010) (Fig. i6).

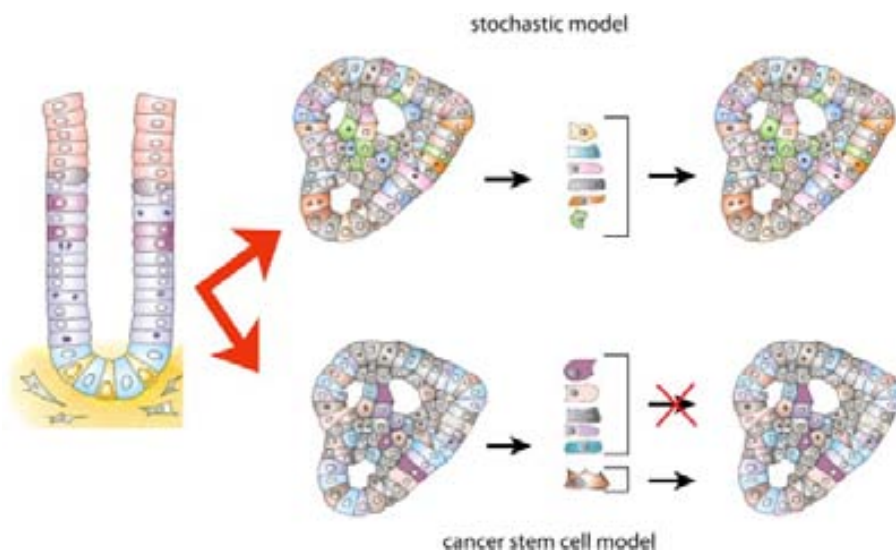


Figura i6. Comparació del model estocàstic i el model d'SC cancerosa. Les criptes de l'intestí normal estan representades a l'esquerra. En càncer, la propagació de les cèl·lules anormals pot seguir un model estocàstic o un model d'SC cancerosa (Vries et al., 2010).

Una altre qüestió fonamental sobre el desenvolupament tumoral és l'origen de l'SC cancerosa. Ha estat postulat que l'SC cancerosa inicial podria ser una SC adulta (cèl·lula progenitora) o una cèl·lula que estigui en estadis primaris de diferenciació. Estudis recents en intestí prim de ratolins conclouen que les SC amb alteracions en la via de Wnt generen ràpidament una progènie de cèl·lules transformades al llarg de la cripta (Barker et al., 2008; Zhu et al., 2009). En canvi, quan l'alteració es dona en les cèl·lules diferenciades no hi ha formació tumoral (Barker et al., 2009). Aquests resultats suggereixen que les SC adultes són les cèl·lules responsables de la formació de l'adenoma en intestí prim de ratolí. A més, un estudi recent en còlon d'humans mostra que el programa de les SC intestinals defineix el nínxol de les SC canceroses en tumors colorectals i té un rol central en la reincidència tumoral (Merlos-Suarez et al., 2011).

3. Mecanismes epigenètics.

L'epigenètica és la ciència que estudia els canvis en els cromosomes o en la funció gènica que s'hereten però no varien la seqüència de DNA (Feinberg and Tycko, 2004). La metilació del DNA (apartat 3.1), les modificacions post-transcripcionals de les histones (apartat 3.2) i els canvis en el posicionament dels nucleosomes (apartat 3.3) són considerats els principals mecanismes d'herència epigenètica. Aquests mecanismes, juntament amb al regulació mitjançant l'RNA (apartat 3.4) i l'organització nuclear (apartat 3.5), treballen en el manteniment del desenvolupament normal i la homeòstasi cel·lular. L'alteració del context epigenètic s'ha descrit en diferents malalties, incloent el càncer (Portela and Esteller, 2010).

3.1 La metilació del DNA.

La metilació del DNA és una modificació covalent, que en mamífers es produeix majoritàriament en el carboni 5 de les citosines que formen el dinucleòtid CpG. Aquest dinucleòtid està infrarepresentat en el genoma, ja que la metilació de la citosina facilita la transició d'aquesta a timina. A més, les CpGs no presenten una distribució aleatòria, essent agrupades en les regions anomenades illes CpG (CpGi, Fig. i7) (Robertson and Wolffe, 2000).

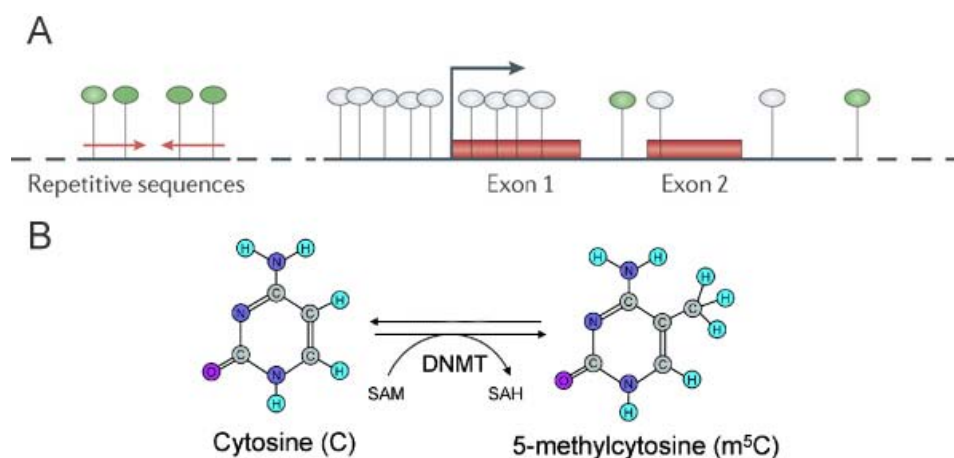


Figura i7. A. Distribució del dinucleòtid CpG en diferents regions del genoma. El primer exó té una CpGi associada. Cada bola representa un dinucleòtid CpG. El color verd indica metilació del DNA i el color blanc l'absència de metilació. La fletxa simbolitza el sentit de la transcripció del gen. **B.** Esquema del procés de metilació. Modificat de (Beisel and Paro, 2011; Gronbaek et al., 2007).

Les CpGi es defineixen com regions majors de 200 bases amb un contingut G+C mínim del 50% i una ràtio de $CpG_{\text{observada}}/CpG_{\text{estadísticament esperada}}$ igual o superior al 0,6 (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Recentment, Feinberg i d'altres han revisat els criteris que defineixen les CpGi utilitzant mètodes sofisticats que inclouen l'ús de models ocults de Markov (Wu et al., 2010). La major part de les CpGi (~60%) estan associades a regions promotores. Descobriments recents indiquen que la metilació de DNA específica de teixit succeeix majoritàriament en regions amb densitats baixes de dinucleòtid CpG localitzades a prop de les CpGi, el que es coneix com les CpGi *shores* (Irizarry et al., 2009). De forma similar, l'estudi de la metilació del DNA en 21 teixits normals d'humans de 12 regions anatòmiques diferents, mostra que les regions diferencialment metilades es corresponen a promotors pobres en contingut CpG. També es conclou que la hipometilació succeeix en gens que realitzen una funció important pel tipus cel·lular específic, mentre les regions hipermetilades no estan associades a un tipus específic de CpGi o una funció biològica determinada (Nagae et al., 2011).

D'altra banda, les CpG localitzades en seqüències repetitives tendeixen a estar més metilades, el que és considerat com un mecanisme de prevenció de la inestabilitat cromosòmica, les translocacions i la disrupció gènica mitjançant la reactivació de seqüències parasitàries endògenes. La metilació del DNA i les proteïnes encarregades de dur a terme aquest procés s'han relacionat amb la regulació transcripcional en *trans* (Portela and Esteller, 2010). A més, la metilació del DNA té un paper clau en la inactivació del cromosoma X i l'*imprinting* genòmic, mecanisme encarregat de regular l'expressió gènica a partir de l'al·lel matern o patern (Robertson and Wolffe, 2000).

Els patrons de metilació del DNA s'estableixen mitjançant DNA metiltransferases (DNMTs). En mamífers s'han descrit cinc membres d'aquesta família, però només tres són actius: DNMT3a i DNMT3b són les metiltransferases *de novo* i són responsables de la metilació durant els estadis embrionaris i les seqüències retrovirals integrades; DNMT1 es considera la metiltransferasa de manteniment i és la més abundant en les cèl·lules somàtiques amb un elevada afinitat pel DNA hemimetilat. Tot i això, alguns estudis indiquen que les DNMTs *de novo* poden dur a terme el manteniment en cèl·lules somàtiques. A més, DNMT2 presenta activitat RNA metiltransferasa (Robertson and Wolffe, 2000).

Les proteïnes d'unió al grup metil (MBD) realitzen un paper molt important en la funció de la metilació del DNA: MECP2, MBD1 i MBD2 actuen com a repressors transcripcionals; MBD3 pertany al complex Mi-2-NuRD i promou les variacions en la posició dels nucleosomes mitjançant la hidròlisis d'ATP; MBD4 està implicada en la reparació dels errors de replicació; Kasp1 és una proteïna *zinc finger* que actua com a repressor reconeixent la metilació o un seqüència específica; i ZBTB4 i ZBTB5 són també proteïnes *zinc finger* que indueixen el silenciament gènica. Aquestes proteïnes participen en el reclutament de factors de remodelació de la cromatina i complexos reguladors de la transcripció (Li, 2002; Lopez-Serra and Esteller, 2008).

Durant el desenvolupament hi ha dues fases en que s'elimina la metilació del DNA: durant la preimplantació del zigot i en la formació de la cèl·lula germinal. Així doncs, s'ha observat que després de la fertilització hi ha desmetilació i que aquesta succeeix més ràpidament en el genoma patern que en el matern. Després, la metilació *de novo* s'inicia un cop s'ha implantat el blastòcit i els nivells són més elevats en el teixit embrionari que en l'extra-embriònic. A més, la metilació en les cèl·lules germinals primordials també s'esborra, recuperant-la durant l'espermatogènesi en mascle, i després del naixement en femelles (Reik et al., 2001). S'ha descrit la implicació de diferents factors en aquests processos de metilació *de novo*, manteniment de la metilació i desmetilació, com per exemple les DNMTs (Fig. i8).

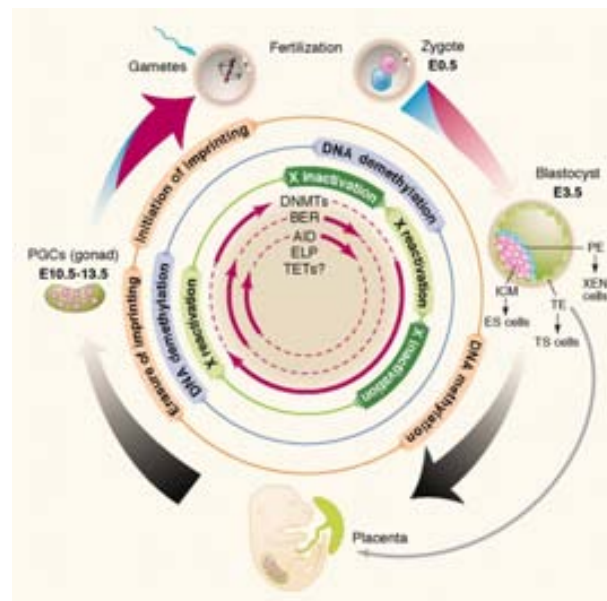


Figura i8. Metilació del DNA durant el desenvolupament. El gruix de les fletxes exteriors indica els nivells de metilació del DNA. En vermell es representa el genoma matern i en blau el patern. Les fletxes a l'interior del cercle mostren l'ordre temporal en el que aquests reguladors epigenètics actuen. Les cèl·lules SC embrionàries (ES), de trofoblast (TS) i d'endoderma extraembrionari (XEN) deriven de la massa cel·lular interna, el trofoblast i l'endoderma primitiu del blastòcit, respectivament (Feng et al., 2010).

Estudis recents han desvelat modificacions addicionals de les citosines (He et al., 2011; Ito et al., 2011), com la hidroximetilació de la citosina 5 (5hmC). Aquesta modificació és resultat de la conversió de la citosina 5 metilada mitjançant les proteïnes TET (Tahiliani et al., 2009). La 5hmC s'ha detectat en tots els teixits murins (elevades quantitats en cervell) i en les SC embrionàries (Globisch et al., 2010) i s'ha observat que inhibeix la unió de les proteïnes MBD, suggerint que pot ser un intermediari directe del procés de desmetilació del DNA, malgrat no haver-hi evidències experimentals que recolzin aquesta afirmació (Jin et al., 2011b). Tot i que la seva implicació en la homeòstasi cel·lular roman una incògnita, s'ha observat la seva pèrdua en tumors colorectals i altres càncers (Jin et al., 2011a; Kudo et al., 2012).

3.2 Les modificacions d'histones i les implicacions en la cromatina.

La cromatina es defineix com el complex DNA-proteïna responsable de l'empaquetament del material genètic en el nucli cel·lular, sent les histones les proteïnes majoritàries de la cromatina.

3.2.1 Les histones i les seves modificacions post-traduccionals.

En l'empaquetament del material genètic en el nucli, el nivell inferior d'organització és el nucleosoma, en el que el DNA envolta un octàmer d'histones (H2A, H2B, H3 i H4, totes elles duplicades). Els nucleosomes estan connectats mitjançant fragments curts de DNA i la cadena que formen es plega i s'estabilitza amb la unió de la histona H1 a ambdós elements (nucleosoma i DNA adjacent) (Felsenfeld and Groudine, 2003).

A més, de la seva funció en l'empaquetament del DNA, les histones són reguladors dinàmics de l'activitat gènica, degut a les diferents modificacions químiques post-traduccionals presents en els aminoàcids terminals de les seves cues. Aquestes modificacions en les histones es mantenen estables durant la divisió cel·lular i el seu paper en la regulació de la transcripció el poden desenvolupar en *cis*, canviant l'estructura de la cromatina, o en *trans* (Taula i2), dificultant la unió de determinades proteïnes o reclutant-ne. A més, cal mencionar que la presència d'una modificació determinada pot condicionar la presència de les altres, ja sigui per antagonisme competitiu, afectació per modificació del substrat, dependència o cooperació en el reclutament de factors específics, entre d'altres. Com per exemple el fet que la tri-metilació de la lisina 4 de la Histona 3 (H3K4me3) impedeix de forma al·lostèrica la unió de Su(z)12 *in vitro*, evitant la deposició de tri-metilació en la lisina 27 de la mateixa histona (H3K27me3) (Schmitges et al., 2011).

Chromatin modifications	Examples of Modified Residues	Regulated Functions
Acetylation	H3K9ac	Transcription, Repair, Replication, Condensation
Lysines methylation	H3K4me2, H3K27me3	Transcription, Repair
Arginines methylation	R-me1, R-me2a, R-me2s	Transcription
Phosphorylation	S-ph T-ph	Transcription, Repair, Condensation
Ubiquitylation	K-ub	Transcription, Repair
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription
Deimination	R → Cit	Transcription
Proline isomerization	P-cis → P-trans	Transcription

Taula i1. Implicacions d'algunes de les modificacions d'histones. K= lisina; R= arginina; S= serina; T= treonina; P=prolina; E= glutamina. Reproduït de (Kouzarides, 2007a).

Tal i com es mostra en la Taula i1, a més de participar en la transcripció, algunes modificacions estan vinculades a la regulació de la replicació o reparació del DNA. En aquest treball, però, ens centrarem en les que estan implicades en la regulació transcripcional.

Aquestes modificacions poden involucrar l'addició de grans pèptids (ubiquitinació, sumoilació) o de grups químics petits (acetilació, metilació i fosforilació).

Acetilació

L'acetilació neutralitza la càrrega aminoacídica, disminuint la força d'unió del DNA, fent-lo més accessible als factors de transcripció i generant un lloc d'unió per al bromodomini, que és present en moltes proteïnes associades a la cromatina. Els enzims responsables d'aquestes modificacions són les histones acetiltransferases (HAT) i les histones deacetilases (HDAC). Les HATs de tipus B acetilen histones lliures, fet que modifica el seu patró de deposició. D'altra banda, les HATs de tipus A (GNAT, MYST i CBP/p300) neutralitzen la càrrega positiva de les cues de les histones i també del centre globular (H3K56) afectant la unió histona-DNA. La varietat de dominis catalítics de les HATs fa que aquestes presentin diferents especificitats. Contràriament, les HDAC (classe I-IV) es caracteritzen per una baixa especificitat de substrat (Kouzarides, 2007b).

Tots els residus acetilats es correlacionen directament amb l'activitat transcripcional, però cadascun presenta una localització gènica diferent. Per exemple, l'acetilació de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9ac) es localitza majoritàriament prop de l'inici de transcripció, mentre que H4K16ac és més present en promotors i cossos dels gens (Wang et al., 2008).

Metilació

L'addició d'un grup metil no modifica la càrrega de la cromatina. Aquesta modificació pot associar-se tant a l'activació com al silenciament, depenent del residu d'histona modificat (diferents lisines o arginines de les cues d'histones), el grau de metilació (mono, di, tri) i la localització dins el gen (Fig. i9). El mecanisme contrari, la desmetilació, està mediat en lisines per diferents dominis catalítics (LSD1, JMDM), mentre que en arginines s'ha descrit la seva deiminització a citrul·lina com un possible mecanisme de neutralització de la marca (Kouzarides, 2007a).

S'ha descrit àmpliament que H3K4me és un marca activa mentre que H3K27me_{2/3} i H3K9me_{2/3} són marques inactives (Barski et al., 2007). A més, alguns gens poc expressats o silenciats tenen H3K4me₃ i H3K27me₃ en la seva regió promotora, els anomenats dominis bivalents (Bernstein et al., 2006). Tot i que aquest patró es considera característic d'SC, s'ha trobat també en teixits diferenciats, cèl·lules canceroses i línies cel·lulars (Mohn et al., 2008; Rodriguez et al., 2008). Els dominis bivalents i la seva presència al llarg de la diferenciació seran discutits àmpliament més endavant.

Les anàlisis a escala global han permès detectar dominis repressius, que a més de ser característics de telòmers, centròmers i el cromosoma X inactiu, s'han descrit en altres regions gèniques. Així doncs, s'han trobat dominis que engloben gens silenciats o regions intergèniques enriquides en marques inactives: els BLOCs (*Broad Local Enrichments*) en fibroblastes embrionaris murins amb alt nivell d'H3K27me3 (Pauler et al., 2009); i els LOCKs (*Large Organized Chromatin H3K9me2*) en SC embrionàries, rics en H3K9me2 (Wen et al., 2009).

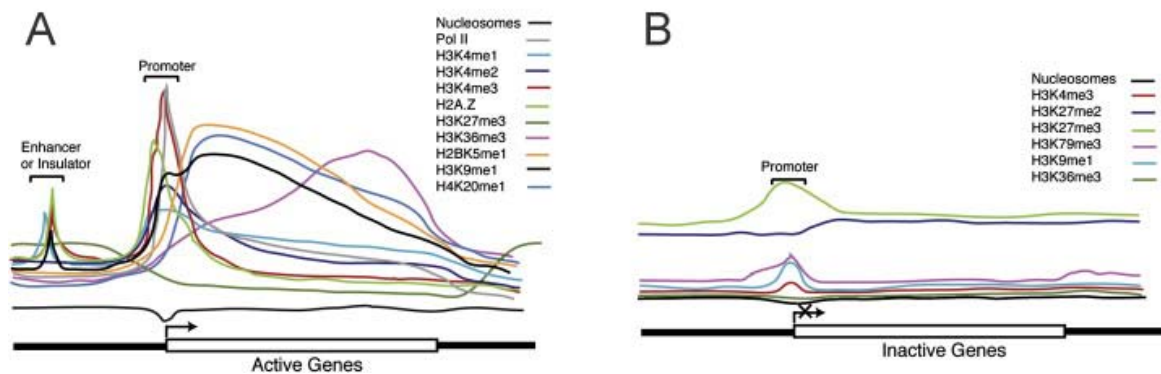


Figura 19. Perfil de les metilacions en les histones en cèl·lules CD4⁺T. **A.** Gens actius tenen H3K4me1/2/3, H3K9me1 i la variant H2A.Z al voltant de l'inici de transcripció i H3K36me3, H3K27me1, H4K20me1 i H2BK5me1 en el cos del gen. En *enhancers* hi ha H3K4me, la variant H2A.Z i H3K9me1. **B.** H3K27me2/3 s'ha trobat en gens inactius, en alguns promotors i cossos de gens (Barski et al., 2007).

Altres modificacions

A part de la metilació i l'acetilació, altres modificacions d'histones també participen en la regulació dels estats funcionals de la cromatina: les quinases afegixen el **grup fosfat** als residus de serina, treonina i tirosina, fet que modifica la càrrega de la cromatina, fent-la transcripcionalment accessible (excepte en H3S10 durant la mitosis) i pot ser revertit gràcies a les fosfatases; **B-N-acetoglucosamina** és una modificació dinàmica que involucra les serines i treonines d'H2A, H2B i H4; els residus de glutamina i arginina poden estar mono- (associat a augment en el dany) o **poly-ADP ribosilat** (relacionat amb cromatina relaxada); la **ubiquitinació** és una gran modificació covalent reversible, que pot ser afegida de forma simple o múltiple. La **sumoilació** és la unió covalent d'una molècula d'ubiquitina petita, que antagonitza l'acetilació i la ubiquitinació de la mateixa cadena. **El tall de la cua d'histones** succeeix durant la diferenciació de les SC murines, quan la catepsina elimina els primers 21 aminoàcids de la H3, i es correlaciona amb l'alteració de la localització dels nucleosomes. Finalment, la **isomerització de la prolina** en la H3P38 s'ha descrit en llevat, fet que evita el reconeixement de la H3K36 per altres factors de la cromatina com les metiltransferases (Bannister and Kouzarides, 2011).

Tal i com s'ha descrit anteriorment, les modificacions d'histones poden exercir diferents efectes influenciant directament en l'estructura global de la cromatina o facilitant/bloquejant la unió de múltiples factors de la cromatina (exemples en Taula i2)

Mark	Recognised by		Implications
	domain	enzyme	
H3K4me3	PHD	ING2	HDACs recruitment promoting DNA damage
	Chromodomain	CHD1	Nucleosome replacement
	Tudor	JMJDA	Histone demethylation
H3K9me3	Chromodomain	HP1	Heterochromatinization by itself dimerization and H1.4K26me interaction.
H4K20me1/2	MBT	L3MBTL1	Nucleosomal compaction by itself dimerization and H1bK26me1/2
Acetylated lysines	Bromodomain	Swi2/Snf2	Chromatin opening by SWI/SNF complex recruitment
	PHD	DPF3b	BAF complex recruitment
H3S10ph	14-3-3	14-3-3	Recruitment of proteins involved in elongation
		MDC1	Binds to γ H2AX and is involved in DNA repair process

Taula i2. Exemples de les diferents modificacions d'histones i el seu mecanisme d'actuació (Bannister and Kouzarides, 2011).

La metilació del DNA i les modificacions d'histones treballen conjuntament en la regulació de l'expressió gènica. De forma general, la metilació del DNA en les CpGi promotores es caracteritza per la presència de marques d'histones repressives i un entorn heterocromàtic, mentre que els gens que no tenen les regions promotores metilades s'associen a l'activació transcripcional i marques d'histona actives (acetilació, fosforilació i H3K4me3, per exemple). Tot i això, s'han descrit alguns casos que contradiuen aquest dogma. Per exemple, s'ha observat que el tractament amb inhibidors de deacetilases comporta la reexpressió gènica sense alterar la metilació del DNA de les CpGi promotores, demostrant que la metilació del DNA actua com a memòria cel·lular de la repressió gènica (Raynal et al., 2012).

Tot i que, diferents resultats obtinguts amb el tractament d'inhibidors de deacetilases i inhibidors de metilació suggereixen que la metilació del DNA succeeix un cop s'han establert les marques inactives en les histones (H3K9me2/3) (Fahrner et al., 2002; Kondo et al., 2003; Meng et al., 2009), aquest model segueix sent una de les possibles hipòtesis d'establiment de les marques epigenètiques de silenciament.

3.2.2 Proteïnes Polycomb i Trithorax.

Les proteïnes *Polycomb* (PcG) i *Trithorax* (Trx) treballen conjuntament per regular la dinàmica de la cromatina, l'expressió gènica i per retenir la memòria cel·lular durant la vida de l'organisme. Ambdós grups administren la metilació de les lisines i van ser descrits primerament en *Drosophila melanogaster*, on PcG manté els gens *Hox* silenciats durant el desenvolupament i Trx manté la seva expressió en els dominis espacials apropiats (Mills, 2010). Ambdós complexos presenten elevada conservació en les diferents espècies.

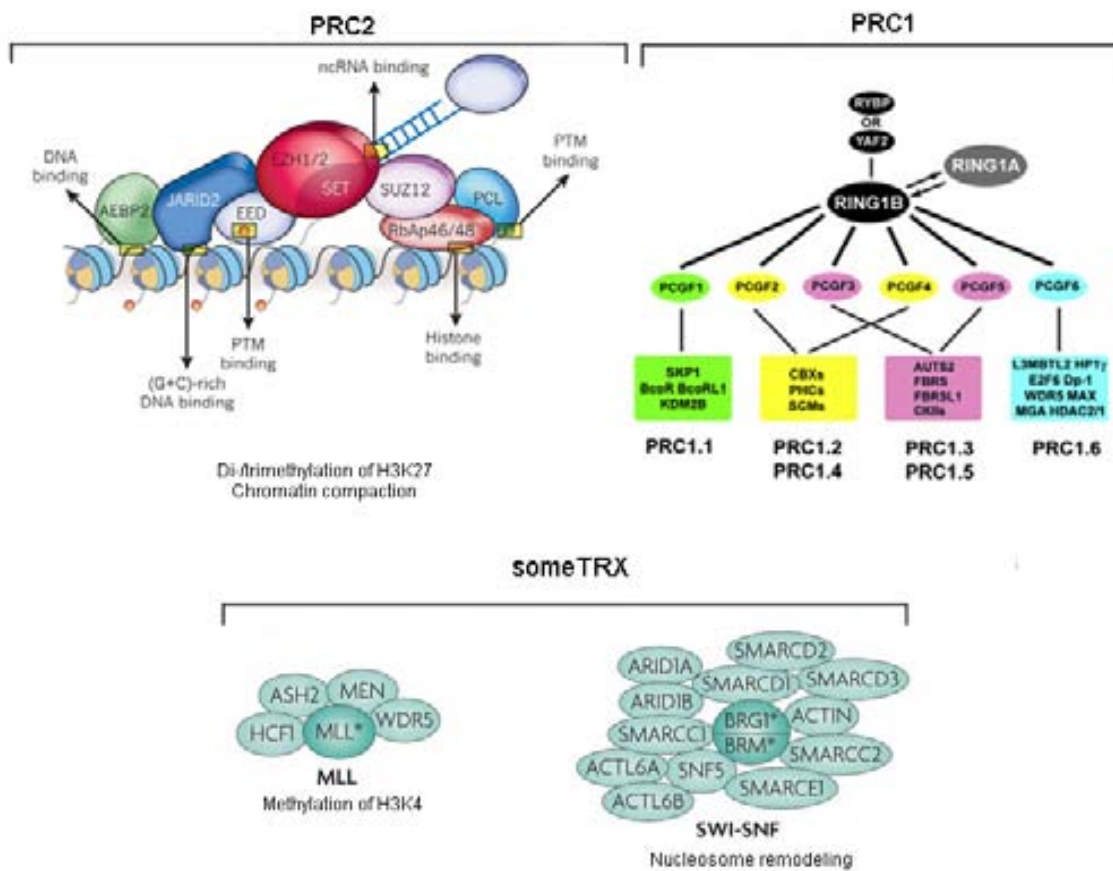


Figura i10. Diagrama on es representa la composició dels complexos PcG i Trx. En PRC2 apareixen les possibles interaccions amb el DNA i les histones que poden explicar el reclutament de PRC2. També es representa la composició de les sis subfamílies del complex PRC1, el grup Trx MLL (*Mixed-Lineage Leukemia*) i el complex remodelador dels nucleosomes SWI/SNF (Gao et al., 2012; Margueron and Reinberg, 2011; Mills, 2010).

Hi ha dos complexos PcG descrits (PRC2 i PRC1, Fig. i10) i diversos factors i proteïnes associades a aquests complexos (complex YY1, per exemple). En PRC2 el domini SET d'EZH és l'encarregat de metilar H3K27me3 (Muller et al., 2002). Tot i que experiments *in vitro* mostren que EZH també s'uneix a H3K9me3, aquest fenomen no s'ha observat *in vivo* (Kuzmichev et al., 2002), suggerint que tot i que la unió és possible, hi ha una preferència per la lisina 27. S'han descrit dos subunitats d'EZH (EZH1 i EZH2) que realitzen funcions diferents: PRC2-EZH2 estableix *de novo* H3K27me2/3 i PRC2-EZH1 (només present en cèl·lules de divisió activa) reestableix l'H3K27me2/3 que podria haver-se perdut després de l'intercanvi d'histones o durant l'activitat desmetilasa (Margueron and Reinberg, 2011). Per tal d'exercir l'activitat metiltransferasa, són necessàries les proteïnes SUZ12 i les homologues a NURF55 de *Drosophila* (RBBP4/RbpAp48 i RBBP7/RbpAp46), que són responsables de la interacció del complex amb els nucleosomes. A més, la proteïna EED contribueix tant a la unió al nucleosoma com a l'activitat enzimàtica, sense ser indispensable (Nekrasov et al., 2005). S'ha descrit que la interacció d'EED amb H3K27me3 estimula l'activitat HMT en PRC2, generant la propagació de la marca (Margueron et al., 2009). Malgrat regular l'inici de transcripció, algunes evidències suggereixen que PRC2 i H3K27me3 podrien afectar l'expressió gènica mitjançant el control de l'elongació d'RNA polimerasa II. El complex PRC1 reconeix i s'uneix a H3K27me3 mitjançant el cromodomini de les proteïnes CBX i monoubiquitinitza la lisina 119 de la histona H2A gràcies al domini RING de BMI1 i d'altres proteïnes (Schuettengruber et al., 2007). A més, un estudi recent realitzat per Reinberg i col·laboradors mostra l'elevada heterogeneïtat del complex PRC1, descrivint sis grups dins la família PRC1, mostrant una distribució genòmica diferencial associada a diferències funcionals dels gens (Gao et al., 2012).

El reclutament d'ambdós complexos en mamífers no s'ha dexifrat. En PRC2, els elements repressius PcG (responsables del reclutament en *Drosophila*) s'han descrit només en els *loci* MAF i HOX (Mills, 2010) i s'ha proposat que la suma de petites interaccions de cadascun dels components de PRC2 és la causa del reclutament del complex (mostrat en la Fig. i10) (Margueron and Reinberg, 2011). L'anàlisi dels gens HOX en SC embrionàries mancades de PRC1 o PRC2 suggereixen que PRC2 promou el reclutament de PRC1 i que aquest últim és l'encarregat de la compactació de la regió (Eskeland et al., 2010). Tot i això, estudis en el silenciament del gen XIST (inactivació del cromosoma X) mostren que el silenciament mitjançant PRC1 pot ser independent a PRC2 en SC embrionàries (Schoeftner et al., 2006).

Trx és un complex heterogeni, que inclou membres amb capacitat d'unió a seqüències específiques de DNA, proteïnes amb dominis SET (com MLL) i components del complex remodelador de la cromatina (SWI/SNF, NURF) (Fig. i10). Mentre que MLL té activitat metiltransferasa sobre la lisina 4, WDR5 confereix estabilitat al complex i ASH2L participa en la metilació del substrat H3K4me2 (Steward et al., 2006).

A part de la metilació de les lisines, els complexos Trx i PcG poden reclutar, directe o indirectament, les proteïnes que faciliten altres modificacions covalents de les histones, com les HATs, HDACs, desmetilases de lisines o DNMTs (Mills, 2010).

3.2.3 Diferents criteris de classificació de la cromatina.

De forma clàssica, la cromatina s'ha dividit en tres compartiments diferents tenint en compte la seva estructura i funcionalitat. L'**euromatina** correspon a les regions relaxades que contenen la major part dels gens actius i pateixen canvis associats al cicle cel·lular. Tot i estar caracteritzada per la presència de marques actives (com H3K4me1/2/3 i H3K36me3), els components de la heterocromatina poden estar presents i participar en la regulació de l'activitat gènica. L'**heterocromatina facultativa** engloba regions genòmiques que contenen gens diferencialment expressants durant el desenvolupament i/o la diferenciació i que esdevenen silenciats. La modificació de la H3K27me3 i les proteïnes PcG han estat relacionades amb el silenciament d'aquest compartiment. L'**heterocromatina constitutiva** conté regions genòmiques silenciades de forma permanent, com els centròmers i telòmers, normalment compostats per seqüències repetitives que tenen una funció estructural. Està caracteritzada per tenir elevats nivells de HP1 α/β i H3K9me3 (Fig. i11). La HP1 dimeritzada interacciona amb H3K9me2/3 (utilitzant els cromodominis) alhora que s'uneix a SUV39, una metiltransferasa d'H3K9 que participa en el manteniment de l'heterocromatina durant la replicació (Bannister and Kouzarides, 2011).

Els elements que formen les barreres físiques com el CTCF, tenen un paper molt important alhora de mantenir els dominis de cromatina activa i reprimida. La contribució de CTCF en l'activació de la transcripció, la repressió, l'aïllament i l'*imprinting* són els efectes secundaris corresponents al seu rol d'organitzador genòmic de l'arquitectura de la cromatina omnipresent (Phillips and Corces, 2009).

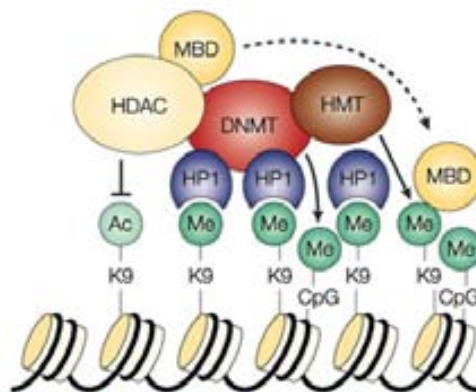


Figura i11. Organització de la cromatina i la maquinària responsable del silenciament gènic en l'heterocromatina constitutiva (Feinberg and Tycko, 2004).

Tot i que la classificació eucromatina/heterocromatina és àmpliament utilitzada, diferents estudis han permès una classificació més acurada de la cromatina. Un estudi integratiu a escala global de 52 components de la cromatina en cèl·lules de *Drosophila*, ha mostrat que el genoma està segmentat en cinc tipus, il·lustrats amb un codi de colors (Fig. i12): groc i vermell es corresponen a l'eucromatina; verd i blau a l'heterocromatina; i negre a la cromatina repressiva (Filion et al., 2010). Al extrapolar-ho a humans cal tenir en compte que les proteïnes i les marques poden adoptar diferents comportaments durant l'evolució, per exemple els patrons de Laminina B humana es corresponen amb l'H3K9me2, mentre que la Laminina B de *Drosophila* coincideix amb la cromatina negra i l'H3K9me2 amb la verda (van Steensel, 2011).

A més, l'anàlisi del consorci *Drosophila* mod ENCODE ha descrit un sistema de 9 estats, els quals presenten una elevada correlació amb la classificació de cinc colors, però dibuixa una imatge més complexa, on estats específics de la cromatina tenen enriquiments funcionals (Roy et al., 2010). Altres anàlisis genòmics destaquen la heterogeneïtat i complexitat de les regions d'heterocromatina, les quals presenten disminució d'H3K9me prop de l'inici de transcripció (Riddle et al., 2011).

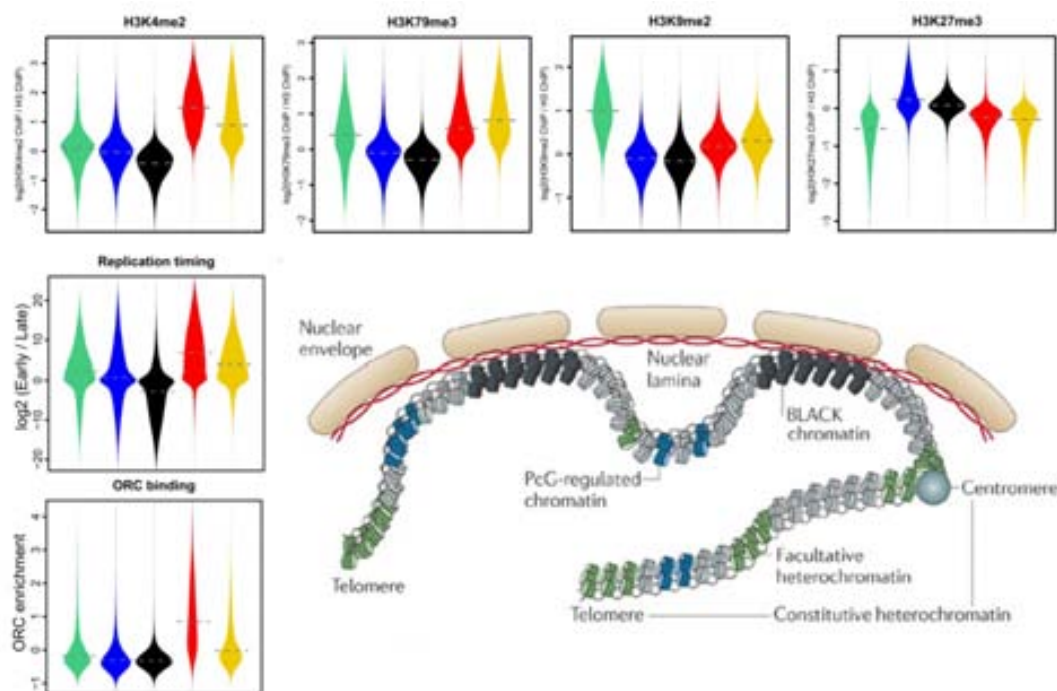


Figura i12. Perfils de cromatina en *Drosophila melanogaster*. La cromatina groga correspon als gens expressats de forma ubiqüa tals com els *housekeeping* i els enzims de control de l'acetilació d'histones; vermell engloba els gens específics de teixit i que tenen un elevat recanvi de nucleosomes amb enriquiment d'H3.3 i manca d'H3K36me3, la qual pot tenir una funció de la repressió de promotors críptics en sentit contrari; blau és la cromatina regulada per PcG i es caracteritza per elevats nivells d'H3K27me3; verd correspon a l'heterocromatina clàssica marcada per SU(VAR)3-9 i HP1, enriquida per H3K9me2; la cromatina negra és la més prevalent i conté els gens silenciats. Imatge modificada de (Beisel and Paro, 2011; Filion et al., 2010).

Recentment, l'estudi de la cromatina a escala global en nou tipus cel·lulars d'humans ha presentat una nova divisió, determinant sis classes de cromatina (Fig. i13): promotor (actiu, feble o a punt per ser activat), *enhancer* (fort o feble), barrera (*insulator*), transcrit (fort o feble), reprimit per PcG o en estat inactiu (heterocromàtic o repetitiu). Aquests patrons suggereixen que els estats de cromatina estan de forma inherent i són informatius de les propietats biològiques del genoma. Les anàlisis dels diferents tipus cel·lulars conclouen que les diferències en els estats de la cromatina estan relacionades amb funcions específiques de tipus cel·lular. Els promotors i *enhancers* específics de tipus cel·lular estan associats amb els motius d'enriquiment que depenen de l'expressió i funció dels gens confrontants. Tot i que les activitats dels *enhancers* i promotors varien de fort, feble o estar a punt per ser activat, aquests tendeixen a mantenir la identitat de la cromatina en diferents tipus cel·lulars senyalant la importància d'aquestes regions amb potencial regulador (Ernst et al., 2011).

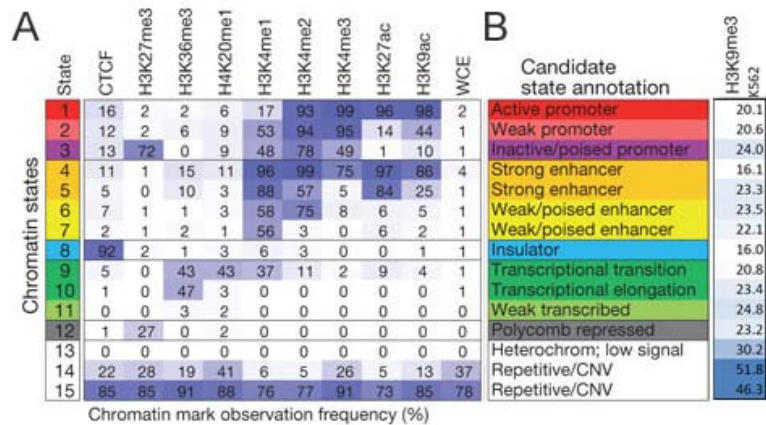


Figura i13. A. Els estats de la cromatina s'han determinat en els diferents tipus cel·lulars aplicant un model multivariant ocult de Markov. En la taula, cada entrada denota la freqüència amb la que una marca determinada es troba en una posició genòmica associada a un estat de la cromatina. **B.** Per cada estat, aquesta taula reporta el percentatge d'interval de 200pb que es troben en les regions significativament enriquides en H3K9me3 en comparació a l'extracte cel·lular total (p -value $< 10^{-4}$) (Ernst et al., 2011).

Altres estudis s'han centrat en la correlació dels patrons de modificació d'histones i l'estat d'expressió del gen. Una anàlisi global de 39 modificacions d'histones en cèl·lules CD4⁺T ha resultat en 13 patrons prevalents, que poden ser classificats en tres classes en funció dels estats d'expressió. La classe I són els gens poc expressats involucrats en desenvolupament i funcions que no es corresponen a les cèl·lules CD4⁺T. La major part dels patrons de cromatina pertanyents a aquest grup estan caracteritzats per la presència d'H3K27me3. La classe II es correlaciona amb gens d'expressió intermèdia i la classe III amb els gens altament expressats, involucrats en la fisiologia cel·lular i el metabolisme. A més, s'ha observat un mòdul comú de 17 modificacions (H2A.Z; acetilació en: H2B K5, K12, K20, K120; H3 K4, K9, K18, K27, K36; H4 K5, K8, K91; H3K4me1/2/3 i H3K9me1), present en molts dels gens amb expressió intermèdia i elevada, i afectant un 25% dels promotors (Wang et al., 2008).

3.3 Posicionament dels nucleosomes.

El posicionament dels nucleosomes al llarg del genoma no és quelcom a l'atzar, ans al contrari, és un factor determinant en la regulació transcripcional.

Els nucleosomes estan molt enriquits en els límits exó-intró, on es solapen amb la RNA polimerasa II (Chodavarapu et al., 2010) (Fig. i14A). Les regions amb depleció en nucleosomes són característiques dels promotors induïbles associats als gens expressats, permetent la unió dels activadors en les seves regions d'unió. A més, aquestes regions també s'han descrit en els elements de resposta a PcG del *locus* HOX durant la diferenciació, facilitant la unió de les proteïnes PcG, i en el promotor de MLH1 de les cèl·lules canceroses (Bai and Morozov, 2010).

Diferents complexos remodeladors són els responsables del posicionament dels nucleosomes (Fig. i14B) i, malgrat diferir en la composició de les subunitats, comparteixen dominis ATPasa similars. El posicionament dels nucleosomes influencia el patró de metilació del DNA, doncs les DNTMs s'uneixen preferentment al nucleosoma que empaqueta el DNA (Chodavarapu et al., 2010).

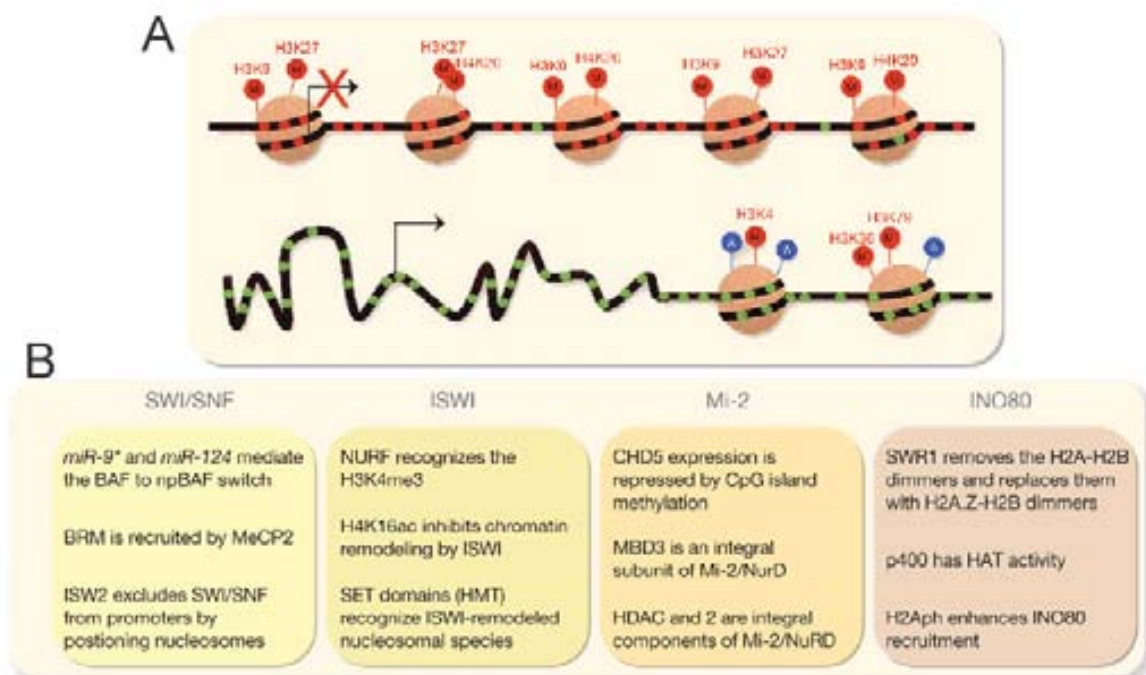


Figura i14. A. Gens transcripcionalment actius tenen una regió lliure de nucleosomes a 5' i 3' de la regió no transcrita, la qual és necessària per la unió de la maquinària transcripcional. L'activació gènica també requereix la pèrdua dels nucleosomes situats abans de l'inici de transcripció, mentre que el seu bloqueig permet la repressió transcripcional. **B.** Maquinària epigenètica implicada en el posicionament dels nucleosomes (Portela and Esteller, 2010).

La funció del nucleosoma està influenciada per les variants d'histones. Aquestes són diferents de les histones estàndards en la seva cues, l'estructura del domini i en alguns aminoàcids claus. Les variants es sintetitzen al llarg del cycle cel·lular i la seva deposició és independent a la replicació. Hi ha quatre variants universals: CENP-A, essencial per l'estructura del centròmer i la seva funció; H3.3, considerada com la marca d'activitat transcripcional, tot i que estudis recents han descrit un enriquiment d'aquesta variant en telòmers i centròmers d'SC i fibroblastes embrionaris de ratolí; H2A.Z, que juga diferents rols (activació i silenciament, recanvi dels nucleosomes i reparació del DNA, entre d'altres) que poden ser explicats pels efectes de les diferents modificacions post-traduccionals i les interaccions de factors remodeladors; i H2A.X, important per la reparació del DNA. Macro-H2A.1 i Macro-H2A.2 són histones específiques de llinatge cel·lular associades a la inactivació del cromosoma X. A més, les variants macroH2A estan implicades en la regulació dels programes d'expressió gènica durant la diferenciació cel·lular, mostrant col·localització amb les proteïnes del PRC2 en els gens de desenvolupament de les cèl·lules pluripotents ((Buschbeck et al., 2009) (Khorasanizadeh, 2004; Szenker et al., 2011; Talbert and Henikoff, 2010).

3.4 Epigenètica de l'RNA.

Els RNA no codificants (curts i llargs) participen en la regulació epigenètica en situacions normals i patològiques. Tot i que aquests mecanismes s'han descrit en altres organismes, com el llevat, la *Drosophila* i la *Arabidopsis thaliana*, molt d'esforç s'està emprant per tal d'elucidar la seva funció en mamífers.

L'establiment de la heterocromatina mitjançant l'RNA d'interferència s'ha descrit en llevat, relacionant la pèrdua de Dicer amb la disminució d'H3K9me3 i defectes en la segregació de la cromatina (Djupedal and Ekwall, 2009). D'altra banda, els micro RNAs estan involucrats en la hipermetilació aberrant del DNA (Lujambio et al., 2007). La implicació dels RNAs no codificants llargs en dirigir les proteïnes PcG s'ha descrit en diferents processos humans com la inactivació del cromosoma X (Zhao et al., 2008) i la regulació de l'*imprinting* (Pandey et al., 2008). Els RNAs no codificants curts derivats de les regions d'inici de transcripció dels gens amb dominis bivalents han estat trobats en CD4⁺T i SC embrionàries de ratolí, suggerint que els RNAs no codificants exerceixen la seva activitat repressora en presència d'H3K4me3 dirigint les proteïnes PcG en *cis* (Kanhere, 2010). A més, HOTAIR, un RNA no codificant intergènic llarg expressat en el *locus* HOXC, interacciona amb PRC2 i LSD1 i la seva sobreexpressió indueix la deslocalització del PRC2 en cèl·lules de càncer de mama (Rinn, 2007). Aquests només són alguns exemples de la participació dels RNAs en el silenciament epigenètic, però a més s'ha observat la seva implicació en la propagació de la cromatina silenciada durant la replicació i la mitosi (Beisel and Paro, 2011).

3.5 Organització nuclear.

L'organització espacial del genoma en el nucli no és atzarosa i està condicionada per les funcions nuclears tals com la replicació del DNA, la reparació, la transcripció i l'*splicing*.

Amb l'excepció de la làmina nuclear, no hi ha membranes que envoltin els diferents subcompartiments del nucli, com són: el nuclèol, que conté els RNAs ribosomals i els dominis associats al nuclèol (repeticions de satèl·lits centromèriques i grups de gens silenciats específicament); cossos enriquits en proteïnes promieloïtiques de leucèmia que són proteïnes RING-Finger; cossos Cajal, que estan involucrats amb el processament d'RNA; i clapes nuclears, que contenen factors d'*splicing* i ribonucleoproteïnes nuclears petites (Lanctot et al., 2007).

En la interfase nuclear, els cromosomes s'organitzen en diferents territoris que presenten diferent posició radial d'acord a la grandària del cromosoma, la densitat gènica i la morfologia (Fig. i15) (Nunez et al., 2009). El compartiment de la intercromatina és l'espai creat entre territoris. Aquest està enriquit en cossos nuclears involucrats en la transcripció i l'*splicing*, correlacionant els gens transcripcionalment actius amb la seva posició en la perifèria dels territoris cromosòmics (Cremer and Cremer, 2001). Tot i això, el model de xarxa sustenta que no hi ha regions lliures de cromatina entre territoris de cromosomes, mostrant elevada mescla de cromosomes i la presència de factors de transcripció en aquestes regions de fusió (Branco and Pombo, 2006). Les factories de transcripció són compartiments nuclears que contenen elevades concentracions locals d'RNA polimerasa II fosforil·lada que promou l'agrupament de gens per ser més eficient en la transcripció gènica (Osborne et al., 2004). A més, per tal de facilitar la regulació, el genoma humà està organitzat en regions altament actives (RIDGEs) que corresponen als gens *housekeepings*, i que estan separats per regions amples de baixa activitat i poca densitat gènica (Kosak and Groudine, 2004).

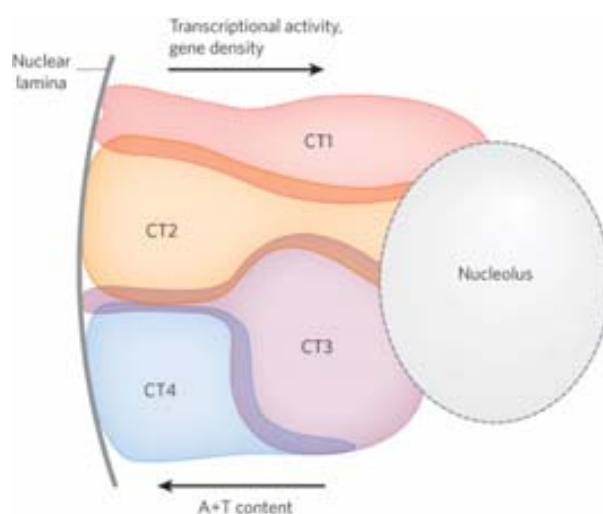


Figura i15. Organització radial dels territoris dels cromosomes en el nucli en funció de la densitat gènica i el contingut A+T. Els territoris dels cromosomes s'han representat seguint el model intercromosòmic en xarxa. El nuclèol apareix com un exemple de compartiment subnuclear que pot proveir oportunitats addicionals a la interacció cromosòmica (Gondor and Ohlsson, 2009).

Les interaccions en el nucli es poden classificar en funció de la parella d'elements implicats. La cromatina pot interaccionar amb components nuclears, com el nuclèol, la membrana de la làmina i els porus nuclear. Els dominis associats a la làmina han estat descrits en humà i ratolí i s'associen a regions de baixa densitat gènica, gens silenciats transcripcionalment, de replicació tardana i regions riques en H3K9me2. Tot i això, la recol·locació del cromosoma en la làmina nuclear influencia l'expressió d'alguns gens però no tots. Les interaccions de la cromatina amb el complexos de porus nuclears tendeixen a associar-se amb gens transcrits a nivells moderats. Així doncs, la perifèria nuclear és l'encarregada de modular l'expressió de determinats gens tant en condicions fisiològiques (desenvolupament i diferenciació) com en patològiques (Finlan et al., 2008; van Steensel and Dekker, 2010). Les interaccions de la cromatina poden implicar la formació de *loops* (interaccions promotor-*enhancer* i interaccions de gran abast en *cis*) o ponts de cromatina (interaccions en *trans*). Les interaccions gen-gen estan governades majoritàriament per les característiques de la cromatina adjacent, tal i com succeeix en el *locus* de la β -Globina que en fetge fetal està expressada i interacciona amb altres gens actius, mentre que està silenciada en cervell fet que promou el contacte amb *loci* silenciats (Simonis et al., 2006). Per tal de mantenir la correcta interacció de la cromatina, CTCF desenvolupa un paper molt important com a mediador dels centres de cromatina activa (*hubs*) del *locus* de la β -Globina i de la interacció amb factors de transcripció i proteïnes estructurals (interacció de la cohesina, per exemple) (Nunez et al., 2009; Splinter et al., 2006). Les proteïnes PcG també participen en els contactes de gran abast, com són el silenciament de GATA4 mediat per EZH2 en el carcinoma embrionari no diferenciat Tera-2 (Tiwari et al., 2008).

La tècnica FISH i els mètodes basats en el 3C donen suport a la teoria que aquestes interaccions no succeeixen únicament de forma estocàstica, sinó que moltes d'elles són funcionals. Tot i això, que aquestes interaccions puguin ser la causa o la conseqüència dels canvis a nivell transcripcional, roman una incògnita. Una altra pregunta oberta és si la pertorbació en l'arquitectura cel·lular, com el posicionament erroni de complexos proteics en els tumors sòlids, leucèmies i limfomes, són l'origen o el resultat de la situació patològica.

4. Alteracions epigenètiques en càncer.

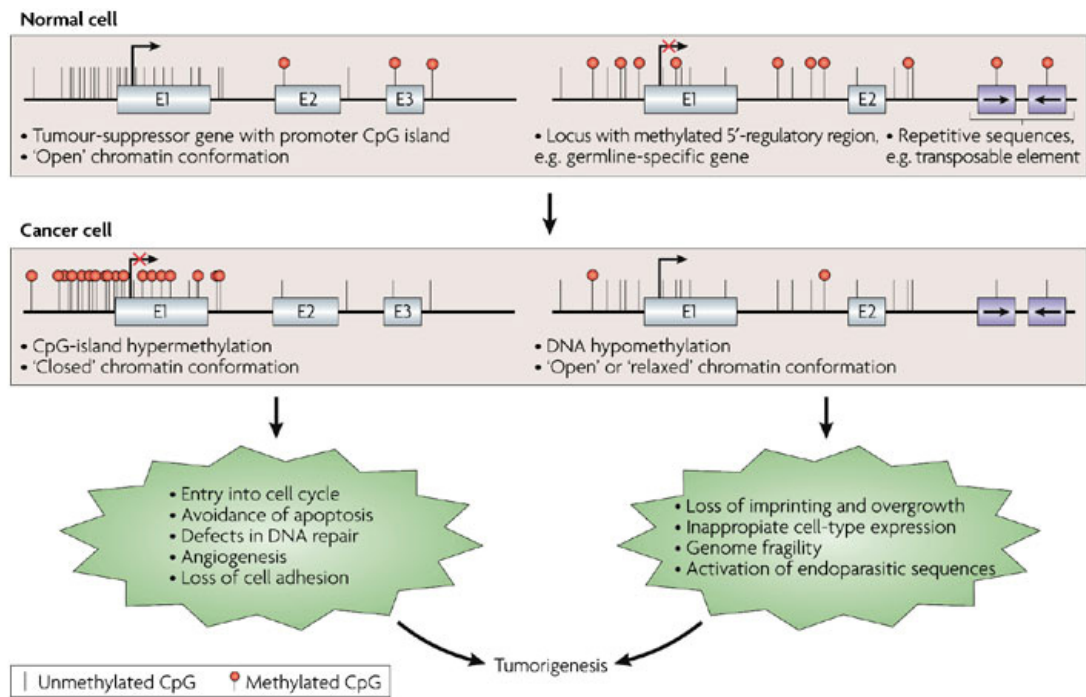
4.1 La metilació del DNA en el procés tumoral.

El procés tumoral és degut a la suma d'alteracions genètiques i epigenètiques en les vies que governen la homeòstasi en els organismes multicel·lulars, comperant ambdós mecanismes en la progressió tumoral. L'epigenoma del càncer es caracteritza per canvis en la metilació del DNA, patrons de modificacions d'histones i enzims modificadors de la cromatina, els quals tenen un rol important en la iniciació tumoral i la progressió.

Les alteracions en la metilació del DNA comporten mutacions puntuals, hipometilació, hipermetilació (Fig. i16) i pèrdua d'*imprinting* (LOI), en la que els gens amb *imprinting* expressen ambdós al·lels, com succeeix per IGF2 en els tumors de Wilms (Steenman et al., 1994).

La metilació aberrant i les mutacions genètiques cooperen en el desenvolupament del càncer. Per exemple, el silenciament per metilació dels gens reparadors MLH1 i MGMT, promou la inestabilitat de microsatèl·lits i l'augment de les mutacions G→A, respectivament (Jones and Baylin, 2002). A més, en càncer hereditari, en el que un gen supressor de tumor té un al·lel mutat en la línia germinal, el segon *hit* que silencia l'al·lel normal pot ser la hipermetilació de la regió promotora (Jones, 2007).

Les cèl·lules canceroses es caracteritzen per una hipometilació global, que també està associada a l'activació d'oncògens, com per exemple H-ras i K-ras en tumors primaris (Feinberg and Vogelstein, 1983) i BCL-2 en leucèmia limfocítica crònica (Hanada et al., 1993). Els treballs de Jaenisch i col·laboradors han aportat coneixement sobre les implicacions de la hipometilació global, treballant amb ratolins deficientes en DNMT1, observant que aquests es caracteritzen per una elevada inestabilitat cromosòmica (Gaudet et al., 2003), associada a la reactivació d'elements retrovirals endògens i a la seva translocació (Howard et al., 2008). Així doncs, la hipometilació global s'ha relacionat amb una pèrdua de metilació de les seqüències repetitives (Weisenberger et al., 2005), fet que ha promogut l'estudi dels patrons de metilació d'aquests elements (Rodriguez et al., 2008) i la seva implicació funcional. D'altra banda, estudis en els microadenomes i pòlips macroscòpics de ratolins *Apc^{mini+}* suggereixen que la hipometilació del DNA té un rol dual: suprimint la tumorigènesi en estadis tardans, però promovent les lesions inicials a còlon degut la pèrdua d'heterozigositat (LOH) (Yamada et al., 2005). Estudis recents (Berman et al., 2012; Hansen et al., 2011), mostren que les cèl·lules canceroses de CRC es caracteritzen per la presència de dominis d'hipometilació que afecten la meitat del seu genoma, sent part d'ells coincidents amb la unió a la làmina nuclear, relacionant així els canvis de metilació amb l'alteració de l'organització tridimensional en el nucli. Aquests estudis també han descrit la presència de dominis d'hipermetilació del DNA.



Nature Reviews | Genetics

Figura i16. Alteracions de la metilació del DNA en càncer (Esteller, 2007).

El silenciament gènic mitjançant la hipermetilació del DNA afecta gran majoria de les vies cel·lulars durant el procés tumoral. Per exemple, s'ha observat la hipermetilació de gens *gatekeepers* (p16, SFRPs, GATA-4, GATA-5 i APC) en estadis pre-invasius de CRC, suggerint la necessitat d'una modulació epigenètica d'aquests gens en cèl·lules sanes altament proliferants, com les SC adultes (Portela and Esteller, 2010).

Estudis a escala global han permès correlacionar que els gens marcats en SC embrionàries i teixit normal amb H3K27me3 i proteïnes PcG tendeixen a estar hipermetilats en càncer (Schlesinger et al., 2007). Profunditzant en aquest concepte, s'ha observat que la marca H3K27me3 en SC embrionàries es correlaciona amb la hipermetilació del DNA en diferents tipus tumorals, mentre que els gens amb H3K27me3 en còlon tendeixen a estar hipermetilats específicament en CRC (Rada-Iglesias et al., 2009). De forma similar s'ha descrit que els gens implicats en el desenvolupament que presenten dominis bivalents en SC embrionàries, tenen H3K9me2/3 en cèl·lules embrionàries canceroses i estan hipermetilats a nivell de DNA en HCT116, observant, a més, un augment d'H3K9me2 en les cèl·lules canceroses adultes (Ohm et al., 2007).

Estudis recents del metiloma cel·lular han demostrat que la major part del canvis de metilació en càncer succeeixen en les CpGi *shores*, de forma similar al patró descrit en la diferenciació del teixit. Això és consistent amb el model cancerós de progenitor epigenètic, que defensa que les alteracions epigenètiques que afecten la diferenciació específica de teixit són el mecanisme epigenètic predominant que causa el càncer. Les regions diferencialment metilades en càncer també estan relacionades amb gens associats a la pluripotència (Irizarry et al., 2009).

4.2 Alteracions en les proteïnes de la cromatina.

Les modificacions aberrants de les histones i la deregulació dels enzims associats a la cromatina també són responsables de l'alteració dels programes d'expressió gènica i la integritat del genoma. A continuació es presenten algunes evidències que donen suport a aquesta afirmació, com per exemple el fet que els ratolins deficientes en SUV39 (metiltransferassa d'H3K9) presenten nivells baixos d'heterocromatina que afavoreixen la inestabilitat genòmica (Peters et al., 2001).

A més, les cèl·lules canceroses tenen una reducció de la monoacetilació d'H4K16, la qual és conseqüència de la sobreexpressió o mutació d'HDACs, per exemple en les Sirtuïnes (Vaquero et al., 2007), fet que afecta la interacció de DNMT1 i, per tant, el patró de metilació del DNA (Espada et al., 2007). La desregulació de la H3K27me3 és també un factor característic del procés tumoral, observant la sobreexpressió d'EZH2 en càncer sòlids i la mutació d'UTX (demetilassa d'H3K27me3) en una varietat de tumors; mentre que patologies mieloides es caracteritzen per la inactivació d'EZH2 (Bannister and Kouzarides, 2011).

El sistema PcG-TrxG regulador de la memòria cel·lular es veu alterat en el procés tumoral, afectant els programes transcripcionals involucrats en senescència, cicle cel·lular, apoptosi i estabilitat genòmica. Per exemple, BMI està sobreexpressat en molts càncers, permetent evitar la senescència i l'apoptosi mitjançant el silenciament del *locus* CDKN2A/B, que codifica per tres gens supressors de tumors (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p14^{ARF}). PRC1 i PRC2 estan localitzats en aquest mateix *locus* i recluten HDACs i DNMTs per tal de reprimir la regió. Contràriament, el complex SWI-SNF pot esborrar la repressió establerta per PcG: desplaçant el complex PRC i DNMT3B i reclutant el complex MLL, fent que les marques d'histona repressives siguin reemplaçades per modificacions actives i promovent la desmetilació del DNA. La pèrdua de les subunitats que formen el complex remodelador de la cromatina SWI-SNF, com BRM, BRG1 i SNF5, ha estat vinculada a processos tumorals. En leucèmia, les fusions d'MLL són la lesió genètica més freqüent i la seva activitat oncogènica és deguda al guany funcional. MLL s'expressa de forma dependent al cicle cel·lular, però les fusions d'MLL són insensibles a la degradació durant el cicle cel·lular, resultant en l'expressió aberrant de programes específics del desenvolupament. A més, les fusions d'MLL recluten diferents proteïnes que faciliten la malignitat (Mills, 2010).

4.3 Silenciament Epigenètic de Gran Abast.

La identificació d'hipermetilació en CpGi discretes associada al silenciament gènic en càncer, ha contribuït a la comprensió del procés tumoral i al descobriment de nous biomarcadors que permeten la detecció del càncer i la seva prognosi. Tot i això, les alteracions epigenètiques en càncer no es restringeixen a CpGi, podent afectar múltiples CpGi i gens veïns. Aquest fenomen és conegut com el Silenciament Epigenètic de Gran Abast (*Long Range Epigenetic Silencing, LRES*) i va ser descrit primerament en CRC com un procés d'heterocromatització que afectava a la regió 2q14.2 de 4Mb i rica en gens (Frigola et al., 2006). Aquesta regió pot dividir-se en diferents suburbis en funció de la presència o absència d'hipermetilació de les CpGi, però tota la regió presenta una infraexpressió gènica i un enriquiment en H3K9me2 en cèl·lules canceroses. Un fenomen similar s'ha descrit en CRC en les regió cromosòmiques: 3q22.2 (Hitchins et al., 2007), 5q35.2 (Rodriguez et al., 2008) i la família de gens Ikaros (Javierre et al., 2011). A més, la hipermetilació de gens localitzats en regions regulades per LRES s'ha associat a un pitjor pronòstic dels pacients amb CRC i s'ha proposat com un factor diagnòstic (Mayor et al., 2009). També s'ha observat el LRES en càncer de mama (Novak et al., 2008), de pròstata (Coolen et al., 2010) i gàstric (Park et al., 2011).

L'anàlisi a nivell global en càncer de pròstata ha detectat 47 regions regulades per LRES, que per norma abasten 2Mb i contenen 12 gens, entre els quals hi ha una elevada prevalença en gens supressors de tumors i miRNAs. El LRES coincideix amb regions LOH descrites en càncer de pròstata, fet que no s'ha observat en la regió 2q14.2 en CRC. La pèrdua d'acetilació de la H3K9 és un factor característic d'aquestes regions i, tal i com s'ha observat en CRC, hi ha subdominis amb diferents perfils de modificacions d'histones i patrons de metilació del DNA (Fig. i17) (Coolen et al., 2010).

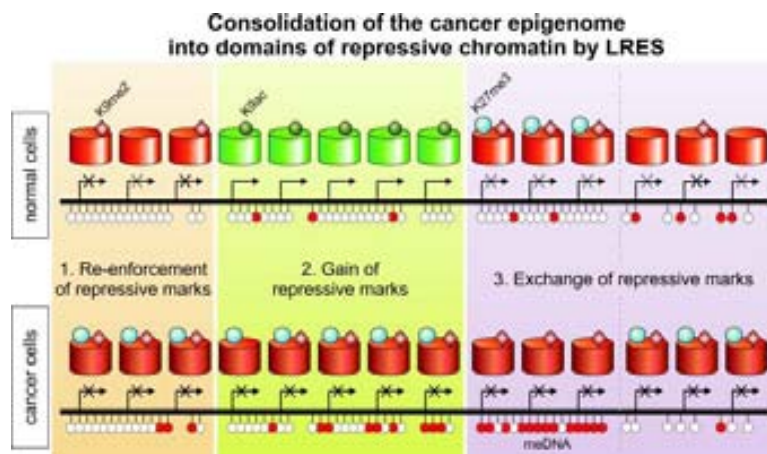


Figura i17. Dominis en les regions del LRES: 1. Es reforcen les marques repressives presentant un guany en H3K27me3 i H3K9me2 i la hipermetilació del DNA. 2 Un guany en la H3K27me3 i H3K9me2 en regions normals hiperacetilades 3. En gens amb la CpGi promotora s'observa un intercanvi de marques repressives involucrant la pèrdua de H3K27me3 i el guany de la metilació del DNA, mentre que en gens sense CpGi promotora hi ha un enriquiment en H3K27me3 i H3K9me2 (Coolen et al., 2010).

5. Epigènica en la diferenciació.

Les vies de senyalització implicades en el desenvolupament sovint es troben reactivades de forma inadequada en les cèl·lules canceroses, suggerint que les cèl·lules encarregades de propagar el tumor governen les vies cel·lulars que controlen el comportament de les SC normals. Així doncs, l'estudi de propietats epigenètiques en les SC embrionàries i el procés de diferenciació cel·lular pot aportar noves dades per entendre millor la progressió de cèl·lules normals a estats patològics.

El patró de metilació d'algunes CpGi és suficient per tal de diferenciar les SC embrionàries humanes, les SC adultes, les cèl·lules diferenciades i les poblacions tumorals (Bibikova et al., 2006).

La seqüència nucleotídica del promotor i la funció gènica són els majors predictors dels estats de metilació del DNA durant el desenvolupament i la diferenciació cel·lular (Fig. i18): els promotors amb poques CpG (LCP) s'hipermetilen en cèl·lules somàtiques, el que no exclou la seva activitat; els promotors amb nivells intermedis de CpG (ICP) són també propensos a la metilació en cèl·lules somàtiques; i els promotors amb moltes CpG (HCP), estan majoritàriament desmetilats fins i tot essent inactius (Weber et al., 2007).

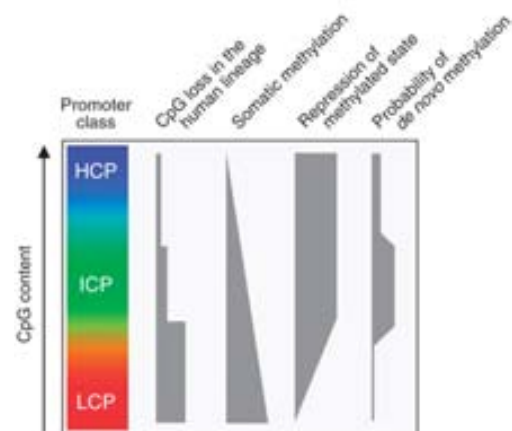


Figura i18. Classificació de les CpGi segons les seves propietats (Weber et al., 2007).

En el treball realitzat per Schubeler i col·laboradors (Mohn et al., 2008), els autors mantenen que en el 99% de les SC embrionàries els HCPs i ICPs estan associats a H3K4me3, però el 22% d'aquests presenten dominis bivalents. Mentre que els gens univalents per H3K4me3 són *housekeepings*, els dominis bivalents són propis dels gens implicats desenvolupament. En les cèl·lules progenitores neuronals el 46% dels dominis bivalents es ressolen a H3K4me3, mentre que el 14% a H3K27me3. Pocs dominis bivalents presents encara en cèl·lules progenitores es ressolen en la diferenciació a neurones piramidals ((Mohn et al., 2008), Fig. i19), també observat en fibroblastes embrionàries murines (Mikkelsen et al., 2007). Tot i que aquests estudis mostren que les cèl·lules diferenciades mantenen la major part dels dominis bivalents de les cèl·lules progenitores adultes, en l'hematopoesi s'ha observat que els gens reguladors d'aquest procés ressolen els dominis bivalents descrits en les cèl·lules progenitores quan aquestes es diferencien a CD4⁺T, observant un enriquiment en H3K27me3 (Adli et al., 2010). Així doncs, la resolució dels dominis bivalents depèn de la funció específica del llinatge cel·lular i probablement és duta a terme per les desmetilases d'H3K4me3 i H3K27me3 (Surface et al.,

2010). Les SC embrionàries deficientes per EED mostren una expressió aberrant dels gens que presenten dominis bivalents, suggerint que PRC2 i H3K27me3 són essencials pel control de la cromatina permissiva (Collas, 2009). En SC embrionàries les proteïnes PcG ocupen de forma preferent promotors que presenten bivalència, i es poden discriminar dos tipus diferents: els dominis que presenten ambdós complexes (PRC1 i PRC2) retenen més eficientment la H3K27me3 durant la diferenciació i estan associats als gens implicats en la regulació del desenvolupament; mentre que dominis bivalents que només presenten PRC2 tenen propietats contraries (Ku et al., 2008). A més, la metilació del DNA pot estar involucrada en la resolució dels dominis bivalents, ja que en la diferenciació neuronal dos terços dels gens hipermetilats estan marcats amb H3K27me3 en SC embrionàries (Mohn et al., 2008) i els gens associats a HCP bivalents en aquestes cèl·lules són sis cops més propensos a estar hipermetilats en les cèl·lules diferenciades que els gens amb HCP univalents (Meissner et al., 2008).

D'altra banda, els gens amb LCPs estan silenciats en SC embrionàries i poden activar-se de forma selectiva. En SC embrionàries, cèl·lules progenitores i diferenciades les regions riques amb H3K4me3 i H3K36me es solapen amb regions reguladores, mentre que les que presenten H3K9me3 i H4K20me1 estan enriquides en satèl·lits telomèrics, repeticions terminals llargues i regions d'*imprinting* (Mikkelsen et al., 2007).

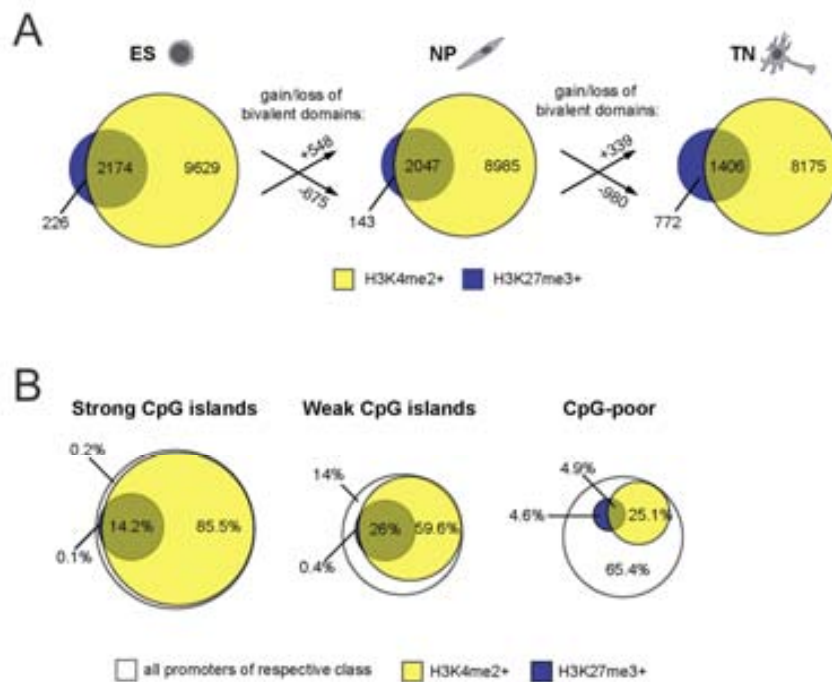


Figura i19. Dominis bivalents durant la diferenciació neuronal i la seva relació amb la seqüència promotora (A) Diagrames de Venn dels dominis bivalents durant la diferenciació cel·lular. (B) Distribució dels dominis bivalents relativa al contingut CpG de la regió promotora en SC mostrant que H3K27me3 és més freqüent en CpGi febles i forts, igual que la bivalència, ja que aquests promotors presenten H3K4me2 de forma majoritària. Les CpGi fortes són HCPs, les febles corresponen a ICPs i les CpG pobres a LCPs. NP = progenitor neuronal; TN = neurona diferenciada terminalment (Mohn et al., 2008).

La disminució de l'acetilació i la H3K4me3 durant la diferenciació d'SC embrionàries i el seu restabliment en les cèl·lules somàtiques promou la pluripotència (Surface 2010). Les regions de gran abast que contenen H3K9me2 (LOCKS) augmenten durant la diferenciació en nombre i grandària, afectant el 30% del genoma i essent dependents de l'activitat enzimàtica de G9a. Els LOCKs són específics de teixit i es correlacionen amb zones de baixa densitat gènica. A més, el 82% dels LOCKs presents en placenta es solapen amb la localització dels dominis associats a Lamina en fibroblast, suggerint un rol en la memòria epigenètica de l'organització nuclear en la diferenciació cel·lular. Cal mencionar que els LOCKs desapareixen en cèl·lules canceroses (Wen et al., 2009).

El fet que les proteïnes PcG es trobin associades a gens relacionats amb el desenvolupament i la senyalització gènica en SC embrionàries, suggereix una funció en la prevenció de la diferenciació i la repressió d'aquests gens. Els dominis H3K27me3 descrits en el *cluster* HOX en SC embrionàries es perden durant la diferenciació (Surface et al., 2010). A més, els defectes en PRC2 promouen la diferenciació durant la miogènesi i la formació de l'epidermis (Margueron and Reinberg, 2011).

Durant la diferenciació cel·lular, la pèrdua global de la metilació del DNA s'ha descrit comparant cèl·lules pluripotents, multipotents i mesenquimals de l'estroma (Aranda 2009). A més, resultats similars es van observar en les cèl·lules mieloides (Ji et al., 2010) i la diferenciació fetal del fetge *in vivo* (Brunner et al., 2009). Tot i això, en la reprogramació induïda a cèl·lules pluripotents s'observa una hipometilació (Doi et al., 2009) i en el desenvolupament neuronal, s'ha descrit un guany de metilació durant la pèrdua de pluripotència, involucrant les CpGi febles i els gens implicats en el procés (Mohn et al., 2008).

A més a més, els metilomes amb resolució de nucleòtid han permès identificar la metilació en dinucleòtids no CpG en SC embrionàries. La metilació de les citosines en CHG i CHH és exclusiva d'SC embrionàries i cèl·lules pluripotents induïdes, contribuint a un augment en el 25% de la metilació total. La metilació en dinucleòtids no CpG és absent en llocs d'unió a proteïnes i *enhancers*, però pot ser molt elevada en els cossos dels gens, involucrant-se en el processament de l'RNA, el seu *splicing*, els processos metabòlics i la correlació positiva de l'expressió gènica. El seu manteniment pot ser degut probablement a l'acció continua de les metiltransferases *de novo* (Lister et al., 2009).

Tal i com s'ha comentat anteriorment la metilació del DNA és considerada una marca de retenció de la memòria, fet que també s'ha observat en cèl·lules pluripotents induïdes, ja que retenen part de la metilació del DNA del seu teixit d'origen. Aquest fenomen no s'ha observat en les SC pluripotents obtingudes per transferència nuclear, però, de forma similar, la seva eficiència de reprogramació disminueix en funció de l'edat i l'estat de diferenciació del donador. Així doncs, la memòria epigenètica limita la capacitat de diferenciació de cèl·lules pluripotents induïdes, sense alterar la seva capacitat de pluripotència (Kim et al., 2010b).

6. Activines i Inhibines en càncer.

El gen $INH-\beta_B$ junt amb $INH-\beta_A$ i $INH-\alpha$ pertanyen a la família del TGF- β . Aquestes isoformes dimeritzen en les glicoproteïnes Activines i Inhibines (Fig. i20), les quals a més dels seva funció en reproducció, també estan involucrades en resposta immune, metabolisme de la glucosa, diferenciació d'SC i tumorigènesis.

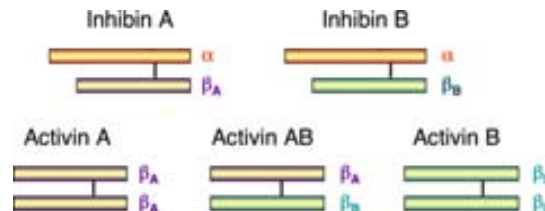


Figura i20. Les tres isoformes del gen INH poden dimeritzar en Inhibines ($\alpha\beta$ heterodímers) o Activines (β homodímers o heterodímers), les quals tenen funcions oposades. Altres isoformes com la β_C i β_D també estan descrites en mamífers.

Aquestes subunitats es sintetitzen com a molècules precursors que contenen un propèptid N-terminal i un domini madur C-terminal. Els dímers precursors són digerits per propeptidases i els dímers madurs es secreten des de la cèl·lula associats als seus propèptids N-terminal de forma no-covalent, fet que incrementa la seva vida mitja en circulació (Walton et al., 2011). Les Activines utilitzen el complex receptor serina/treonina quinasa tipus I/tipus II com a transductor del senyal (Fig. i21). La unió del lligant al receptor tipus II promou el reclutament del receptor tipus I i la seva fosforilació. Posteriorment, el receptor activat fosforil·la Smad2 i Smad3 que interacciona amb el mediador Smad4. Aquest complex Smad es transloca al nucli per iniciar la transducció del senyal, fet que requereix altres factors com CBP/p300. La senyalització de les Activines també es transdueix per mecanismes independents al complex Smad, com per exemple ERK i JNK. Ambdues vies estan associades a la regulació de la migració cel·lular (Kang and Shyr, 2011; Zhang et al., 2005).

Les Inhibines són antagonistes de les Activines. Les Inhibines interaccionen de forma eficient amb el Betaglicà, formant un complex ternari amb el receptor tipus II i evitant la seva interacció amb el receptor tipus I. La Folistatina s'uneix de forma irreversible a l'Activina, neutralitzant-la. Altres proteïnes citoplasmàtiques i de membrana (BAMBI i Cripto, per exemple) interfereixen en la senyalització de les Activines, afectant el reclutament dels receptors, l'estabilitat o l'activitat. A més, hi ha inhibidors Smads (Smad 7) i algunes modificacions que poden interferir en la funció dels Smads. La regulació negativa també pot succeir en els gens implicats, modificant el seu estat transcripcional (Choi and Han, 2011).

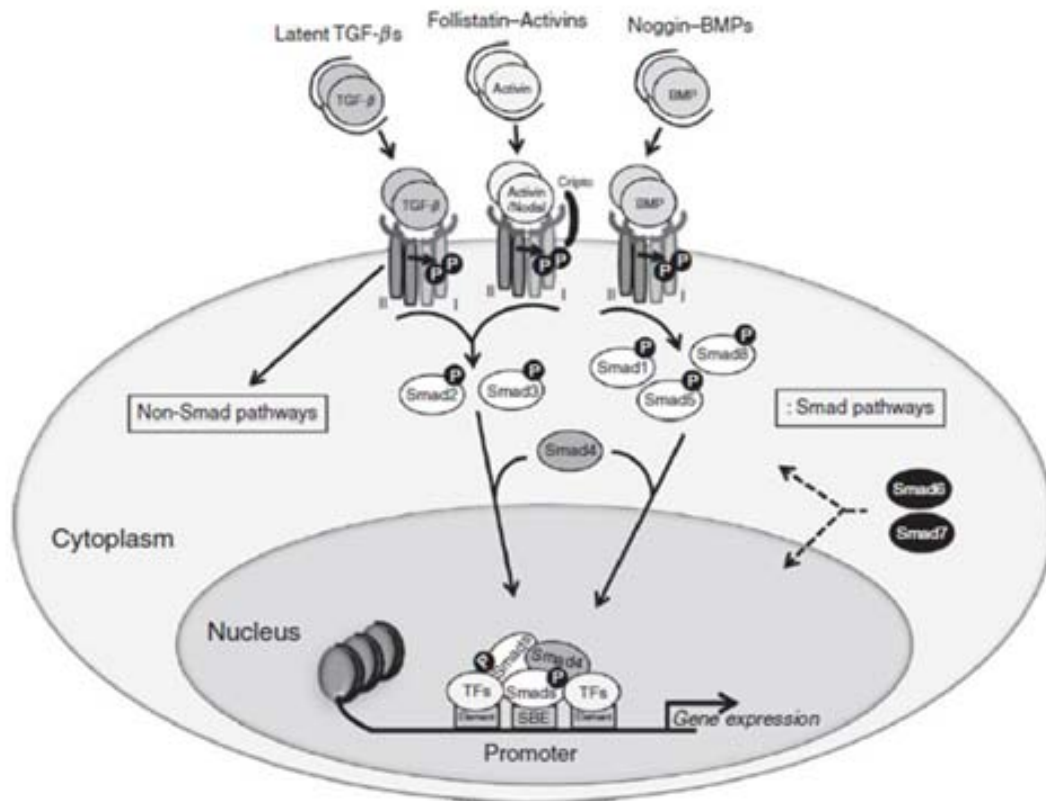


Figura i21. Model per la senyalització de les vies TGF- β , Activina/Nodal i BMP. Activina i Nodal utilitzen el mateix complex receptor heterotetramèric, però Nodal requereix del cofactor Cripto. Els receptors tipus II poden ser ACVR2a o ACVR2b. Hi ha set receptors tipus I descrits en mamífers. ALK4 (ACVR1b) i ALK7 (ACVR1c) estan involucrats en l'expressió dependent de teixit i l'estat de desenvolupament i només s'activen per Activina B i Activina AB. Smad 6 i 7 tenen una funció inhibidora. La via de senyalització de les Activines és encara poc coneguda (Watanabe, 2011).

L'Activina A s'ha associat a diferents situacions carcinogèniques: elevada activitat en càncer de pàncrees, pròstata i ovari (Shimizu et al., 2007); correlació amb estadi IV de CRC (Takeno et al., 2008); nivells elevats en sèrum de càncer endometrial, cervical, de mama i hepatocel·lular (Lascorz et al., 2010; Takeno et al., 2008); i desmetilació en càncer d'esòfag, promovent proliferació cel·lular (Seder et al., 2009). L'Activina A també s'ha associat al comportament metastàtic (Kim et al., 2010a) i promou el creixement en cèl·lules NIH-3T3, càncer d'ovari i cèl·lules progenitores eritropoètiques. Tot i això, l'addició d'Activina A promou la inhibició del creixement en línies cel·lulars de càncer mamari i de pròstata; cèl·lules endotelials, hematopoètiques i de leucèmia mieloide (Chang et al., 2010; Wildi et al., 2001). $INH\beta_A$ estimula l'angiogènesi en la còrnia inflamada mitjançant l'increment del factor de creixement endotelial (Poulaki et al., 2004) i la seva relació amb la inflamació del teixit fibròtic, on hi ha producció de monòcits i macròfags (Ohga et al., 2000). A més, l'Activina A s'ha proposat com a inductor de vies de senyalització independents a Smad per tal de controlar la reorganització de l'Actina del citoesquelet i promoure la migració i el potencial invasiu de les cèl·lules epitelials durant la transició epiteli-mesènquima (Zhang et al., 2005).

INH- β_B induïx la migració epitelial i el desenvolupament mitjançant l'acció de MEKK1 i la quinasa terminal JUNH2. Aquest gen té una expressió basal en la pell adulta, mentre que una ferida augmenta la seva expressió en l'epiteli hiperproliferatiu pròxim al marge de la ferida. INH- β_B també s'expressa de forma elevada en les cèl·lules epitelials migratòries de la llengua, mostrant així una important funció en la reepitelització (Deng et al., 2006). Els ratolins deficientes en aquest gen presenten un desenvolupament mamari anormal amb una elongació ductal aberrant i un retard en la morfogènesis alveolar (Burdette et al., 2005). A més, l'Activina B realitza una funció en la inducció de la vascularització dels testicles (Yao et al., 2006), que és silenciada mitjançant Wnt4 i β -Catenina en cèl·lules germinals femenines (Liu et al., 2010). En càncer, l'Activina B ha estat proposada com un possible marcador de tumors granuloses d'ovari i carcinomes uterins no-endometrials (Mendivil et al., 2009). En carcinoma renal, la mutació en el gen VHL incrementa l'expressió de l'Activina B, fet que dificulta l'adhesió i promou la invasió. El gen humà INH- β_B està localitzat en una regió de 4Mb que es silencia mitjançant LRES en CRC (Frigola et al., 2006). La CpGi promotora del gen no està metilada en adenomes colorectals, però està hipermetilada en un 25% del carcinomes colorectals. Els tumors que presenten la CpGi metilada tenen un índex de supervivència menor (Fig. i22) (Mayor et al., 2009). A més, quan la línia coloretal HCT116 està en condicions d'hipòxia hi ha una reexpressió del gen INH- β_B (Wacker et al., 2009).

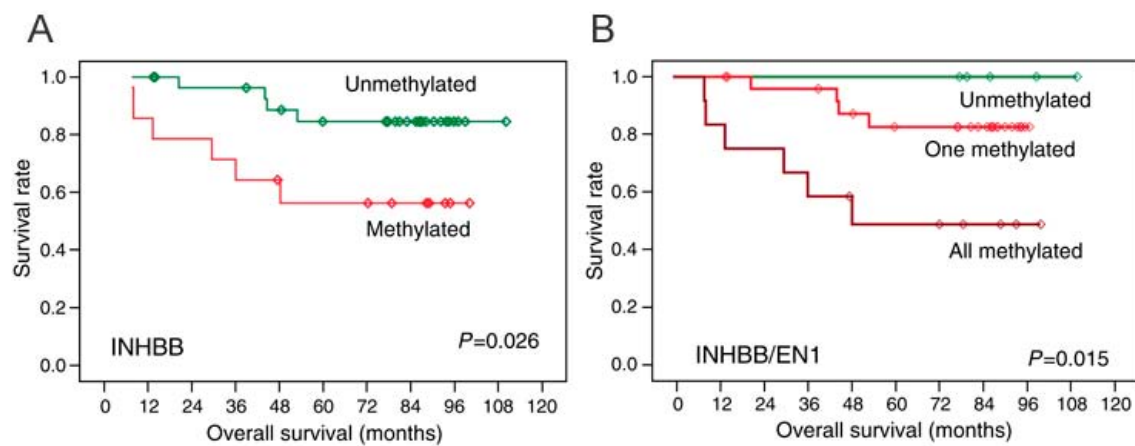


Figura i22. Un índex de supervivència inferior s'associa als pacients amb CRC que tenen la CpGi promotora d'INH- β_B hipermetilada (**A**), i als que tenen tant la CpGi promotora d'INH- β_B com d'EN1 hipermetilada (**B**) (Mayor et al., 2009)

Mutacions en els receptors tipus I s'han descrit en tumors pituïtaris i càncers pancreàtics, on també s'han detectat mutacions en els receptors tipus II (Jung et al., 2007). En càncers esporàdics amb inestabilitat de microsatèl·lits, la pèrdua d'activitat del receptor ACVR2 degut a mutacions en les seqüències repetitives s'ha associat a tumors més grans i menys diferenciats (Jung et al., 2006). En tumors colorectals estables també s'ha descrit la disrupció del receptor causada per LOH i el silenciament mitjançant metilació del DNA (Jung et al., 2009).



OBJECTIUS

Objectius

Aquest treball parteix de la premissa que els processos de diferenciació cel·lular i tumorigènesi impliquen vies de senyalització i programes relacionats i que l'estudi dels canvis epigenètics subjacents a ambdós processos pot contribuir a un millor coneixement dels mecanismes i factors que determinen el destí i funcions cel·lulars. D'altra banda, estudis recents han demostrat que la regulació epigenètica pot tenir un abast estès i afectar regions que inclouen varis gens.

En aquets context es formulen tres objectius generals:

1. Determinar els canvis de metilació associats a la diferenciació de l'intestí prim i els estadis inicials de la carcinogènesi.
2. Estudiar la dinàmica del mecanisme de Silenciament Epigenètic de Gran Abast (LRES) en processos de diferenciació i càncer.
3. Elucidar les implicacions funcionals del silenciament de gens supressors de tumors localitzats en regions regulades mitjançant LRES en càncer colorectal.

El primer dels objectius pretén descriure quins canvis de metilació estan associats a la diferenciació cel·lular, ja que aquest procés sovint està alterat en cèl·lules canceroses. A més el fet d'estudiar els canvis que es produeixen en estadis primerencs pot aportar informació valuosa sobre els esdeveniments que es donen en la iniciació tumoral. Per tal de dur a terme aquest objectiu es va optar per utilitzar estratègies a escala genòmica:

- Estudiar els canvis de metilació durant la diferenciació d'intestí prim mitjançant AIMS-Seq
- Determinar el perfils de metilació del DNA i d'expressió gènica en adenomes de ratolins *Apc^{min/+}* mitjançant AIMS-Seq i *microarrays* d'expressió, respectivament.

En el segon objectiu es vol aportar més coneixement en la dinàmica del LRES, mecanisme descrit i caracteritzat per membres del grup en cèl·lules tumorals humanes. En aquest cas, l'estudi es va dur a terme en models humans *in vitro* alhora que s'utilitzà el ratolí com a model animal per tal d'estudiar les implicacions del LRES *in vivo*. Així doncs es va:

- Determinar el perfils de metilació del DNA i d'expressió gènica en el LRES durant la diferenciació tumoral *in vitro* de la línia cel·lular de càncer colorectal humana CaCo2.
- Determinar si el LRES també es produeix en cèl·lules canceroses de ratolí i comparar-ho amb el mateix procés en humans.
- Determinar els perfils d'expressió i epigenètics dels gens afectats per LRES en càncer colorectal durant el procés de diferenciació de l'intestí prim de ratolins sans.
- Caracteritzar el LRES en estadis inicials de la tumorigènesi, concretament en els adenomes de ratolins *Apc^{min/+}*.

Finalment, es va investigar el rol d'INH- β_B durant el procés tumoral, ja que és un gen localitzat dins una regió que experimenta LRES en càncer colorectal i la hipermetilació de la CpGi promotora està associada a una reducció en la supervivència. Per tal de dur a terme aquest objectiu es va:

- Analitzar els patrons d'expressió i metilació d'INH- β_B i gens relacionats en diferents mostres sanes i tumorals
- Estudiar les implicacions funcionals (proliferació, migració i invasió) del silenciament del gen *in vitro*.



MATERIALS I MÈTODES

1. Mostres emprades.

1.1 Mostres de ratolí.

Les mostres de teixit murí (resumides en la Taula M1) es van obtenir en col·laboració amb diferents grups: els ratolins C57BL/6J van ser subministrats per Marta Vives a l'Institut LIRAD de Badalona, Pura Muñoz a la UPF i Alberto Villanueva de l'ICO; les mostres dels ratolins *Apc^{min/+}* i les dels corresponents ratolins C57BL/6J van ser facilitades pel laboratori de l'Anna Bigas a l'IMIM (part d'elles conservades en OCT); i les diferents fraccions de l'intestí prim de ratolins C57BL/6J van ser proporcionades pel laboratori de l'Eduard Batlle a l'IRB (protocol descrit a continuació).

La línia cel·lular murina de càncer colorectal CT26 (Taula M2) es va obtenir de l'*American Type Culture Collection (ATCC)*. Aquesta línia cel·lular es va créixer en medi complet (descriu en la Taula M2) amb 5% de CO₂ i a 37°C, en absència d'antibiòtics i *Mycoplasma*. Les cèl·lules es mantingueren en densitats subconfluentes i baix nombre de divisions, essent tripsinitzades amb 0.05% Tripsina-0,2g/L EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) i diluïdes d'acord les recomanacions de l'ATCC. Per tal de sembrar un nombre determinat de cèl·lules, aquestes es contaren amb un hemocitòmetre, tenyint-les amb blau de tripà (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La visualització cel·lular es realitzà amb un microscòpic òptic estàndard Leica DMIC (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

1.1.1 Purificació de cèl·lules intestinals.

L'aïllament de cèl·lules intestinals es va dur a terme en el laboratori de l'Eduard Batlle, obtenint quatre poblacions intestinals de la cripta en funció dels nivells de la proteïna de superfície EphB2 (Fig. M1): cèl·lules progenitores (EphB2^{high}), cèl·lules en procés de diferenciació (EphB2^{medium} i EphB2^{low}) i cèl·lules diferenciades (EphB2^{negative}). El procediment està explicat en detall en (Merlos-Suarez et al., 2011). Aquest protocol es realitzà tres vegades, treballant amb varis ratolins C57BL/6J en cada experiment. Breument, les criptes es van obtenir mitjançant una sèrie de passos d'incubació-agitació en EDTA de l'intestí prim, en el que, prèviament, s'havien separat els *villi* raspant amb una ganiveta. Un cop les criptes es van disgregar enzimàticament i van ser filtrades, aquestes estaven apunt per ser separades mitjançant citometria de flux. Després de descartar les cèl·lules mortes (excloent la subpobació PI⁺) i aplicar una selecció positiva (EpCAM⁺) i negativa (CD45⁺, CD11b⁺ i CD31⁺, UEA1 Lectin⁺), es van seleccionar les diferents cèl·lules epitelials en funció dels nivells superficials d'EphB2.

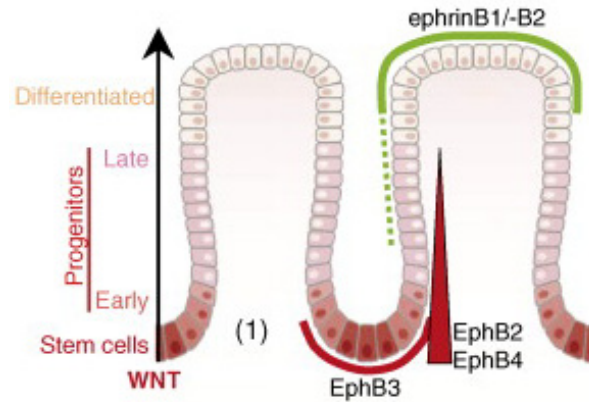


Figura M1. Localització dels components implicats en la via de senyalització Eph-Ephrin en l'intestí prim de ratolí (Merlos-Suarez and Batlle, 2008).

A més, les sèries d'incubació-agitació en EDTA també es van realitzar en la totalitat de l'intestí prim, per tal d'obtenir dues fraccions: una enriquida en cèl·lules del *villi* (primeres incubacions) i l'altre enriquida en criptes (últimes incubacions). Només quan es va voler comparar la fracció de cèl·lules del *villi* amb les diferents supoblacions de criptes obtingudes com s'ha descrit en el paràgraf anterior, es va fer una selecció per citometria de flux de les cèl·lules del *villi*, aplicant una selecció positiva per EpCAM⁺ i una negativa per CD45⁺, CD11b⁺ i CD31⁺.

Materials i mètodes

MOUSE ID	SAMPLE ID	DNA methylation		mRNA expression		Chromatin
		Specific region	Genome wide	Specific gene	Genome wide	Specific region
C57BL/6J IC1	Colon 1		AIMS-Seq 5		C3	
C57BL/6J L1	Colon 2	✓	AIMS-Seq 5	rt5	C2	
C57BL/6J L2	Lung 3			rt8		
	Brain 3			rt8		
	Heart 3			rt8		
	Liver 3			rt8		
	Spleen 3			rt8		
	Testis 3			rt8		
C57BL/6J L3	Soleus muscle 4			rt10		
	Gastrocnemius muscle 4			rt10		
	EDL muscle 4			rt10		
C57BL/6J L4	Colon 4			rt10		
C57BL/6J L5	Colon 5	✓				#T8
C57BL/6J L6	Colon 6	✓		rt17		#T10.1
C57BL/6J L7	Colon 7	✓		rt17		#T10.2
C57BL/6J L8	Colon 8	✓		rt17		#T10.3
C57BL/6J L9	Colon 9					#Test
C57BL/6J L9	Colon 10					#Test
C57BL/6J IM1	Small intestine 11	✓	AIMS-Seq 1 & 2			
APC ^{min/+} IM2	Adjacent 1.1	✓	AIMS-Seq 4			
	Adjacent 1.2	✓	AIMS-Seq 4			
	Adjacent 1.3	✓	AIMS-Seq 4			
	Adenoma 1.1	✓	AIMS-Seq 4 & 3			
	Adenoma 1.2	✓	AIMS-Seq 4 & 3			
	Adenoma 1.3	✓	AIMS-Seq 4 & 3			
	Adenoma 1.4	✓				
	Adenoma 1.5	✓				
APC ^{min/+} IM3	Adenoma 1.6	✓				
	Adjacent 2.1	✓	AIMS-Seq 4			
	Adjacent 2.2	✓	AIMS-Seq 4			
	Adenoma 2.1	✓	AIMS-Seq 4			
	Adenoma 2.2	✓	AIMS-Seq 4			
	Adenoma 2.3	✓	AIMS-Seq 4			
C57BL/6J IM4	Adenoma 2.4	✓				
	Adenoma 2.5	✓				
	Small intestine 12	✓		rt23; rt28		#T13
	Adjacent 3.1 (OCT)	✓				#T11
	Adjacent 3.2	✓		rt23		#T13
APC ^{min/+} IM5	Adenoma 3.1 (OCT)	✓				#T11
	Adenoma 3.2 (OCT)	✓		rt23		#T13
	Adenoma 3.3 (OCT)			rt28		
C57BL/6J IM6	Small intestine 13			rt_141210		#T14; #T15
	Colon 13			rt_141210	C1	#T14
APC ^{min/+} IM8	Adjacent 4.1			rt_141210		#T14
	Adjacent 4.2				Adj1	#T15
	Adjacent 4.3				Adj2	
	Adjacent 4.4			rt_141210		#T14
	Adjacent 4.5 (OCT)					#T16
	Adenoma 4.1			rt_141210		#T14
	Adenoma 4.2				Ade1	
	Adenoma 4.3				Ade2	
	Adenoma 4.4				Ade3	
	Adenoma 4.5			rt_141210		
Adenoma 4.6 (OCT)					#T15	
C57BL/6J U1	Small intestine 14					#T16
C57BL/6J U3	Small intestine 15					IP1
C57BL/6J U4	Small intestine 16					IP2
C57BL/6J U5	Whole villi – SIs 17					IP3
C57BL/6J IR1	Whole villi crypt – SIs 18	✓		rt13		reChIP
C57BL/6J IR2	Whole villi crypt – SIs 19					#VC2
C57BL/6J IR3	Villi and sorted crypt – SIs 20			rt19		#VC3
C57BL/6J IR4.1	Sorted villi – SIs 21		AIMS-Seq 2			
C57BL/6J IR4.2	Sorted crypt – SIs 22		AIMS-Seq 2			
C57BL/6J IR5	Sorted crypt – SIs 23		AIMS-Seq 3			
	CT26	✓	AIMS-Seq 5	rt15 [1] rt20 [2] rt140708 [3] rt141210 [4]	C1-3	#3 [1]; #T14 [7] #7 [2]; #9 [8] #6 [5]; #T16 [9] #8 [6];
	ESC CGR8		AIMS-Seq 3			

Taula M1. Resum de les mostres de ratolí. L'origen i tipus de ratolí està determinat en la columna "MOUSE ID". IC=ICO; L= LIRAD; IM=IMIM; U=UPF; IR=IRB. SIs = Small Intestines. ID = Identificador.

1.2 Mostres humanes.

Deu tumors colorectals humans i les respectives àrees de mucosa de còlon normal proporcionades per l'Hostpital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona, Barcelona, Espanya) van ser analitzats per determinar l'estat de metilació del DNA i l'expressió gènica dels gens relacionats amb la família de les Activines.

A més, un panell de línies cel·lulars de càncer colorectal humanes (Taula M2) es van emprar en diferents anàlisis. Excepte ESC CGR8 i DKO, que van ser proporcionades per Meritxell Carrió (CMRB) i Manel Esteller (IDIBELL), respectivament, totes les línies es van obtenir de l'ATCC i van ser cultivades tal i com s'ha descrit per les cèl·lules de ratolí.

CELL LINE	DESCRIPTION	MEDIUM
ESC CGR8	Mouse embryonic stem cell	
CT26	Mouse colon carcinoma	DMEM/100mM Pyr/200mM Gln/10% FBS
HCT116	Human colon carcinoma	DMEM/F12/100mM Pyr/200mM Gln/10% FBS
SW480	Human colon adenocarcinoma, Dukes' type B	DMEM/F12/100mM Pyr/200mM Gln/10% FBS
SKCO	Human colon adenocarcinoma	DMEM/F12/100mM Pyr/200mM Gln/10% FBS
CaCo-2	Human colon adenocarcinoma	DMEM/F12/100mM Pyr/200mM Gln/20% FBS
HT29	Hunman colon adenocarcinoma	
LoVo	Human colon adenocarcinoma, Dukes' type C, grade IV	
DLD1	Human colon adenocarcinoma, Dukes' type C	
DKO	HCT116 deficient in both DNA methyltransferases	

Taula M2. Llista de línies cel·lulars emprades. Les cèl·lules en que no s'especifica el medi utilitzat s'han processat a partir de pèl·lets cel·lulars recollits prèviament. DMEM= Dulbecco's Modified Eagle Medium; Pyr= Piruvat Sòdic; Gln= L-Glutamina; FBS= Serum Fetal Boví (tots de GIBCO® Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2. Cultius cel·lulars.

2.1 Diferenciació de les CaCo2.

La línia cel·lular d'adenocarcinoma colorectal CaCo2 adquireix propietats d'enteròcit quan es manté en cultiu en densitats confluents durant 20 dies (Pinto, 1983). La caracterització epigenètica d'aquest procés de diferenciació es va dur a terme analitzant les cèl·lules un cop van arribar a la confluència (CaCo2), després d'11 dies en confluència (població heterogènia, CaCo2 11dpc), mantingudes 20 i 40 dies en confluència (CaCo2 diferenciades CaCo2 20dpc, 40dpc). Les cèl·lules es cultivaren en medi complet normal (Taula M2) que es canviava cada 2-3 dies.

La diferenciació de les CaCo2 també es realitzà utilitzant els suports i els medis del *BIOCOAT® HTS Caco-2 Assay System* (BD Bioscience, Bedford, MA USA). Aquest sistema es basa en el fet que l'àcid butíric induïx diferenciació de les cèl·lules epitelials *in vitro* mitjançant la infraexpressió del gen C-MYC. Breuement, les cèl·lules es sembraren en els suports de col·lagen proporcionats pel *kit* i es van cultivar amb *Basal Seeding Medium* (complementat amb *MITO+™ Serum Extender Media* i FBS 10%) durant 24h. Després, les cèl·lules es diferenciaren incubant-les en el medi *Entero-STIM™* (complementat amb *MITO+™ Serum Extender Media*), i passades 48h es van recol·lectar tripsinant. Finalment, part de les cèl·lules diferenciades es cultivaren en condicions normals durant 18 dies. El disseny experimental està esquematitzat en al Figura M2.

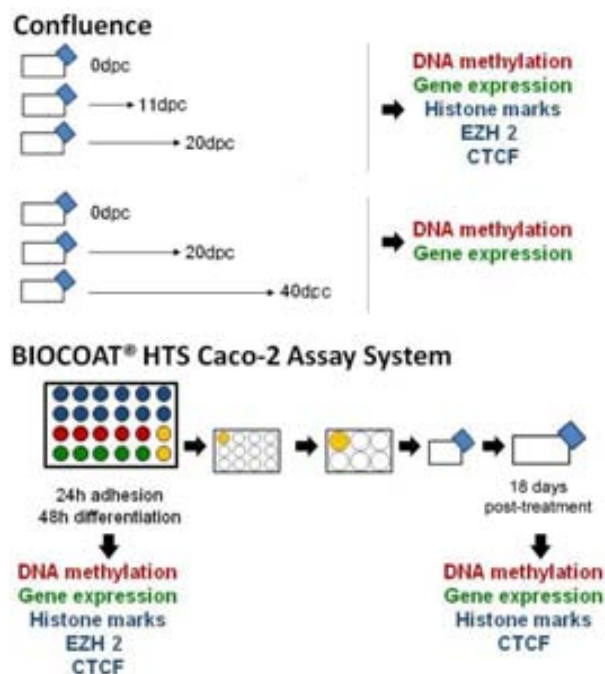


Figura M2. Disseny experimental de l'anàlisi de la diferenciació de CaCo2. En la diferenciació mitjançant butirat, els colors dels pous representen la proporció emprada per cada assaig. dpc = dies post-confluència; h = hores.

2.2 Silenciament gènic transitori.

Per tal d'estudiar les funcions de l'INH- β_B en càncer colorectal, aquest gen es va silenciar de forma transitòria mitjançant la incorporació de siRNA a les cèl·lules SW480. Es dissenyaren dos siRNA contra l'INH- β_B (Fig. M3 i Apèndix 1) i s'analitzà la seva funció supressora a diferents concentracions (10nM, 20nM i 50nM). El siRNA es transfectà amb Lipofectamina 2000 (concentració de treball de 2,5 μ g/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 24h després de la sembra (225.000 cèl·lules SW480 /9,4 cm²). Primer es va diluir la lipofectamina i el siRNA per separat en OPTI-MEM. Després d'una incubació de 10 minuts, ambdues dilucions es van mesclar (1:1) i incubar durant 20 minuts. Llavors, la mescla es va afegir a les cèl·lules amb nou medi de cultiu (1:8). Tres controls negatius van ser necessaris: cèl·lules no transfectades, cèl·lules transfectades només amb lipofectamina i cèl·lules transfectades amb el siRNA UNIVERSAL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). El procés de silenciament es va avaluar a nivell d'mRNA i proteïna.

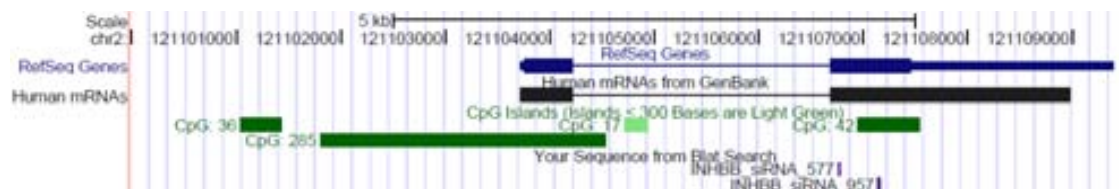


Figura M3. Diagrama de l'UCSC Genome Browser per: l'INH- β_B humà (en blau), el seu mRNA (en negre) i la CpGi associada (en verd). Els siRNA dissenyats contra l'INH- β_B (INHBB_siRNA_577 i INHBB_siRNA_957) estan representats com a *Your Sequence from Blat Search*.

2.3 Assaig d'activitat cel·lular.

L'activitat cel·lular de les SW480 amb l'INH- β_B silenciada de forma transitòria es va determinar mitjançant assajos d'MTT i XTT. Ambdós són assajos colorimètrics en els que es mesura l'activitat dels enzims que redueixen aquests components a formazà, característic pel seu color líl·lós intens. 24h després de sembrar les cèl·lules es van afegir els siRNAs (UNIVERSAL i INH- β_B) i l'assaig MTT o XTT es realitzà passades 24h, 48h i 72h.

En els assajos MTT, les cèl·lules es sembraren en triplicats en plaques de 96 pous (7.500 cèl·lules/pou). A cada punt d'anàlisi s'aspirà el medi i s'afegiren 40 μ l d'MTT 1mg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Després d'una incubació de 2h a 37°C, els cristalls de formazà es van resuspendre en 100 μ l de DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) i es llegí l'absorbància a 570nm i 690nm (lectura del soroll) utilitzant el lector de microplaques *SpectraMax 340 PC* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Els assajos d'XTT es van realitzar emprant el *Cell proliferation Kit II* (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). Es sembraren 1.500 cèl·lules/pou de placa de 96 i es treballà en

quintuplicats. A cada punt d'anàlisi es van afegir 50µl de la mescla de marcatge XTT i es mesurà l'absorbància (492nm i 690nm) després d'una incubació de 4h a 37°C

Estudis similars es van dur a terme neutralitzant l'Activina B secretada amb un anticòs (100-200ng d'anticòs Anti-Activin B/ml de medi de cultiu, Taula M7) i s'afegí proteïna recombinant al medi (5 i 10ng de subunitat β_B d'Activina B recombinant/ml de medi de cultiu, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.4 Assaig de migració.

Per tal de d'estudiar el rol de l'INH- β_B en la migració cel·lular, es van realitzar assajos de *wound healing* en cèl·lules SW480 amb l'INH- β_B silenciats de forma transitòria. SW480 transfectades amb el siRNA UNIVERSAL es van emprar com a control negatiu de l'experiment. Quan les cèl·lules estaven pròximes a la confluència, la monocapa cel·lular es va trencar fent una ratlla vertical en la placa amb una punta de pipeta i es canvià el medi. L'àrea oberta es va inspeccionar amb el microscopi al llarg del temps, observant la migració cel·lular. Les cèl·lules SW480 es van sembrar en plaques de 12 pous per duplicat (150.000 cèl·lules/pou), s'addicionaren els siRNAs (UNIVERSAL i INH- β_B) i 6 i 24h després de l'addició es va ratllar la placa. L'àrea oberta es fotografia a les 0h, 16h, 26h i 30h després de fer-la. Estudis similars es van dur a terme neutralitzant l'Activina B secretada amb l'anticòs i afegint proteïna recombinant al medi (detallat anteriorment).

2.5 Assaig d'invasió.

La capacitat d'invasió de les SW480 amb l'INH- β_B silenciats de forma transitòria es va testar emprant la *BD Biocoat Matrigel Invasion Chamber* de 8µm (BD Bioscience, Bedford, MA USA). La transfecció amb el siRNA UNIVERSAL es va utilitzar com a control negatiu de l'experiment. D'acord a les instruccions del fabricant, les cambres d'invasió s'hidrataven amb DMEM durant 2h a 37°C i 5% CO₂. Després, 150.000 cèl·lules SW480 privades de sèrum es van sembrar en el compartiment superior en medi sense sèrum i s'afegí medi complet en la cambra inferior, utilitzant el sèrum com a quimioattractant. Les cèl·lules van migrar durant 24h. Tot seguit, les cèl·lules no invasores es van descartar netejant amb un bastonet amb base de cotó humit i les cèl·lules que havien envaït al llarg del matrigel es van fixar i tenyir amb cristall de violeta 0,2% en una solució al 10% d'etanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). El recompte es realitzà treballant amb quatre camps del pou, mitjançant la visualització amb el microscopi (x10).

3. Anàlisi de metilació del DNA.

S'han emprat diferents mètodes per tal de determinar l'estat de metilació. La seqüenciació directe de l'amplificació del DNA convertit amb bisulfit es va realitzar per tal d'analitzar la metilació de regions específiques (Clark et al., 2006), mentre que una modificació de l'*Amplification of Intermethylated Sites* (AIMS (Frigola et al., 2002)), tècnica basada en enzims sensibles a la metilació, s'emprà en els estudis a escala genòmica.

3.1 Extracció del DNA.

El DNA genòmic s'obtingué per extracció convencional amb fenol-cloroform. Breument, la lisi cel·lular es realitzà mitjançant la incubació amb la solució SET (100mM Tris HCl pH 7.8, 1% SDS, 50mM EDTA pH8.0) i Proteinasa K (200ug/ml SET, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durant 16h a 37°C o 3h a 65°C. En les mostres de teixit una disrupció mecànica amb ganiveta va ser necessària abans d'iniciar la lisi. Després del tractament amb RNasa A i les extraccions amb les solucions de fenol i cloroform, el DNA es precipità amb etanol. Per tal de processar $1 \cdot 10^6$ de cèl·lules es va requerir 1ml de SET, mentre que $1 \cdot 10^5$ de cèl·lules es lisaren amb 500µl de SET, fent només un pas d'extracció fenol-cloroform i utilitzant glicogen (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) durant la precipitació. El DNA es resuspengué en aigua bidestil·lada. Després es quantificà utilitzant el NanoDrop (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i es va avaluar la seva qualitat mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa 1% i tinció amb bromur d'etidi.

3.2 Seqüenciació directa de bisulfit.

El bisulfit sòdic converteix les citosines no metilades en uracils, mantenint les citosines metilades intactes. En l'amplificació, la timina és incorporada reemplaçant l'uracil. La seqüenciació dels productes de PCR permet discriminar entre les citosines metilades i no metilades.

La conversió amb bisulfit es va realitzar partint de 250ng de DNA amb el *EZ DNA Methylation™ Kit* (ZymoResearch, Orange, CA, USA), d'acord a les instruccions del fabricant. El DNA convertit es va eluir en 50µl d'aigua bidestil·lada.

Es van amplificar regions genòmiques específiques mitjançant *Nested-PCR*. En la primera PCR es van emprar 2µl de DNA convertit i el producte d'aquesta amplificació es va utilitzar com a motlle (directe i diluït) en la segona PCR. Ambdues reaccions d'amplificació es van catalitzar amb la polimerasa Taq (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) en un volum final de 25µl, afegint MgCl₂ només en la primera PCR. Dues parelles de *primers* diferents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) van ser necessaris per analitzar cada regió (l'listat en l'Apèndix 1 i a

(Frigola et al., 2006)). El producte de la segona amplificació es purificà amb el *JETQUICK PCR Spin Kit* (Genomed, St. Louis, MO, USA) i es seqüencià amb el *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les seqüències es visualitzaren amb el *software* FinchTV.

3.3 AIMS-Seq.

La metilació a escala global es va analitzar durant la diferenciació de l'intestí prim i la progressió tumoral (mostres en Taula M5). Aquest estudi es dugué a terme acoblant l'*Amplification of InterMethylated Sites* (AIMS, (Frigola et al., 2002)) i la seqüenciació amb Solexa. L'AIMS es caracteritza per una sèrie de digestions amb enzims isosquizòmers sensibles i insensibles a metilació, seguides d'una lligació i PCR que amplifica part dels fragments metilats (PCR restringida). Els productes d'aquesta amplificació són visualitzats en un gel de seqüenciació desnaturalitzant de poliàcrilamida, on les bandes del patró observat corresponen a fragments de DNA flanquejats per dues dianes metilades que poden ser aïllades i caracteritzades. En l'AIMS-Seq la PCR no és restringida i el producte purificat es seqüencia mitjança Solexa.

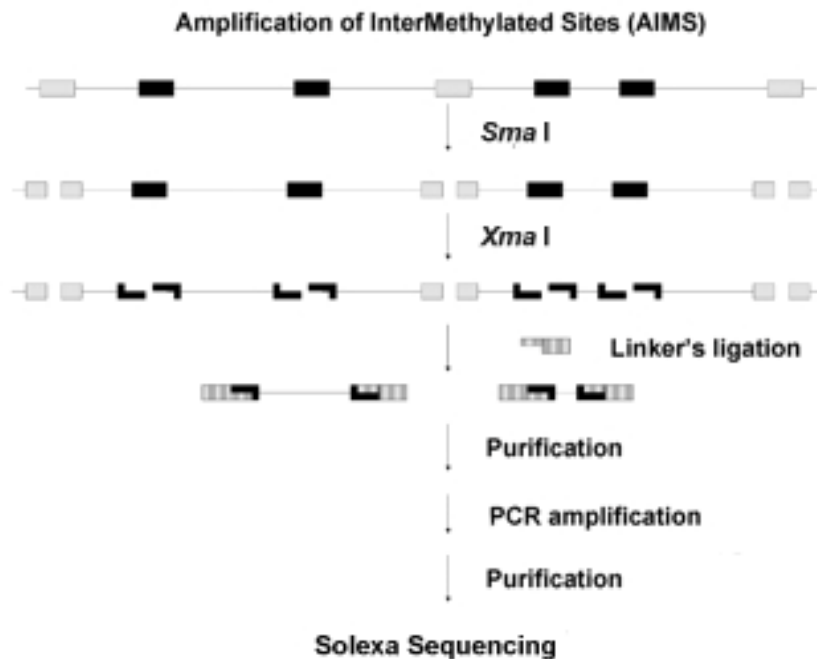


Figura M4. Diagrama esquemàtic de la tècnica AIMS-Seq (Modificat de (Frigola et al., 2002))

El protocol d'AIMS està detallat de forma extensiva en (Frigola et al., 2002; Jorda et al., 2009), i esquematitzat en la Figura M4. Breument, el DNA genòmic es digeri amb l'enzim sensible a metilació *Sma*I (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) durant 16h a 25°C, deixant extrems roms. Després, es va dur a terme una digestió (6h at 37°C) amb l'enzim sensible a metilació *Xma*I (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) generant extrems cohesius. Després de la lligació d'adaptadors específics per als extrems *Xma*I (dímers de MCA-Blue i Blue, seqüència en l'Apèndix 1) amb la T4 DNA ligasa (New England Biolabs, Boston, MA), els productes es purificaren amb l'*Illustra™ DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Els fragments flanquejats amb dianes *Xma*I metilades es van amplificar mitjançant PCR amb el *primer* Blue-diana (Apèndix 1), i el producte purificat amb *JETQUICK PCR Spin Kit* (Genomed, St. Louis, MO, USA) es va avaluar abans de ser seqüenciat amb la plataforma Illumina Solexa. L'avaluació es dugué a terme mitjançant una PCR restringida (emprant els *primers* Blue-CAAC and Blue-CGCG, seqüències en l'Apèndix 1) que va ser visualitzada en un gel de seqüenciació desnaturalitzant de poliacrilamida 6% (8M urea). Aquest gel va ser revelat tenyint amb plata: 20 minuts de fixació amb etanol 10%; rentats amb aigua; incubació amb àcid nítric 1% 3 minuts; rentats amb aigua; tinció amb nitrat de plata (2,02g/l) durant 20minuts; rentats amb aigua; revelat amb una solució freda de carbonat de sodi amb formaldehid (29,6 g/l- 0,025%); i fixació amb àcid acètic 7,5%.

Un cop confirmat que el producte d'AIMS presentava el patró de bandes correcte, va ser processat pel Servei de Seqüenciació del CGR. Aquests van fragmentar-ho amb el Covaris S2 (o el Bioruptor) per tal de fer la llibreria que després d'un pas de *clustering* es va seqüenciar amb l'Illumina GA2 (*reads* de 36nt). El mapatge dels *reads* i l'anàlisi estadístic es va realitzar emprant un conjunt d'eines bioinformàtiques estàndards i desenvolupades pels bioinformàtics del grup. Breument, un cop mapats, els *reads* es van filtrar en funció de la qualitat i s'alinearen respecte el genoma murí de referència UCSC/MM9 amb el programa Bowtie (V0.11.3). Les mostres es van normalitzar pel nombre total de *reads*, tenint en compte els mapats en amplicons inferiors o iguals a 2Kb, ja que el pas d'amplificació introdueix aquest límit a l'AIMS-Seq. Els amplicons diferencialment metilats entre dues mostres es van determinar treballant amb el paquet estadístic EdgeR, tenint en compte els amplicons amb un mínim de 5 *reads* en una de les dues mostres (*cut-off* empíric).

Es van validar alguns dels canvis de metilació detectats per AIMS-Seq mitjançant seqüenciació directa de bisulfit.

Experimental ID	Mouse ID	Tissue or Fraction ID	Comments
AIMS-Seq 1	C57BL/6J IM1	Total small intestine 11	
	<i>in vitro</i>	ESC CGR8	
AIMS-Seq 3	C57BL/6J pool IR5	EphB2 ^{high} (progenitor; SIs-23) EphB2 ^{negative} (differentiated; SIs-23)	Each sample in triplicates
	APC ^{min/+} IM2	Adenoma 1.1 Adenoma 1.2 Adenoma 1.3	
	C57BL/6J IM1	Total small intestine 11	
	APC ^{min/+} IM2	Pool of 3 tissues adjacents to adenomas (1.1, 1.2, 1.3) Pool of 3 adenomas (1.1, 1.2, 1.3)	
AIMS-Seq 4	APC ^{min/+} IM3	Pool of 2 tissues adjacents to adenomas (2.1, 2.2) Pool of 3 adenomas (2.1, 2.2, 2.3)	
	<i>in vitro</i>	CT26	
	C57BL/6J U3	Total small intestine 15	
	C57BL/6J IC1	Total colon 1	
AIMS-Seq 5	C57BL/6J L1	Total colon 2	
	C57BL/6J IM6	Total colon 7	
	<i>in vitro</i>	CT26	

Taula M5. Disseny experimental de l'AIMS-Seq. En gris s'indica l'AIMS-Seq en el que s'ha partit de 300ng de DNA, enlloc de la quantitat estàndard (1µg). IC=ICO; L= LIRAD; IM=IMIM; U=UPF; IR=IRB; SIs=Small Intestines; ID = Identificador.

4. Anàlisi d'expressió d'RNA.

Diferents metodologies es van emprar per obtenir l'RNA, a més de fer l'estudi d'expressió a nivell específic o a escala global.

4.1 Anàlisi d'expressió de gens específics.

L'RNA total es va obtenir utilitzant TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA., USA) d'acord a les instruccions del fabricant: homogeneïtzació emprant 1ml TRIzol/1-2·10⁶ de cèl·lules (disrupció mecànica amb una ganiveta va ser necessària en les mostres de teixit); separació amb cloroform (200µl/ml TRIzol); precipitació amb alcohol isopropílic (es va addicionar glicogen quan es treballava amb poc material de partida); rentat amb etanol 75%; i resuspensió de l'RNA amb aigua lliure d'RNases. Un tractament rutinari amb DNasa es va aplicar, utilitzant el *DNA-free Ambigene Kit* (50µl d'RNA a 200ng/µl va ser tractat amb 1µl d'rDNasal durant 30 minuts a 37°C).

L'RNA es quantificà amb el NanoDrop (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i la seva qualitat es va avaluar mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa 1% i tinció amb bromur d'etidi.

La reacció de retrotranscripció es va realitzar partint de 500ng d'RNA total i en un volum final de 25µl utilitzant la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), *random* hexàmers D(N)6 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) i *RNasin® Ribonuclease Inhibitor* (Promega, Madison, WI, USA). Es van incloure dos controls negatius: reacció sense RNA i sense enzim de retrotranscripció.

Els nivells d'expressió es van quantificar per PCR a temps real, emprant dues plataformes diferents. La major part dels gens s'analitzaren mitjançant LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) (*primers* llistats en Apèndix 1 i (Rodríguez et al., 2008)), mentre que els gens corresponents a la regió 2q14.2 humana es van estudiar treballant amb l'Applied 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (*primers* descrits en (Frigola et al., 2006)). En ambdues situacions, es va amplificar 1µl del producte de la retrotranscripció diluït 1/5, treballant amb un volum final de 10µl (excepte pel gen 18S, en que es va emprar una dilució 1/1.000). Cada mostra s'analitzà per triplicat. Sempre que fora possible, la parella de *primers* estaven localitzats en exons diferents per tal d'evitar l'amplificació de DNA genòmic residual. En la posta a punt dels *primers*, els productes amplificats es van confirmar mitjançant l'electroforesi en un gel d'agarosa i la seqüenciació directa emprant *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Un cop validat, la identitat del producte es determinava gràcies a la temperatura de fusió (*melting temperature*). Per tal d'analitzar l'expressió en diferents mostres es normalitzà per càrrega utilitzant els valors d'expressió de tres a sis gens *housekeeping* i el mètode $2^{-\Delta\Delta C_p}$ ($(\text{eficiència}_{\text{reacció}}^{\Delta C_{t_{\text{gene}}}})/(\text{eficiència}_{\text{reacció}}^{\Delta C_{t_{\text{housekeeping}}}})$).

4.2 Anàlisi d'expressió a escala global.

L'extracció d'RNA dels diferents teixits i cèl·lules de ratolí (mostres en Taula M6) es va dur a terme utilitzant diferents *kits* d'extracció en funció de la quantitat de material de partida: *RNeasy Mini Kit* (quantitats estàndards) o *RNeasy Micro Kit* (poc material). Es van seguir les instruccions del fabricant, incloent el pas de digestió amb DNasa. L'RNA es quantificà amb el NanoDrop (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i la seva qualitat es determinà amb el Bioanalyzer (Agilent).

El marcatge de l'RNA, l'hibridació en el *microarray* i el pre-processament de les dades van ser realitzats en la Unitat de Microarrays del CRG. L'RNA s'hibridà seguint el protocol d'un color en els *microarrays SurePrint G3 Mouse 8x60K Agilent*. L'anàlisi de les dades es va realitzar amb el *software* TMEV, aplicant el test estadístic Limma (anàlisi de dos classes) i considerant els canvis amb $FDR < 0.05$.

Array ID	Mouse ID	Tissue or Fraction ID
C1	C57BL/6J IM6	Total colon 13
C2	C57BL/6J L1	Total colon 2
C3	C57BL/6J IC1	Total colon 1
IP1	C57BL/6J U1	Total small intestine 14
IP2	C57BL/6J U3	Total small intestine 15
IP3	C57BL/6J U4	Total small intestine 16
Adj1		Tissue adjacent to adenoma 4.2
Adj2		Tissue adjacent to adenoma 4.3
Ade1	APC ^{min/+} IM8	Adenoma 4.2
Ade2		Adenoma 4.3
Ade3		Adenoma 4.4
CT1	<i>in vitro</i>	CT26
CT2	<i>in vitro</i>	CT26
CT3	<i>in vitro</i>	CT26

Taula M6. Mostres de ratolí analitzades mitjançant *microarrays* d'expressió IC=ICO; L= LIRAD; IM=IMIM; U=UPF; ID = Identificador.

5. Anàlisi d'expressió proteica.

La proteïna total s'extragué resuspentent el pèl·let cel·lular amb la solució RIPA (50mM Tris HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodi deoxicolat, 0.1% SDS) complementat amb *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 10µl per ml de RIPA, i incubant en gel 30 minuts. L'extracte proteic es va recuperar centrifugant 15 minuts a màxima velocitat i 4°C.

Per tal de detectar les Activines secretades, va ser necessari concentrar el medi de cultiu. Les cèl·lules creixeren en plaques de 15cm² amb medi complet. En arribar a densitats subconfluent es va canviar el medi, per un sense sèrum i s'incubaren durant 4h. Després, es recanvià el medi per 18ml de nou medi sense sèrum i s'incubaren durant 24h. El sobrenedant es recuperà (es descartaren les cèl·lules flotants per centrifugació) i es concentrà 90 cops amb els concentradors *Vivaspin 20* (Sartorius AG, Göttingen, Germany) centrifugant a 3.200g a 4°C durant 45 minuts.

La quantificació de les proteïnes es va dur a terme mitjançant el *Pierce® BCA Protein Assay* en plaques de 96 pous, amb 200µl de BCA fresc i 10µl de l'extracte proteic diluït en aigua bidestil·lada, seguint les instruccions del fabricant (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

El Western Blot es va realitzar tal i com s'ha descrit prèviament (Towbin et al., 1979). Breument, 30-50µg de proteïna total es va separar per electroforesis en un gel d' SDS-PAGE al 10% i es va transferir a una membrana *Immobilon-P PVDF* (Millipore, Billerica, MA, USA). Com a procediment estàndard el gel transferit es va tenyir amb Coomassie i la membrana amb Ponceau per tal d'avaluar la qualitat de l'electroforesis i la transferència. Les membranes es bloquejaren, per evitar interaccions inespecífiques, amb una solució salina de Tris amb 20% de Tween-20 (TBST) i 5% de llet i s'incubaren amb els anticossos primaris diluïts en la mateixa solució (Taula M7). Els anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa de rave es van diluir 1/1.000 en la solució de 5% de llet en TBS i s'hibridaren 1 hora i 30 minuts a temperatura ambient (Dako, Glostrup, Denmark). La detecció de la quimioluminescència es va realitzar utilitzant el *Pierce® Supersignal West Pico Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). En els Westerns Blot on s'analitzava extracte de proteïna total es va emprar la β-actin com a control de càrrega, mentre que en l'anàlisi de proteïnes secretades es va utilitzar el gel de poliacrilamida tenyit amb Coomassie.

6. Assaig d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP).

Les modificacions epigenètiques de la cromatina en regions promotores específiques van ser determinades analitzant els productes de la immunoprecipitació de cromatina mitjançant la PCR a temps real. L'estudi de les modificacions d'histones i les proteïnes associades a la cromatina es va dur a terme amb quantitats estàndards i petites de cèl·lules i teixits. En cada situació un protocol específic va ser emprat, però en tots primer es fixaren les mostres (1), es sonicaren (2) i s'immunoprecipitaren (3):

1. El pèl·let cel·lular o el teixit triturat (fresc, congelat o conservat en OCT) es va fixar amb formaldehid al 0,5% durant 15 minuts (es va utilitzar una solució al 1% quan es van analitzar proteïnes associades a la cromatina). Es va addicionar glicina a una concentració final de 125mM i s'incubà durant 5 minuts per tal d'aturar l'efecte del formaldehid. A partir d'aquest moment les mostres es van processar en fred i les solucions contenien inhibidors de proteases (1mM PMFS, 1µg/ml Aprotinin i 1µg/ml Pepstatin). Després de dos rentats amb PBS1x, les mostres estaven apunt per ser sonicades o emmagatzemades a -80°C
2. Les mostres de teixits requerien un pas d'extracció nuclear: incubació durant 30minuts a 4°C en solució de Lisi Cel·lular (HEPES, 8,2mM KCl, 0,5% NP40, 1,5mM MgCl₂), disrupció amb *douncer* i centrifugació lenta (250g 5 minuts a 4°C, break = 0). Després, van ser processades com les cèl·lules: el pèl·let resuspès en solució de Lisi (proporcionat pel *kit*) es va sonicar en fragments de 200-500pb. (15-20 cicles de sonicació d'1minut ON/1 minut OFF amb el Bioruptor, Diagenode, Liège, Belgium). Un cop es validà la sonicació i la mostra va ser quantificada, el material insoluble es descartà per centrifugació i la cromatina soluble es va diluir (0,1% SDS concentració final), moment en el que fou a punt per ser immunoprecipitada o emmagatzemada a -80°C.
3. El *Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit* (Millipore) es va emprar per 1-2·10⁶ cèl·lules/IP o 10-20µg DNA/IP; i el *Low Cell ChIP Kit* (Diagenode, Liège, Belgium) va ser utilitzat per quantitats inferiors de material. La immunoprecipitació amb el *kit* de Millipore va requerir una neteja amb les *beads* d'agarosa abans de la incubació mostra-anticòs (*overnight* 4°C). Els complexos immunoprecipitats es van unir a les *beads* d'agarosa i després d'una sèrie de rentats, el material immunoprecipitat es va eluir, es revertí la fixació i es purificà fent extracció amb fenol-cloroform i precipitant amb etanol. En el *Low Cell ChIP Kit*, l'anticòs es va unir a les *beads* magnètiques durant 2 hores i llavors la cromatina es va immunoprecipitar *overnight* a 4°C. Després de rentar els complexos magnètics, el material immunoprecipitat es purificà d'acord les instruccions del fabricant (incubant les *beads* en *DNA Isolation Buffer* amb Proteïnasa K a 55°C 30 minuts i bullint durant 30 minuts). El sèrum de conill (IgG) es va utilitzar com a control negatiu de la immunoprecipitació, mentre que la proteïna total H3 s'utilitzà com a

control positiu. Els anticossos emprats per la immunoprecipitació de cromatina estan llistats a la Taula M7.

Els productes de la immunoprecipitació i l'*input* es va analitzar mitjançant PCR a temps real (cada mostra en triplicat), utilitzant dues plataformes diferents. La major part dels gens s'analitzaren mitjançant LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) (*primers* llistats en Apèndix 1 i (Rodriguez et al., 2008)), mentre que els gens corresponents a la regió 2q14.2 humana es van estudiar treballant amb l'Applied 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (*primers* descrits en (Frigola et al., 2006)). Per tal d'analitzar l'expressió en diferents mostres es normalitzà per carrega utilitzant els valors d'histona total H3 i el mètode $2^{-\Delta\Delta C_p}$. En les marques d'histones H3K27me3, H3K9me2/3 i la proteïna EZH2 s'ha determinat el nivell de soroll de la tècnica tenint en compte els valors obtinguts en el gen actiu GAPDH.

Antibody		Catalogue ID	
IgG	(1)	011-000-120	5 µl/IP
Anti-H3	(2)	ab1791	10 µl/IP
Anti-H3K9ac	(3)	# 07-352	5 µl/IP
Anti-H3K14ac	(3)	# 07-353	5 µl/IP
Anti-H3K4me2	(3)	# 07-030	5 µl/IP
Anti-H3K4me3	(2)	ab8580	5 µl/IP
Anti-H3K4me3	(3)	# NG171579	0.6 µg/IP
Anti-H3K27me3	(3)	# 07-449	5 µg/IP
Anti-H3K9me2	(4)	pAb-060-050	1µg/IP
Anti-H3K9me3	(4)	pAB-056-050	9 µg/IP
Anti-K20H4me2	(2)	ab9051	10 µl/IP
Anti-CTCF	(3)	# 07-729	9 µl/IP
Anti-EZH(2), clone AC22	(3)	CS20319	8µg/IP
Anti-Bmi1, clone F6	(3)	# 05-637	5µg/IP
Anti-αRing1b	(5)		
Anti-Activin A	(6)	MAB3381	
Anti-Activin B	(6)	MAB659	2µg/ml WB

Taula M7. Llista d'anticossos emprats. 1= Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA). 2= Abcam (Cambridge, UK). 3= Millipore (Temecula, CA, USA). 4= Diagenode, Liège, Belgium. 5= Anticòs amablement proporcionat pel laboratori de Marcus Buschbeck. 6= R&D systems (Minneapolis, MN, USA).

6.1 ChIP seqüencial (reChIP).

Per tal de determinar la presència o absència de dominis bivalents de cromatina, es va dur a terme reChIP en intestí prim de ratolins i CT26 (esquematzat en Fig M5). Primer, la immunoprecipitació amb H3K4me3 i H3K27me3 es realitzà en quadruplicat. Per cada marca es realitzà una segona immunoprecipitació amb IgG, H3 total, H3K4me3 i H3K27me3. També es va obtenir el control de càrrega (*input*) en la primera i segona immunoprecipitació.

La fixació, lisi i sonicació es va realitzar tal i com s'ha descrit anteriorment. La immunoprecipitació es va dur a terme utilitzant el *kit* de Millipore. Breument, les mostres es netejaren amb *beads* d'agarosa; cromatina equivalent a 20µg de DNA es va incubar *overnight* amb el primer anticòs; el complex cromatina-anticòs es va unir a les *beads* d'agarosa durant 1h; i les *beads* es van rentar (inhibidors de proteasa es van afegir a les solucions). Després es realitzà l'elució amb 40µl de la solució descrita a (Bernstein et al., 2006) (0,1% SDS, 30mM DTT, 0,5M NaCl) durant 30 minuts a 37°C i 1.100rpm. La recuperació de la cromatina s'incrementà netejant les *beads* amb 60µl de solució de dilució i es va dur a terme una segona immunoprecipitació *overnight* amb el segon anticòs, seguint el protocol descrit abans (rentats, elució, purificació i qPCR)

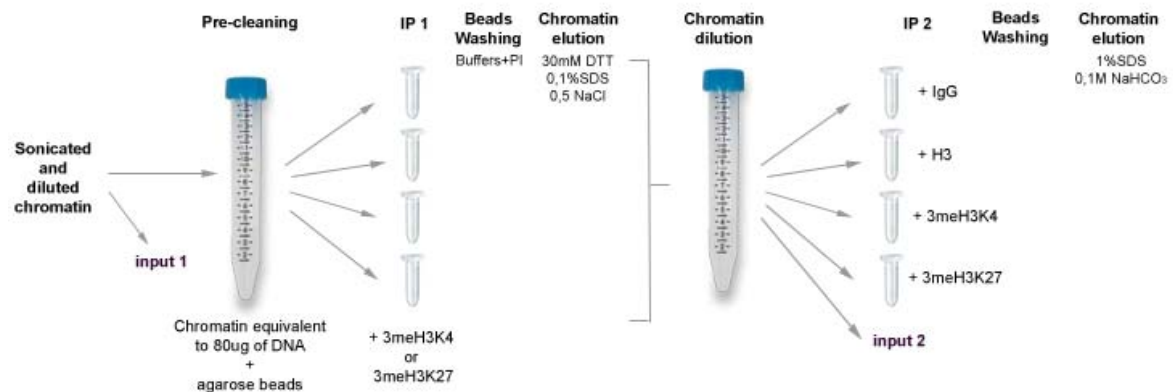


Figura M5. Esquema de l'assaig de reChIP. S'ha descrit el procediment per una de les primeres immunoprecipitacions (H3K4me3 o H3K27me3). Després de la segona elució es reverteix la fixació de la cromatina, el DNA es purifica i la immunoprecipitació es quantifica mitjançant PCR a temps real. IP= immunoprecipitació.

El *Low Cell ChIP Kit* es va emprar per les CT26 obtenint major sensibilitat en la detecció de H3K4me3 i H3K27me3. Cromatina sonicada equivalent a 10^5 cèl·lules es va utilitzar per cada primera immunoprecipitació, realitzada per detectar IgG, H3, H3K4me3 i H3K27me3. Després el material immunoprecipitat per H3K4me3 i H3K27me3 es va eluir de les *beads* magnètiques rentades realitzant una incubació de 30 minuts a 37°C en 112.5µl 1% SDS. La cromatina recuperada es va diluir fins a 1ml i 100µl es van utilitzar per la segona immunoprecipitació, realitzada contra IgG, H3K4me3 i H3K27me3.

7. Resum tècnic.

Per tal de resumir les diferents tècniques descrites en aquesta secció, la taula M8 correlaciona les tècniques i les mostres emprades per cada objectiu proposat en aquest treball.

AIM	ASSAY	SAMPLE
1.1 Genome wide analysis in differentiation	AIMS-Seq (Bisulphite PCR validation)	Sorted <i>villi</i> and crypt populations APC ^{min/+} adenoma
1.2 Genome wide analysis in tumour progression	AIMS-Seq (Bisulphite PCR validation) Microarray expression (mRNA real time PCR validation)	APC ^{min/+} adenoma APC ^{min/+} small intestine C57BL/6J small intestine C57BL/6J colon CT26 Embryonic mouse stem cell
2.1 LRES regulated regions in CaCo 2 differentiation	Bisulphite PCR mRNA real time PCR Chromatin immunoprecipitation	CaCo2 differentiated CaCo2
2.2 LRES in mouse tumorigenesis	Bisulphite PCR mRNA real time PCR Chromatin immunoprecipitation reChIP	C57BL/6J colon CT26
2.3 LRES regulated regions in differentiation	Bisulphite PCR mRNA real time PCR Chromatin immunoprecipitation	Whole <i>villi</i> and crypt fractions Sorted <i>villi</i> and crypt populations
2.4 LRES regulated regions in initial steps of tumorigenesis	Bisulphite PCR mRNA real time PCR Chromatin immunoprecipitation	APC ^{min/+} adenoma APC ^{min/+} small intestine C57BL/6J small intestine
3.1 Activins characterization in CRC	Bisulphite PCR mRNA real time PCR	APC ^{min/+} adenoma APC ^{min/+} small intestine C57BL/6J small intestine C57BL/6J colon CT26 Human normal/tumour pairs Human cell lines
3.2 INH-β_B role in CRC	MTT, XTT Wound Healing Migration (mRNA and protein expression validation)	SW480 SW480+ INH- β_B siRNA SW480+ Anti-INH- β_B SW480+ Rh-INH- β_B

Taula M8. Resum on es correlaciona els objectius d'aquest treball amb les tècniques i mostres emprades.



RESULTATS

1. Canvis de metilació a escala genòmica.

Com ja s'ha comentat anteriorment, el procés tumoral es caracteritza per la presència d'alteracions epigenètiques, tals com la hipometilació global del DNA i la hipermetilació específica de CpGi sovint associades a gens supressors de tumor. L'estudi de les alteracions en la metilació del DNA en estadis inicials de la carcinogènesi pot ser clau alhora d'entendre els factors implicats en la progressió tumoral. És per això, que un dels objectius principals d'aquest treball era determinar les variacions de metilació en els adenomes dels ratolins *Apc^{min/+}* en relació al seu teixit adjacent i l'intestí de ratolins sans (intestí prim i còlon). L'estudi va incloure també la línia cel·lular de càncer colorectal CT26 com a punt de referència d'estadis avançats de carcinogènesi murina, malgrat la representativitat d'una línia cel·lular és limitada (Auman and McLeod, 2010).

Anteriorment ja hem descrit de forma àmplia que els mecanismes de diferenciació cel·lular estan desregulats en els tumors i que diferents estudis donen suport al model de progressió d'SC cancerosa (introducció 2.4). A més, alguns d'ells assenyalen les SC adultes com les responsables d'iniciar el procés tumoral. Així doncs, determinar els canvis en la metilació del DNA durant la diferenciació intestinal pot ajudar a entendre com els mecanismes implicats en la diferenciació participen en la transformació i progressió de la cèl·lula cancerosa. Aquest fet va promoure l'estudi dels canvis de metilació durant la diferenciació de l'intestí prim, obtenint cèl·lules progenitores (cèl·lules de la base de la cripta), cèl·lules en procés de diferenciació i cèl·lules diferenciades d'un grup de ratolins sans (Merlos-Suarez et al., 2011). Resultats previs d'altres grups i propis indicaven poques variacions en els patrons de metilació, fet que va fer centrar-nos en els canvis de metilació entre les cèl·lules de la base de la cripta (cèl·lules progenitores, EphB2^{high}) i les diferenciades (EphB2^{negative}).

A escala genòmica la metilació del DNA es va analitzar mitjançant l'AIMS-Seq, una versió millorada del mètode AIMS. Aquesta tècnica es basa en l'ús d'enzims de restricció sensibles i insensibles a la metilació del DNA i aporta informació sobre els canvis de metilació tant a escala global com a nivell local. A més, també es va analitzar l'expressió gènica d'aquestes mostres mitjançant la hibridació en *microarrays* per tal de caracteritzar millor la diferenciació i el procés tumoral.

1.1 Detecció de la metilació del DNA mitjançant AIMS-Seq.

La tècnica AIMS-Seq permet detectar les dianes *Xmal* (CCC[^]GGG) diferencialment metilades entre mostres. La major part dels amplicons d'AIMS-Seq són resultat de la digestió de dues dianes *Xmal* metilades, que després d'un pas d'amplificació per PCR es seqüencien en la plataforma Solexa. Un cop mapats els *reads* obtinguts en la seqüenciació massiva es pot determinar si un amplicó (fragment *Xmal-Xmal*) està diferencialment metilat en una de les mostres en base al nombre de *reads*.

Cal precisar que les dianes *Xmal* no estan igualment distribuïdes al llarg del genoma, presentant un biaix en les CpGi (Taula R1). A més, en la tècnica AIMS-Seq només es consideren informatius aquells amplicons inferiors o iguals a 2Kb, límit fixat pel pas d'amplificació. Tenint en compte aquests límits, 14.492 amplicons AIMS-Seq estan associats parcial o totalment a una CpGi, mentre que 8.499 amplicons estan situats en CpGi *shores* (regions colindants a les CpGi) (Taula R1). Un element genòmic pot estar representat per més d'un amplicó i l'AIMS-Seq ens pot aportar informació sobre un 48% de les CpGi del genoma. A més, en funció de la posició de les dianes *Xmal* de cada amplicó, aquest es pot associar a un o més elements genòmics, fins a un màxim de tres elements diferents: GpGi, regió CpGi *shore* i seqüència repetitiva. Així doncs, l'AIMS-Seq a més de reportar canvis de metilació en les CpGi també proporciona una visió d'altres elements a escala genòmica.

	CpGi	CpGi <i>shore</i>	SINE	LINE	LTR
Nº elements in mouse genome	16.026	N	1.520.246	949.801	803.341
Nº of <i>Xmal-Xmal</i> fragments associated with	28.212	18.787	21.685	43.650	29.235
Nº of AIMS-Seq amplicons associated with	14.492	8.499	3.185	15.310	4.242
Nº of elements analyzed by AIMS-Seq	7.682	4.768	4.542	18.764	8.736

Taula R1. Elements genòmics descrits en el genoma de ratolí segons el *Genome Browser UCSC* (NCBI37/mm9). Es presenta el número d'amplicons (*Xmal-Xmal* o AIMS-Seq) associats a cada element genòmic. A més estan llistats el màxim d'elements genòmics que es poden estudiar amb la tècnica AIMS-Seq. N= no determinat.

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, s'estudiaren les variacions de metilació durant la diferenciació d'intestí prim i la progressió tumoral. D'una banda es van analitzar per AIMS-Seq (partint de 300ng de DNA) cèl·lules progenitores i diferenciades de l'intestí prim de ratolins sans, incloent també adenomes macroscòpics de ratolins *Apc^{min/+}*. D'altra banda, la progressió tumoral es va estudiar fent AIMS-Seq (partint d'1µg de DNA): d'adenomes macroscòpics de ratolins *Apc^{min/+}* i el seu teixit adjacent; d'intestí prim i còlon de ratolins sans; de la línia cel·lular de càncer colorectal murina CT26 i d'SC embrionàries. Per tal de comparar les diferents mostres (Taula M5), aquestes es van normalitzar pel nombre total de *reads*, tenint en compte

Resultats

els mapats en amplicons inferiors o iguals a 2Kb. Les diferents mostres presentaven un valor similar de *reads* totals (Apèndix 2), exceptuant l'intestí prim r1, que fou la primera en processar-se i tant l'aparell de fragmentació amb el que s'obtingué la llibreria com el *software* de seqüenciació emprat foren diferents a la resta.

Després, les mostres es van classificar en dendrogrames basats en la distància genètica utilitzant el mètode Manhattan, alhora que es va dur a terme l'anàlisi de components principals. Tal i com s'observa en la Figura R1.A, el subgrup de mostres en que l'AIMS-Seq es va realitzar partint de quantitats de DNA més petites s'agrupaven juntes (malgrat haver mantingut les proporcions en les reaccions de digestió i amplificació). Per exemple, l'adenoma r1, que era la suma d'AIMS-Seq dels adenomes r1.1, r1.2 i r1.3 partint d'1µg de DNA, es trobava allunyat de les tres mostres analitzades partint de 300ng de DNA. És per això que l'anàlisi estadístic es va dur a terme per separat en aquests dos grups de mostres.

Els canvis de metilació entre parelles de mostres es van determinar treballant amb el paquet estadístic EdgeR. Les comparacions realitzades estan esquematitzades en la Figura R1.B-C i l'anàlisi es va fer aparellat només en les mostres d'adenoma i teixit adjacent (adjacent r1 vs adenoma r1; i adjacent r2 vs adenoma r2). Els diagrames de Venn es van utilitzar per les comparacions amb SC embrionàries (sense rèplica), tot i que els resultats obtinguts no es presenten a continuació. En totes les comparacions, cada amplicó havia de tenir un mínim de 5 *reads* en una de les dues mostres (*cut-off* empíric) per ser considerat.

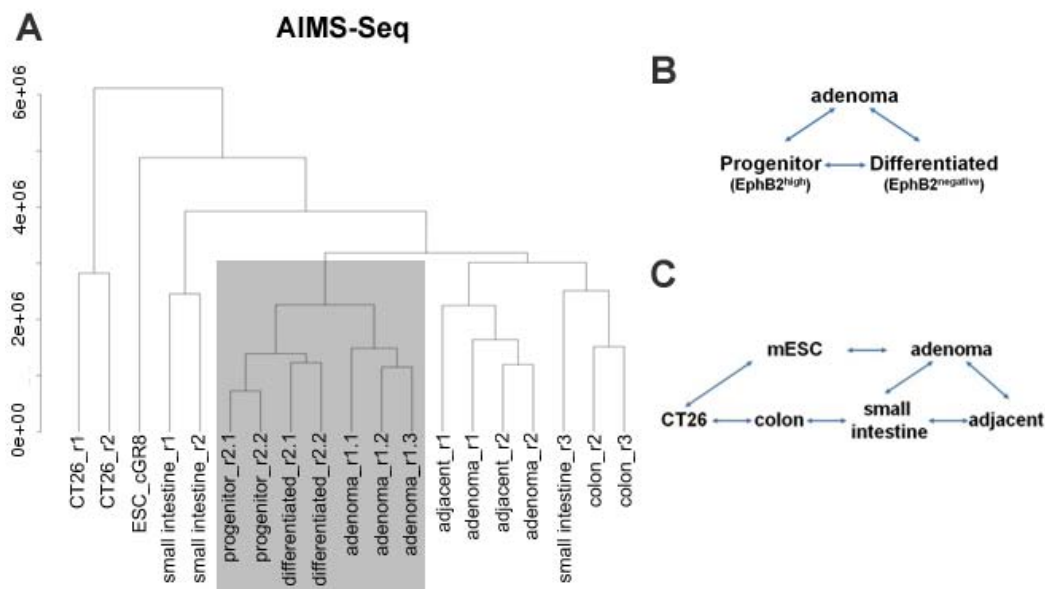


Figura R1. **A.** Dendrograma de totes les mostres analitzades per AIMS-Seq. En gris s'indiquen les mostres en que l'AIMS-Seq s'ha realitzat amb 300ng de DNA enlloc de la quantitat estàndard (1µg). En l'apartat **B** i **C** estan representades les comparacions dutes a terme. mESC= SC embrionàries de ratolí.

1.2 Canvis de metilació propis de la diferenciació intestinal i la tumorigènesi.

Per tal d'analitzar els canvis de metilació al llarg de la diferenciació de l'intestí prim es va realitzar l'AIMS-Seq en les cèl·lules progenitores de la base de la cripta i cèl·lules diferenciades, treballant amb triplicats tècnics. Tres adenomes d'un ratolí *Apc^{min/+}* es van incloure en l'experiment.

En base a la classificació de les mostres mitjançant els dendrogrames i l'anàlisi de components principals, junt amb el test de reproductibilitat de les rèpliques es va descartar un dels triplicats de les cèl·lules progenitores (r2.3) i un de les diferenciades (r2.3). És notori que aquest últim presentava un patró de fraccionament diferent en l'obtenció de la llibreria de seqüenciació.

La Figura R2 mostra els *reads* obtinguts en funció de l'element genòmic associat a l'amplicó. Cal destacar que la major part dels *reads* informaven sobre elements repetitius (SINE, LINE i LTR), així com regions genòmiques que no estaven associades a cap dels elements estudiats. Els adenomes provenien d'individus diferents als de les cèl·lules diferenciades i progenitores, fet que pot explicar part de les diferències que els adenomes presentaven en LINE, LTRs i regions no associades a cap element estudiat. És important recalcar que, proporcionalment, el nombre de *reads* diferien de forma considerable tant en amplicons localitzats en una CpGi com en els situats sobre una CpGi i la seva regió CpGi *shore* (CpGi/CpGi *shore*), mentre que els valors mantenien més constància en elements repetitius (en SINEs especialment) suggerint que les CpGi estaven diferencialment metilades entre aquestes mostres, sobretot en les cèl·lules progenitores.

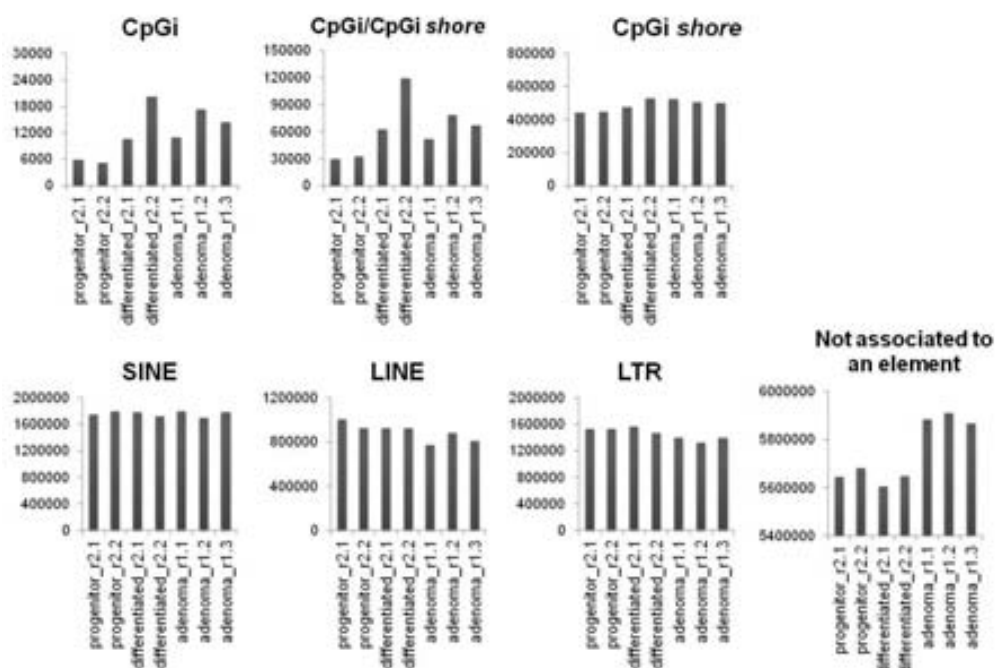


Figura R2. Distribució dels *reads* normalitzats per mostra i element genòmic associat a l'amplicó.

Resultats

El nombre d'amplicons diferencialment metilats en cada comparació està llistat en la Taula R2, on s'observa que les cèl·lules diferenciades i els adenomes estaven hipermetilats respecte les cèl·lules progenitores majoritàriament en les regions CpGi *shore*. A més, la major part de guanys de metilació que presentaven les cèl·lules de ratolins normals respecte els adenomes es concentraven en les seqüències repetitives. La representació d'aquestes dades en la Figura R3 recolza aquestes conclusions. A més de mostrar els amplicons diferencialment metilats en vermell ($FDR \leq 0,01$) (Fig. R3.A-C), aquests amplicons es van associar als següents elements genòmics: CpGi, CpGi/CpGi *shore* i CpGi *shore* (Fig. R3.D-F); i elements repetitius (Fig. R3.G-I). Es pot observar que la major part dels amplicons que s'hipermetilaven en els altres dos tipus cel·lulars respecte les cèl·lules progenitores estaven associats a regions CpGi *shore* i/o CpGi. D'altra banda, hi havien pocs canvis entre cèl·lules diferenciades i adenomes. Finalment, la major part de les hipometilacions en els adenomes respecte a les cèl·lules normals (diferenciades i progenitores) estaven localitzades en elements repetitius.

	CpGi/					
	CpGi	CpGi <i>shore</i>	CpGi <i>shore</i>	SINE	LINE	LTR
<u>Progenitor vs Differentiated</u>						
hypomethylated in negative	0	0	0	0	0	1
hypermethylated in negative	36	283	337	177	28	60
<u>Progenitor vs Adenoma</u>						
hypomethylated in adenoma	3	15	102	512	203	640
hypermethylated in adenoma	35	246	313	201	32	77
<u>Differentiated vs Adenoma</u>						
hypomethylated in adenoma	5	20	40	111	115	143
hypermethylated in adenoma	1	1	4	7	2	3
Virtual amplicons	8.926	5.566	2.933	3.185	15.310	4.242

Taula R2. Nombre d'amplicons associats a un element genòmic que estan diferencialment metilats de forma significativa en cada comparació ($FDR \leq 0,01$). També es mostren els amplicons virtuals, el màxim d'amplicons que es poden analitzar per AIMS-Seq.

Centrant-nos en els canvis que s'esdevenen en CpGi i regions CpGi *shore* localitzades en les zones promotores del gens, al llarg del procés de diferenciació 608 gens presentaven hipermetilacions en aquests elements. D'aquests gens, un 78% no es troben expressats en *microarrays* d'expressió d'intestí de ratolins sans, utilitzant la base de dades pública *The Gene Expression Barcode 2.0*. És important remarcar que molts d'aquests gens també estaven hipermetilats en els adenomes respecte les cèl·lules progenitores (Fig. R3.J).

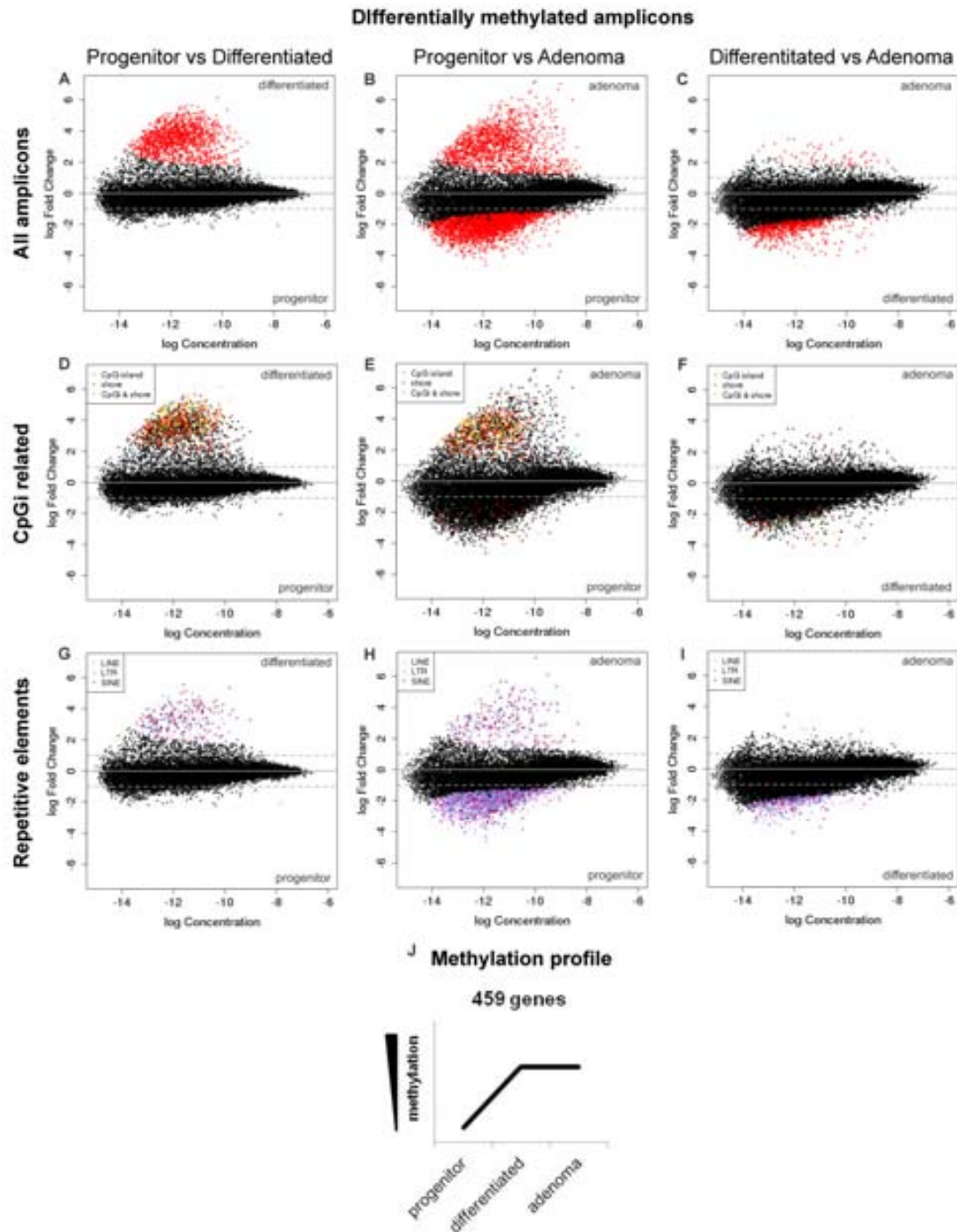


Figura R3. Representació diferencial de la metilació en diferents comparacions utilitzant MA plots. Cada punt representa un amplicó, i els diferencialment metilats de forma significativa ($FDR \leq 0,01$) estan marcats en codi de color segons el tipus d'element genòmic: tots els amplicons (vermell); CpGi (verd); CpGi *shores* (taronja); CpGi/CpGi *shores* (verd fosc); LINEs (rosa clar); LTRs (blau); i SINEs (violeta). Valors positius indiquen hipermetilació en: diferenciades respecte progenitores (**A,D,G**); adenoma respecte progenitores (**B,E,H**) i en adenoma respecte diferenciades (**C, F,I**). Valors negatius indiquen hipometilació. **J.** Nombre de gens que presenten un determinat perfil de metilació en la corresponent regió CpGi promotora.

Resultats

Els gens amb la regió promotora hipermetilada presentaven un enriquiment funcional en processos biològics relacionats amb el desenvolupament i la regulació de l'expressió (anàlisi GO amb el *software* DAVID, Apèndix 2). A més s'observà una sobrerepresentació en gens associats a vies de senyalització implicades en càncer (*KEGG pathway*), involucrant 20 gens (*Bmp4, E2f3, Bcr, Ctbp2, Egl3, Runx1T1, Itga3, Dapk2, Stk4, Ralgds, Shh, Ctnnb1, Tgfb2, Hsp90B1, Hsp90AB1, Cdkn1A, Lama5, Slc2A1, Rara, Axin2*). D'aquests, 17 estan descrits a la bibliografia com a sobreexpressats en tumors i 8 d'ells estan associats a CRC (*Bmp4, Stk4, Shh, Ctnnb1, Tgfb2, Hsp90B1, Hsp90AB1, Slc2A1*). Cal dir, que l'expressió de 9 d'aquests gens no es detecta en intestí normal de ratolí (dades obtingudes de la base de dades *The Gene Expression Barcode 2.0*).

A més, alguns dels gens específics d'SC adultes de l'intestí (*Lgr5, Sox9, Zfp503* i *Dbp*) estaven hipermetilats en cèl·lules diferenciades, essent tres d'ells (*Lgr5, Sox9* i *Zfp503*) implicats en la via de senyalització *Wnt* en línies cel·lulars de càncer colorectal (Sabates-Bellver et al., 2007; van der Flier and Clevers, 2009).

També es va determinar quines marques d'histones estaven associades a aquests gens en diferents línies cel·lulars, prenent com a referència l'estudi realitzat per Bernstein i col·laboradors, malgrat emprar un model cel·lular diferent (Mikkelsen et al., 2007). En aquest estudi s'inclouen 485 dels 608 gens que vam trobar hipermetilats durant la diferenciació mitjançant AIMS-Seq. Tal i com es mostra en al Taula R3, la major part d'aquests gens tenen la marca activa H3K4me3 tant en les cèl·lules pluripotents (ESC) com en les més diferenciades (MEF, NPC), mentre que un 31% es caracteritzen per la presència de dominis bivalents que poden ser resolts o no en línies cel·lulars més diferenciades.

	K4H3me3	K4H3me3 K27H3me3	K27H3me3	None
ESC	318	145	4	19
MEF	333	93	38	20
NPC	349	19	29	88

Taula R3. Marques d'histones en les regions promotores dels gens hipermetilats durant la diferenciació (determinat per AIMS-Seq). Les dades s'han obtingut del treball de Bernstein i col·laboradors (Mikkelsen et al., 2007). ESC = SC embrionàries murines. MEF = fibroblastes embrionàries de ratolí. NPC = cèl·lules neuronals progenitores murines.

Tot seguit es van analitzar els amplicons diferencialment metilats en algunes de les comparacions descrites fins ara amb els canvis de metilació observats en CT26 respecte el teixit de còlon sa, per tal de determinar el seu estat de metilació en estadis avançats de la carcinogènesi. Els resultats d'AIMS-Seq obtinguts en còlon vs CT26 estan detallats i comentats àmpliament en l'apartat següent (1.3). En la Figura R4.A es mostren els amplicons associats a CpGi i/o CpGi *shores* hipermetilats en les diferents comparacions, observant que un 32,9% dels amplicons hipermetilats en cèl·lules diferenciades respecte progenitores i el 33,2% dels hipermetilats en adenomes també ho estaven en CT26 respecte còlon. D'altra banda, en la Figura R4.B es mostra que només un 19% de les hipometilacions en seqüències repetitives dels adenomes respecte les cèl·lules de ratolins sans es van detectar també en CT26.

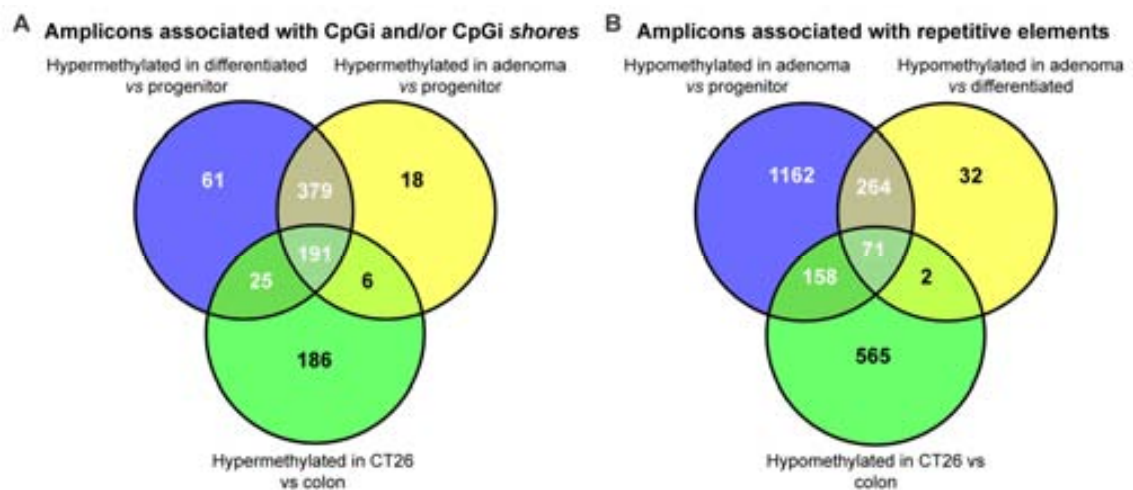


Figura R4. Diagrames de Venn dels amplicons diferencialment metilats en cada comparació. **A.** Amplicons associats a CpGi i/o CpGi *shores* que estan hipermetilats en cèl·lules diferenciades i adenoma respecte les cèl·lules progenitores i en CT26 respecte còlon. **B.** Amplicons associats a elements repetitius que estan hipometilats en adenoma respecte cèl·lules progenitores i diferenciades, i en CT26 respecte còlon.

Resultats

Alguns dels canvis de metilació observats es van corroborar mitjançant seqüenciació de bisulfit, que es considera avui per avui el *gold standard* en tècniques d'anàlisi de metilació del DNA. Aquesta tècnica va permetre determinar que els canvis corresponien a un petit guany de metilació que afectava un baix percentatge de cèl·lules. Per exemple, *Slitrk1* és un gen amb un únic exó que conté una CpGi. Els amplicons d'AIMS-Seq corresponents a aquest gen estan representats en la Figura R5.B, junt amb els *reads* obtinguts en cada mostra. Tal i com s'observa en la Figura R5.A, els amplicons 133978 i 133981 estaven diferencialment metilats. Tot i així, la seqüència de bisulfit de la diana *Xma*I 3' de l'amplicó 133978 només mostrava un petit augment de metilació en les cèl·lules diferenciades en comparació a les progenitores que estaven totalment desmetilades (Fig. R5.C). Aquest petit guany de metilació també afectava als dinucleòtids CpG contigus (Fig. R5D).

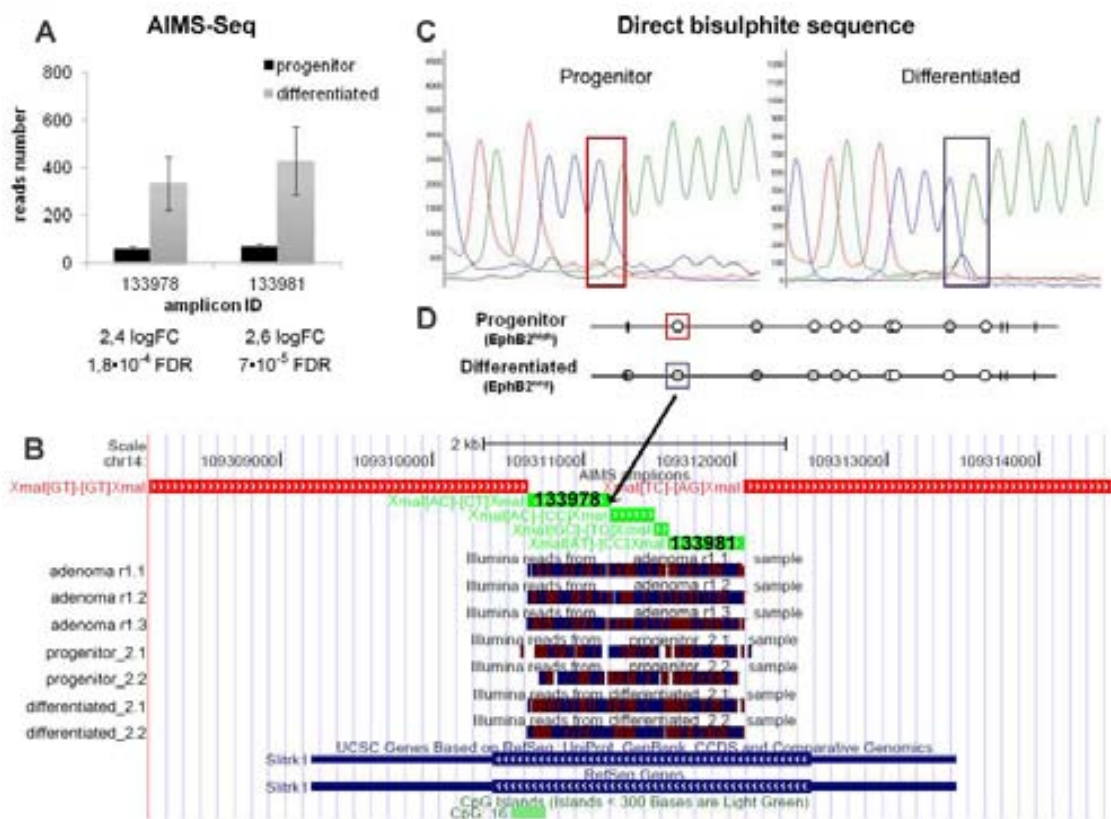


Figura R5. A. Nombre de *reads* i informació estadística dels amplicons associats al gen *Slitrk1* (logFC=logarithmic fold change; FDR=false discovery rate). **B.** Representació del gen *Slitrk1* obtinguda de l'UCSC Genome Browser (NCBI37/mm9), on s'inclou la informació de l'AIMS-Seq: localització dels amplicons (en verd els amplicons ≤ 2 Kb i en vermell els amplicons més grans). **C.** Captura del cromatograma de la seqüència de bisulfit per a la diana *Xma*I 3' de l'amplicó 133978 en cèl·lules diferenciades i progenitores. **D.** Diagrames dels dinucleòtids CpG analitzats mitjançant seqüència de bisulfit, on: boles blanques= CpG no metilades; boles grises= CpG poc metilades; ratlla= estat de metilació no determinat. El nucleòtid CpG corresponent a la diana *Xma*I està enquadrat.

Estudis recents de metilació a nivell genòmic realitzats per Feinberg i d'altres (Berman et al., 2012; Hansen et al., 2011) han senyalat que molts dels canvis de metilació afecten dominis del genoma a més de regions puntuals. Els dominis diferencialment metilats en el procés de diferenciació es van determinar amb el paquet estadístic dissenyat per l'anàlisi de CGH (*DNA copy* de *Bioconductor*). Es van identificar un total de set dominis hipermetilats en cèl·lules diferenciades respecte progenitores. Aquestes regions eren heterogènies en grandària, quantitat de gens i contingut de GpGi (Taula R4). Per exemple, el domini del cromosoma 6 (Fig. R6) abasta 3,3Mb i engloba gens que estan enriquits funcionalment en la regulació negativa de l'adhesió cel·lular, la morfogènesi embrionària i l'activitat aciltransferasa. Altres dominis contenen un nombre menor de gens, però igualment són funcionalment interessants, com és el cas del gen que codifica per la proteïna homeobox 1 de cèl·lules de leucèmia T (TLX1), localitzat en el domini del cromosoma 19.

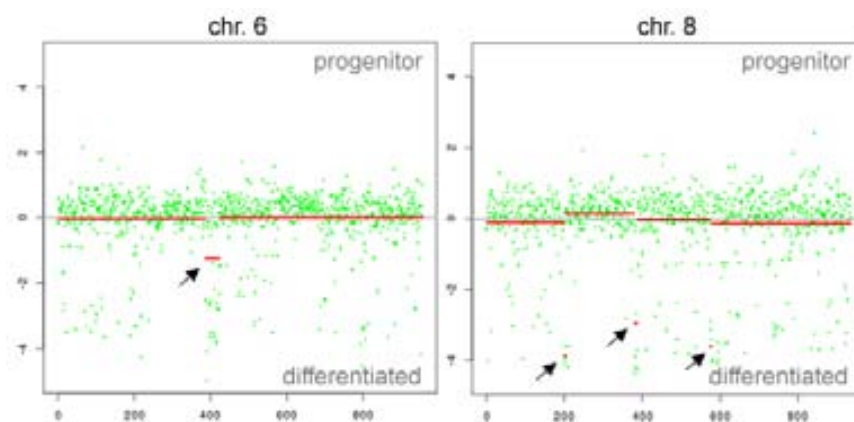


Figura R6. Dominis hipermetilats en cèl·lules diferenciades respecte progenitores descrits en els cromosomes 6 i 8. La discontinuïtat de la línia vermella indica quan hi ha una variació en l'estat de metilació que afecta a una regió. Les fletxes senyalen els dominis hipermetilats.

Location	Size (pb)	Virtual amplicons	Differentially methylated amplicons (FDR≤0,01)	Gene number	CpGi number
chr2:37559404-38321507	762.103	25	5	3	9
chr4:139132029-139388132	256.103	20	5	4	7
chr6:82719305-85979523	3.260.218	113	14	70	66
chr8:35685190-36027681	342.491	12	3	3	1
chr8:73289162-73417628	128.466	24	2	9	18
chr8:107793935-108137201	343.266	8	4	20	14
chr19:45229225-45306030	76.805	16	4	1	4

Taula R4. Característiques de les regions hipermetilades en cèl·lules diferenciades respecte cèl·lules progenitores. També s'inclouen el nombre màxim d'amplicons sobre els que l'AIMS-Seq pot aportar informació, que estan continguts en la regió (*virtual amplicons*).

Aquests anàlisis suggereixen que la metilació del DNA presenta canvis locals i regionals, encara que a nivells molt limitats, en la diferenciació de l'intestí prim. Resta per determinar si la metilació té un paper actiu en el procés de diferenciació o és secundària a d'altres mecanismes de regulació epigenètica.

1.3 Alteracions en la metilació en estadis inicials de la tumorigènesis.

L'estudi dels canvis de metilació associats a la progressió tumoral es va dur a terme fent AIMS-Seq d'adenomes macroscòpics de ratolins *Apc^{min/+}* i el seu teixit adjacent, d'intestí prim i còlon de ratolins sans i de la línia cel·lular CT26, sent aquestes les mostres processades partint d'1µg de DNA (Fig. R1). Per tal d'estudiar els canvis de metilació associats als estadis inicials de la tumorigènesis es determinaren les alteracions en la metilació dels adenomes macroscòpics de ratolins *Apc^{min/+}* respecte el teixit adjacent mitjançant l'ús d'anàlisis estadístics aparellats amb el mètode EdgeR (Fig. R7.D). Tot i que l'intestí prim també va ser inclòs en l'experiment, pocs canvis significatius es van observar degut a l'elevada variabilitat entre les rèpliques d'intestí prim (Fig. R7.C). D'acord als estudis de metilació en regions específiques de DNA, els adenomes presentaven poques variacions respecte el seu teixit adjacent, en comparació a les abundants diferències observades entre la línia cel·lular de càncer colorectal CT26 i el teixit normal de còlon. La major part de les hipermetilacions en CT26 estaven associades a les CpGi i/o regions *shore* (Fig. R7.H, Taula R5), mentre que les hipometilacions afectaven majoritàriament a elements repetitius (Fig. R7.I, Taula R5). Tot i que gran part de les diferències devien ser resultat del procés tumoral, és important tenir en compte que estàvem comparant teixit contra un línia cel·lular i sovint la qualitat del material obtingut d'una línia cel·lular és superior al d'un teixit, alhora que el teixit és molt més heterogeni (Auman and McLeod, 2010).

En total hi havia 149 gens que tenien la CpGi promotora i/o la regió CpGi *shore* més metilada en adenoma que en el seu teixit adjacent. En aquests, l'anàlisi de termes GO mitjançant DAVID va mostrar un enriquiment funcional en: regulació de diferents components del metabolisme d'àcids nucleïcs (nucleobases, nucleòsids, nucleòtids); procés metabòlic d'àcids nucleïcs; expressió gènica; transcripció depenent de DNA; procés metabòlic d'RNA; procés biosintètic cel·lular i procés biosintètic de macromolècules.

	CpGi/					
	CpGi	CpGi <i>shore</i>	CpGi <i>shore</i>	SINE	LINE	LTR
<u>Adjacent vs Adenoma</u>						
hypomethylated in adenoma	0	0	0	0	0	0
hypermethylated in adenoma	13	90	51	16	8	1
<u>Colon vs CT26</u>						
hypomethylated in CT26	0	5	43	217	296	283
hypermethylated in CT26	28	157	223	83	36	31
Virtual amplicons	8.926	5.566	2.933	3.185	15.310	4.242

Taula R5. Nombre d'amplicons associats a un element genòmic que estan diferencialment metilats de forma significativa en cada comparació ($FDR \leq 0,01$). També es mostren els amplicons virtuals, el màxim d'amplicons que es poden analitzar per AIMS-Seq.

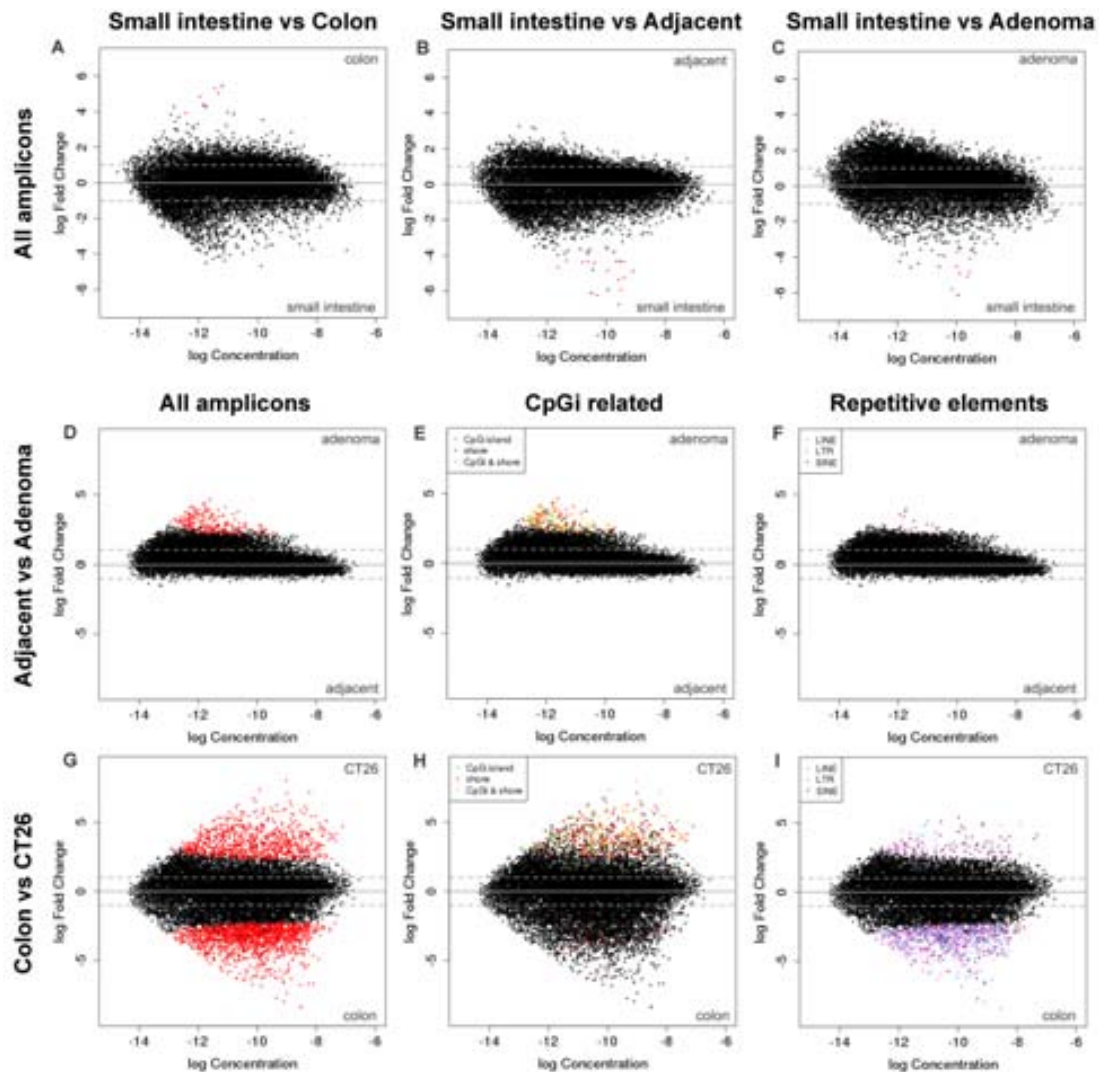


Figura R7. Representació diferencial (MA plot) dels amplicons analitzats per AIMS-Seq. Cada punt representa el logaritme en base 2 de la ratio en el nombre de *reads* entre: intestí prim vs còlon (A), vs teixit adjacent (B), i vs adenoma (C); adjacent vs adenoma (D-F); i CT26 vs normal (G-I). Valors positius indiquen hipermetilació en: les mostres respecte intestí prim (A-C); adenoma respecte adjacent (D-F) i en CT26 respecte còlon (G-I). Valors negatius indiquen hipometilació. Els amplicons diferencialment representats amb un $FDR \leq 0,01$ estan marcats en color: tots els elements (vermell), CpGi (verd); CpGi *shores* (taronja) i CpGi/CpGi *shores* (vermell fosc); LINEs (rosa pàl·lid); LTRs (blau); i SINEs (violeta).

Es va analitzar l'estat d'expressió dels 149 gens que estaven hipermetilats en adenoma mitjançant *microarrays* d'expressió, observant que en el 32% no hi havia expressió o aquesta era baixa i no es detectava. En la resta de gens no es van observar variacions significatives d'expressió tot i presentar un guany en la metilació de les regions promotores.

Resultats

També, es va determinar la correlació d'amplicons associats a CpGi i/o CpGi *shores* que estaven hipermetilats en adenomes respecte teixit adjacent i en CT26 respecte còlon. En aquest cas, un 40% dels amplicons associats a CpGi hipermetilats en adenomes també ho estaven en CT26 (Fig. R8). Dels gens corresponents als amplicons hipermetilats en ambdues mostres, un 65% estaven silenciats o molt poc expressats. L'anàlisi de termes GO (*software* DAVID) va determinar un enriquiment en els processos biològics associats al desenvolupament, i en concret la regulació de processos metabòlics, mentre que els gens que només estaven hipermetilats en adenomes estaven enriquits funcionalment en la regulació de la transcripció.

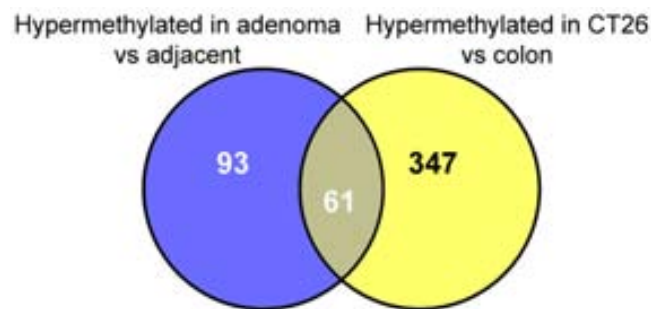


Figura R8. Diagrama de Venn dels amplicons hipermetilats en cada comparació.

Finalment, es van determinar els dominis diferencialment metilats en el procés de tumorigènesi, utilitzant el paquet estadístic dissenyat per l'anàlisi de CGH (*DNA copy* de *Bioconductor*) (Taula R6). En adenoma s'observaren 2 dominis hipermetilats respecte el seu teixit adjacent, essent el del cromosoma 10 enriquit en gens implicats en processos metabòlics (termes GO, *software* DAVID). Com era d'esperar, es van detectar més canvis regionals entre CT26 i còlon, havent-hi hipermetilacions i hipometilacions que afectaven dominis amb diverses propietats, però amb un enriquiment en gens implicats en la senyalització cel·lular (termes GO, *software* DAVID).

Es compararen els dominis diferencialment metilats obtinguts per AIMS-Seq en mostres murines amb els blocs determinats per Feinberg i col·laboradors en CRC humà per seqüenciació *shotgun* de DNA tractat amb bisulfit (Hansen et al., 2011). Dels dominis hipermetilats en adenoma i CT26 descrits per AIMS-Seq, només la regió humana ortòloga a la hipermetilada en adenoma de ratolí *Apc^{min/+}* en el cromosoma 6 es trobà també hipermetilada en CRC humà (bloc 2863). Els dominis hipometilats en CT26, en canvi, presentaven una elevada correlació amb els descrits en CRC humà. Tot i que els dominis determinats per AIMS-Seq superiors a 1Mb estaven representats per diferents blocs en humà, aquests estaven majoritàriament hipometilats (60-100%).

També es van comparar els dominis identificats com a hipermetilats en CT26 amb les regions regulades per LRES càncer de pròstata humana descrites en (Coolen et al., 2010), sense observar cap correspondència entre ambdós grups de regions.

Hypermethylated in adenoma vs adjacent

Location	Size (pb)	Virtual amplicons	Differentially methylated Amplicons (FDR \leq 0,01)	Gene number	CpGi number
chr6:114444930-114821110	376.180	101	0	2	3
chr10:79756357-80155446	399.089	14	2	25	35

Hypermethylated in CT26 vs colon

Location	Size (pb)	Virtual amplicons	Differentially methylated amplicons (FDR \leq 0,01)	Gene number	CpGi number
chr1:3717310-5010318	1.293.008	6	1	6	8
chr6:3002117-6686155	3.684.038	17	0	29	11
chr6:6810640-6814850	4.210	4	2	3	3
chr8:73012588-73015349	2.761	3	3	0	2
chr11:74423819-80288819	5.865.000	75	7	136	116
chr19:42829945-48141777	5.311.832	68	13	96	112

Hypomethylated in CT26 vs colon

Location	Size (pb)	Virtual amplicons	Differentially methylated amplicons (FDR \leq 0,01)	Gene number	CpGi number
chr1:6153754-27333388	21.179.634	64	17	109	65
chr4:41755940-42804593	1.048.653	13	11	49	16
chr4:139789171-139825256	36.085	7	2	1	2
chr4:151722978-155604490	3.881.512	87	13	97	61
chr6:55344125-58477133	3.133.008	29	1	48	12
chr11:80326153-82416720	2.090.567	23	0	13	6
chr12:3149616-31615170	28.465.554	109	5	121	140

Taula R6. Característiques dels dominis diferencialment metilats en adjacent vs adenoma i CT26 vs còlon. També s'inclouen el nombre màxim d'amplicons sobre els que l'AIMS-Seq pot aportar informació, que estan continguts en el domini (*virtual amplicons*).

1.4 Variacions en l'expressió gènica en estadis inicials de la tumorigènesis.

Per tal de determinar els canvis d'expressió gènica associats a estadis inicials de la progressió tumoral, es van analitzar mitjançant *microarrays* d'expressió mostres provinents de ratolins *Apc^{min/+}* i ratolins sans. A més, la línia de càncer colorectal murina CT26 també es va incloure en l'anàlisi.

Es van dur a terme les comparacions dos a dos descrites en la Figura R9.A i es determinaren els canvis significatius mitjançant el test estadístic Limma del *software* TMEV ($FDR \leq 0,05$). Els adenomes macroscòpics de ratolins *Apc^{min/+}* presentaven un total de 91 gens sobreexpressats respecte el seu teixit adjacent. En l'estudi de termes GO (*software* DAVID) es va trobar enriquiment funcional en gens implicats en migració, quimiotaxi i gens associats a la regió extracel·lular. Tot i que només hi havia 6 gens infraexpressats en adenoma, dos d'aquests (GPX6 i GPX5) estaven implicats en el metabolisme del glutatió.

Els gens sobreexpressats en adenoma respecte al teixit adjacent estaven inclosos en els 736 gens més expressats en adenoma en comparació a l'intestí prim del ratolí sa. Tal i com s'esperava, les diferències d'expressió de l'adenoma eren majors respecte el teixit sa i un 26% dels gens sobreexpressats en adenoma eren comuns als descrits per Gaspar i col·laboradors en mostres similars (Gaspar et al., 2008).

Es va determinar quin perfil d'expressió gènica presentaven els gens diferencialment expressats entre intestí prim i adenoma en tots els teixits murins analitzats per *microarrays* (còlon, intestí prim, adenomes macroscòpics de ratolins *Apc^{min/+}* i el seu teixit adjacent). Així doncs, es van agrupar tant els gens sobreexpressats com els infraexpressats en dos subgrups (*clusters*) diferents en funció de la seva expressió en les diferents mostres (Fig. R9), observant que l'adenoma tenia un perfil d'expressió similar al còlon en alguns gens (Fig. R9.C-D).

Tot seguit es va determinar l'enriquiment funcional per cada subgrup de gens (termes GO i *KEGG pathways*, *software* DAVID) que està llistat en la Taula R7. D'una banda, els gens infraexpressats en adenoma respecte intestí prim estaven relacionats amb proteïnes de transport, sistema immune i metabolisme dels lípids (fosforilació o vies de senyalització PPAR), independentment del subgrup en que es classifiquessin. D'altra banda, els gens més expressats en adenoma que en intestí prim, però no en còlon, (Fig. R9D) estaven implicats en la replicació del DNA i el ribosoma, mentre que els gens sobreexpressats en adenoma respecte el teixit sa (còlon i intestí prim, Fig. R9E) estaven associats a angiogènesi, quimiotaxi, morfogènesi del teixit, via de senyalització *Wnt*, grànuls secretors, orientació axonal i interacció de receptors citoquina-citoquina, entre d'altres.

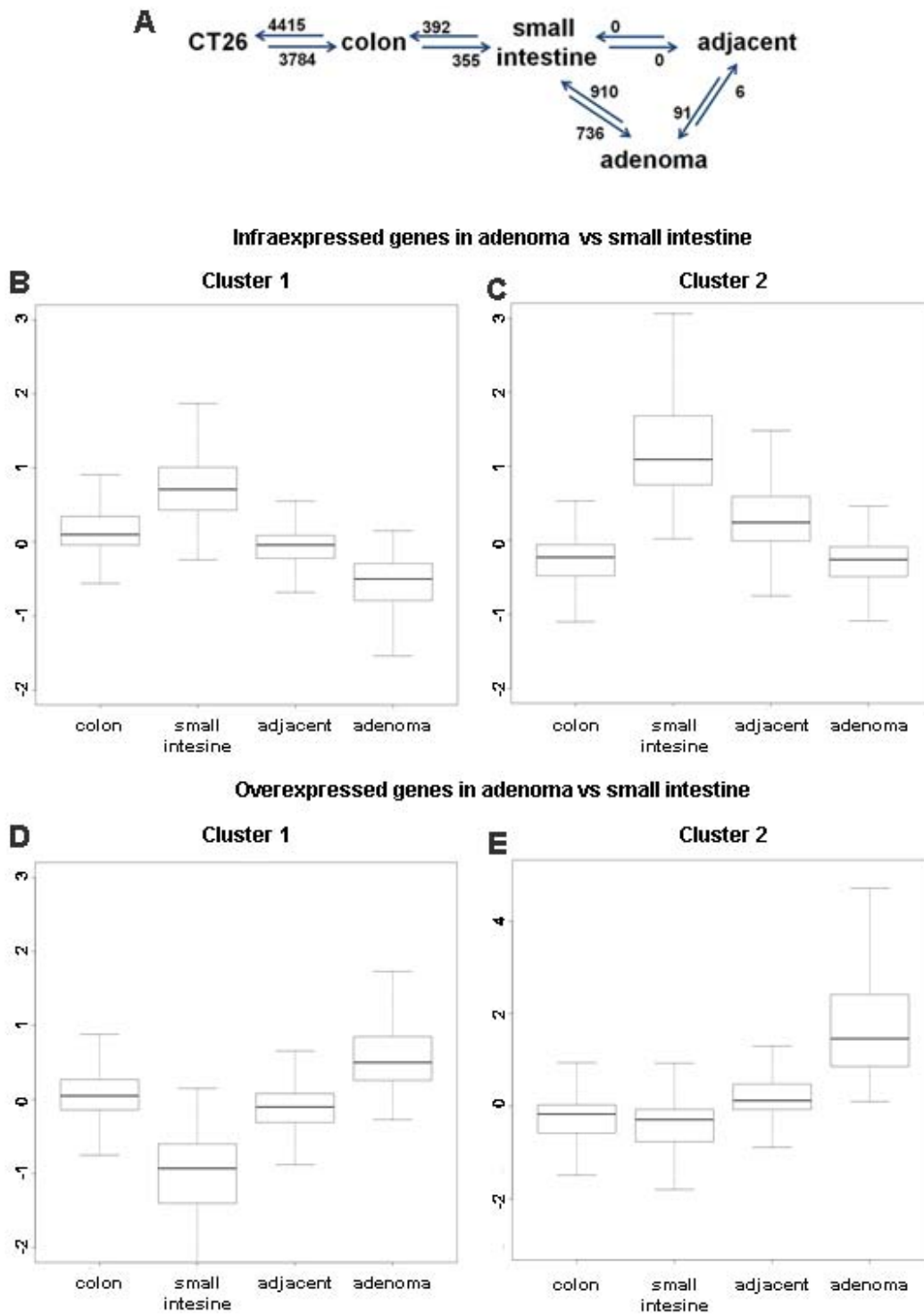


Figura R9. Diferències en expressió gènica. **A.** Diagrama de les comparacions realitzades, incloent el nombre de gens que guanyen o perden expressió en cada comparació 2 a 2. Les fletxes senyalen la mostra en que el gen s'expressa més. **B-E** Box plot de la classificació obtinguda mitjançant KMS (*k-means/medians clustering*) dels gens diferencialment expressats entre adenoma i intestí prim. **B-C.** Classificació dels gens sobreexpressats en intestí prim. **D-E.** Classificació dels gens sobreexpressats en adenoma.

**Functional enrichment in small intestine-adenoma comparison
Genes infraexpressed in adenoma**

Cluster 1

Biological Process

lipid phosphorylation
phosphorylation
protein transport
regulation of immune effector process
phosphoinositide metabolic process

Cellular Component

cytoplasm
cytoplasmic part
mitochondrial part
intracellular membrane-bounded organelle
mitochondrial membrane
mitochondrial inner membrane
mitochondrial envelope
organelle inner membrane
intracellular organelle
intracellular organelle part

Molecular Function

purine ribonucleotide binding
kinase activity
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor

Cluster2

Biological Process

intracellular signaling cascade
protein transport

Cellular Component

Cytoplasm
extrinsic to membrane
plasma membrane part

Molecular Function

kinase activity
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor

KEGG Pathway

Antigen processing and presentation
PPAR signaling pathway

Genes overexpressed in adenoma

Cluster 1

Biological Process

translation
DNA replication
M phase
centrosome organization
cellular protein metabolic process
DNA metabolic process
microtubule organizing center organization
RNA metabolic process

Cellular Component

ribosome
ribonucleoprotein complex
intracellular organelle
intracellular non-membrane-bounded organelle
nucleus
cytoplasm
intracellular membrane-bounded organelle
cytosolic ribosome
microtubule cytoskeleton
spindle
chromosome

Molecular Function

adenyl nucleotide binding

KEGG Pathway

Ribosome
DNA replication

Cluster2

Biological Process

Angiogenesis
blood vessel morphogenesis
organ morphogenesis
Chemotaxis
tissue morphogenesis
blood vessel development
vasculature development
tissue development
morphogenesis of an epithelium
epithelium development
branching morphogenesis of a tube
pancreas development
negative regulation of signal transduction
regulation of signal transduction
regulation of Wnt receptor signaling pathway
cellular cation homeostasis
cell migration
embryonic organ development
negative regulation of cell communication

Cellular Component

secretory granule

Molecular Function

serine-type peptidase activity
peptidase activity, acting on L-amino acid peptides
G-protein-coupled receptor binding
hormone activity

hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amidines

KEGG Pathway

Cytokine-cytokine receptor interaction
Axon guidance

Taula R7. Enriquiment funcional dels gens diferencialment expressats. FDR≤0.05

1.5 Expressió dels gens diferencialment metilats.

Tal i com s'ha descrit en l'apartat 1.3, els gens amb la regió promotora hipermetilada en adenoma respecte el teixit adjacent no presentaven variacions en l'expressió gènica, tenint en compte que en un 32% d'aquests no es va detectar expressió en cap de les mostres de teixit. D'altra banda, en adenomes no s'observaren hipometilacions en regions CpGi promotores, així que no es va poder correlacionar la pèrdua de metilació amb l'augment d'expressió descrit en adenomes respecte el teixit adjacent. Tot i que hi havia sis gens infraexpressats en adenoma respecte a teixit adjacent, no es va poder determinar el seu estat de metilació mitjançant AIMS-Seq ja que no hi havia amplicons virtuals associats (eren amplicons superiors a 2Kb, sobre els que l'AIMS-Seq no pot aportar informació).

En la Figura R7.C es pot observar que l'intestí prim i l'adenoma presentaven pocs amplicons diferencialment metilats de forma significativa, dels quals sis estaven associats a CpGi promotores: dos hipermetilats en adenoma i tres hipometilats. Tot i això, la proteïna ribosòmica S4 associada al cromosoma X (*Rps4x*) estava hipometilada i sobreexpressada en adenoma. *Rpx4x* és un gen regulat per C-MYC i ha estat proposat com a biomarcador de CRC, essent més associat a càncers no mucinosos (Jung et al., 2011b).

2. Silenciament epigenètic regional de gran abast (LRES).

En l'apartat 4.1 de la introducció ja s'ha descrit el silenciament epigenètic regional de gran abast (*Long-Range Epigenetic Silencing*, LRES) com un fenomen relativament comú en càncer que pot afectar diverses regions cromosòmiques. Els estudis realitzats fins ara han permès caracteritzar els mecanismes epigenètics implicats en el LRES utilitzant línies cel·lulars de càncer colorectal tractades amb inhibidors de DNA metiltransferases i de deacetilases (Frigola et al., 2006; Mayor et al., 2009; Rodriguez et al., 2008), però la dinàmica de regulació d'aquestes regions en processos cel·lulars com la diferenciació i fases inicials de la tumorigènesi roman incògnita. És per això que es va estudiar el perfil epigenètic de la regió 2q14.2 (silenciada mitjançant LRES en CRC) durant la diferenciació *in vitro* de la línia cel·lular d'adenocarcinoma colorectal CaCo2. A més, es determinà la conservació del LRES en ratolí. En concret es va treballar amb teixit normal de còlon i la línia cel·lular murina de càncer colorectal CT26, estudiant el perfil epigenètic de dues regions ortòlogues a les silenciades en CRC humà (2q14.2 i 5q35.2). Finalment, es va analitzar el comportament d'aquestes regions durant la diferenciació de l'intestí prim i en estadis inicials de la carcinogènesi, treballant amb adenomes de ratolins *Apc^{min/+}*.

2.1 Perfil epigenètic de la regió 2q14.2 durant la diferenciació de les cèl·lules CaCo2.

CaCo2 és una línia cel·lular establerta provinent de cèl·lules epitelials heterogènies d'adenocarcinoma colorectal. Tot i el seu origen, el cultiu d'aquestes cèl·lules en determinades condicions suposa la seva diferenciació i polarització, adquirint propietats d'enteròcit d'intestí prim. El procés de diferenciació es pot dur a terme mantenint les cèl·lules en confluència durant 20 dies o cultivant-les en un suport i medi comercial (BIOCOAT® HTS CaCo-2 Assay System). En ambdós casos es va comparar el perfil epigenètic (metilació del DNA i patrons de cromatina) i l'expressió gènica de la regió 2q14.2 en les CaCo2 i les CaCo2 diferenciades, per tal d'estudiar la dinàmica de la regió en aquest procés.

La regió 2q14.2 abasta 4Mb i conté un nombre elevat de gens, essent molt rica en CpGi. En la major part de càncers colorectals i en HCT116 (línia cel·lular de càncer colorectal) hi ha un silenciament transcripcional de la regió acompanyat d'una heterocromatització (augment d'H3K9me2). Aquest silenciament implica la disminució de l'expressió d'un grup de gens i el silenciament mitjançant la hipermetilació de les CpGi promotores dels gens EN1, INH- β_B i SCTR. D'una forma similar al que s'observa en adenomes colorectals humans (Mayor et al., 2009) la regió 2q14.2 en les cèl·lules CaCo2 presentava una metilació parcial on la CpGi promotora de: INH- β_B estava desmetilada, EN1 parcialment metilada, i SCTR totalment metilada. Aquest patró de metilació es va mantenir constant durant la diferenciació (Apèndix 3.1).

No obstant, la regió 2q14.2 presentà canvis en la conformació de la cromatina i l'expressió gènica. Específicament, el procés de diferenciació va implicar un augment en l'expressió gènica regional, excepte en $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$, en que la disminució d'expressió està descrita durant aquest procés (Fleet et al., 2003). Quan s'induí diferenciació per confluència la població cel·lular resultant era heterogènia als 11 dies de cultiu en confluència (11dpc), i diferenciada als 20 dies (20dpc). Les propietats d'enteròcit es mantienien als quaranta dies de cultiu en confluència (40dpc). Els canvis d'expressió van ser acompanyats per un augment dels nivells d'H3K9ac en les regions promotores (Fig. R10), mentre que no es van observar canvis en altres marques d'histones (H3K4me3, H3K27me3, H3K9me2 i H3K9me3; dades no mostrades).

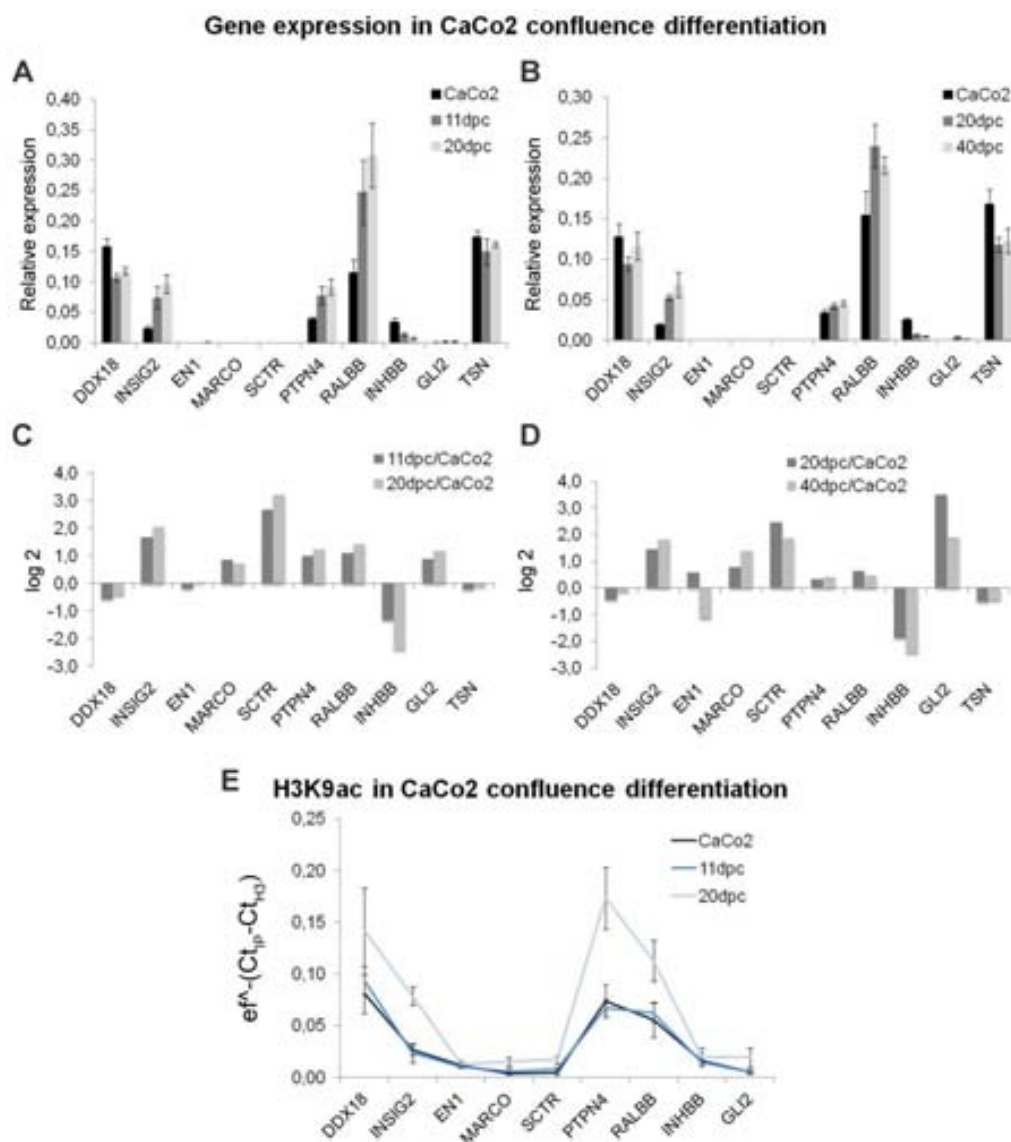


Figura R10. Perfils d'expressió gènica i acetilació d'H3K9 en CaCo2 diferenciades en confluència. Expressió als 0, 11 i 20 dies de confluència: (A) valors normalitzats i (C) relatius respecte les cèl·lules CaCo2 a temps 0. (B) Expressió gènica als 0, 20 i 40 dies de confluència: valors normalitzats i (D) valors relatius respecte les cèl·lules CaCo2 a temps 0. E. Nivells d'H3K9ac en les regions promotores dels gens en cèl·lules als 0 (CaCo2), 11 i 20 dies en confluència. dpc = dies post-confluència.

El fet de trobar una regió cromosòmica relativament sotmesa a una regulació de gran abast (en aquest cas silenciament), sustenta la importància d'estudiar l'estat de les proteïnes encarregades de marcar les barreres físiques dins de la regió (*insulators*). Així doncs, es van analitzar els nivells de proteïna CTCF en els llocs d'unió (CTCFBS) descrits en estudis previs: ZHAO 2821, ZHAO 2826 i ZHAO 2829 reportats en (Barski et al., 2007); i REN 1951, REN 1964 i REN 1972 identificats en (Kim et al., 2007). S'utilitzà com a control negatiu regions properes als llocs d'unió però no definides com a tals, i es determinà, a més, la IgG en ambdues zones (control negatiu del ChIP). Tal i com es mostra en la Figura R11, els nivells de CTCF en les regions controls (barres verd fosc) eren nuls o similars a la IgG corresponent, excepte en ZHAO 2826 als 20 dies post-confluència. En la resta de llocs d'unió s'observà un augment en els nivells de CTCF (barres marrons) al llarg de la diferenciació. L'augment es va detectar als 11 dies de diferenciació en ZHAO 2829 i REN 1964, però no es corroborà als 20 dies degut als elevats nivells d'IgG. Aquests resultats suggereixen que el silenciament de la regió mitjançant LRES va acompanyat de la pèrdua de les barreres físiques internes.

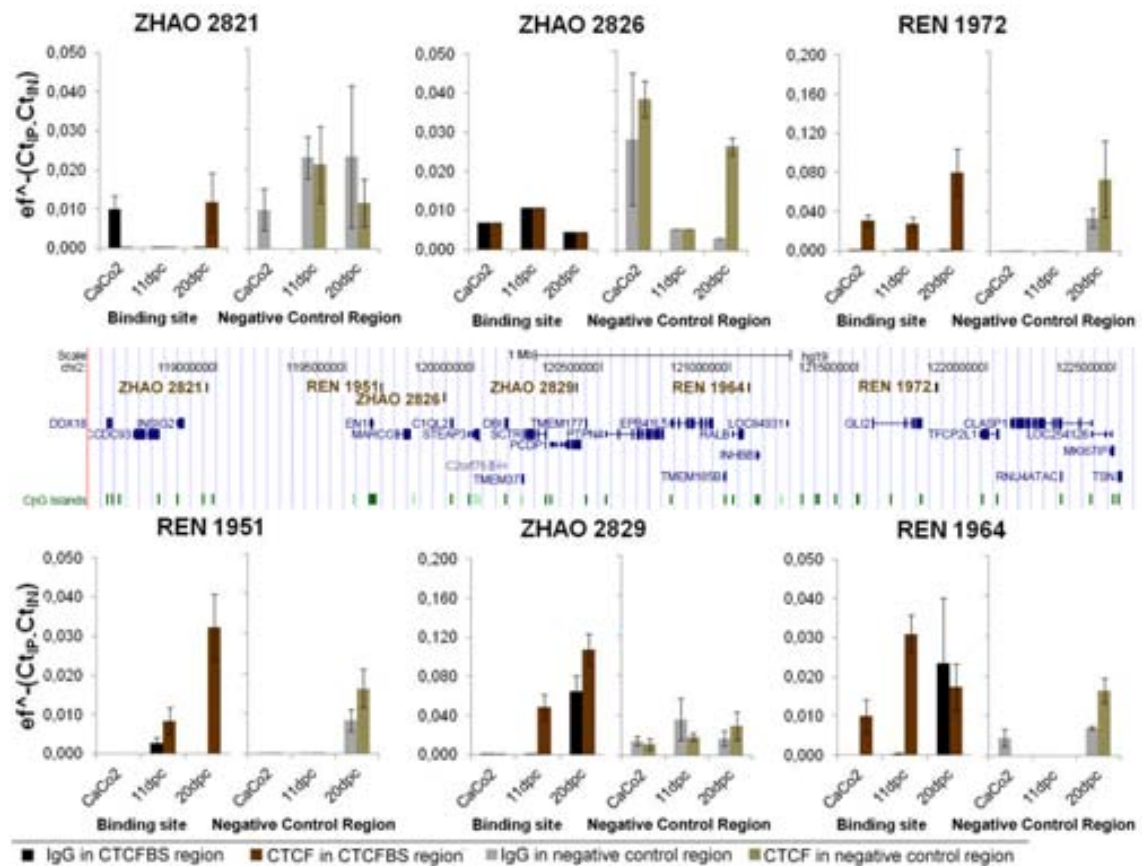


Figura R11. Valors de ChIP contra la proteïna CTCF en les cèl·lules diferenciades en confluència durant 0, 11 i 20 dies. A més, es mostren els valors obtinguts pels diferents controls negatius i la localització de les zones analitzades dins la regió 2q14.2 (imatge obtinguda de l'UCSC Genome Browser). dpc = dies post-confluència. CTCFBS = CTCF Binding Site.

Per confirmar els resultats obtinguts en la diferenciació per confluència, es va utilitzar un altre mètode basat en l'acció de l'àcid butíric (*BIOCOAT® HTS Caco-2 Assay System*). En aquest cas, també es va observar un augment d'expressió regional amb nivells similars als de les cèl·lules diferenciades en confluència. Per investigar l'estabilitat dels canvis en el temps, les cèl·lules diferenciades amb àcid butíric es van cultivar durant 18 dies en condicions estàndards (cèl·lules post-tractament). En aquest cas, l'augment d'expressió va ser molt elevat, incloent l'INH- β_B (Fig. R12.A-B). Tal i com es mostra en Figura R12.C-D per la H3K9ac (dades d'altres marques d'histones no mostrades), les cèl·lules diferenciades amb àcid butíric presentaren patrons alterats en les marques d'histones però les cèl·lules post-tractament recuperaren els nivells prèviament detectats en CaCo2 no tractades, suggerint una remodelació de la cromatina just després del tractament amb àcid butíric que seria de caràcter temporal. D'altra banda el més probable és que els valors obtinguts en el ChIP de les cèl·lules tractades amb àcid butíric fossin deguts a la interferència de restes de col·lagen emprat en la diferenciació, ja que l'àcid butíric és un inhibidor de les deacetilases i s'esperaria que en les cèl·lules diferenciades amb àcid butíric hi hagués un augment en H3K9ac (corresponent a l'increment d'expressió observat) i no tot el contrari.

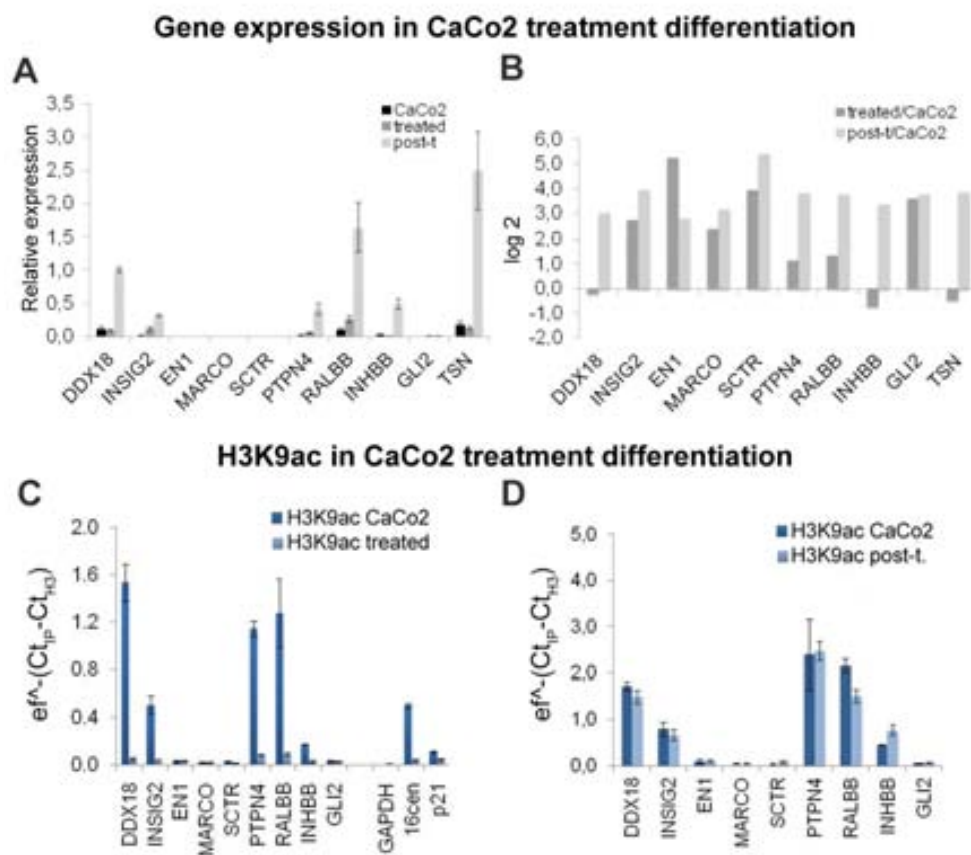


Figura R12. Perfils d'expressió gènica i H3K9ac en CaCo2 diferenciades amb àcid butíric. **A.** Expressió de les CaCo2, les cèl·lules tractades i les post-tractament (post-t) **B.** Valors relatius d'expressió respecte les cèl·lules CaCo2. Valors d'H3K9ac en: CaCo2 i cèl·lules tractades (**C**) i en CaCo2 i cèl·lules post-tractament (**D**).

Sorprenentment, en ambdós protocols de diferenciació es va observar un augment d'expressió del gen SCTR malgrat mantenir la CpGi promotora totalment metilada. Cal tenir en compte que a més de la seqüència consens per SCTR, hi ha predita una possible isoforma que no té associada una CpGi promotora i els resultats presentats fins ara no distingien entre ambdues isoformes (la regió analitzada era l'*standard* de la Fig. R13.A). Per tal d'elucidar si l'expressió observada era deguda a la isoforma predita i/o a la consens es van dissenyar nous *primers* que amplificaven ambdues isoformes de forma específica (*validated* per la seqüència consens i *putative* per la predita, Fig. R13.A). Tal i com es pot observar en la Figura R13.B, ambdues isoformes (amb i sense CpGi promotora) es sobreexpressaven en les cèl·lules diferenciades.

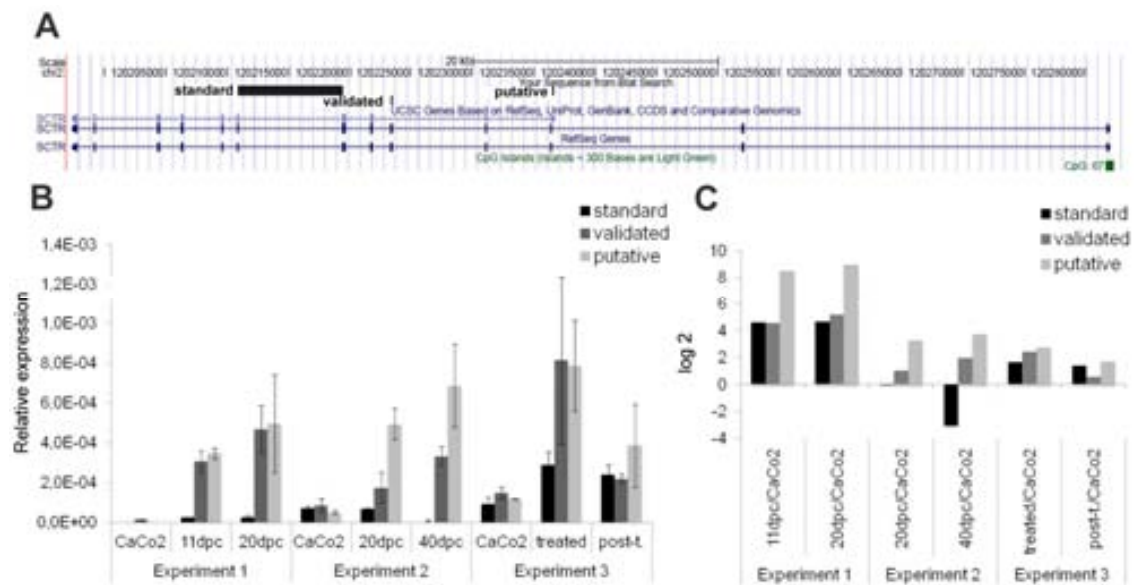


Figura R13. A. Esquema obtingut de l'UCSC Genome Browser de les diferents isoformes descrites per SCTR, on s'especifiquen les diferents regions en que es va analitzar l'expressió per PCR a temps real (*standard*, *validated* i *putative*). **B.** Valors d'expressió per les diferents isoformes d'SCTR en els diferents experiments de diferenciació de CaCo2 (confluència o tractament amb àcid butíric). L'*standard* amplifica el fragment descrit en les anteriors figures com SCTR. **C.** Valors relatius d'expressió respecte les cèl·lules CaCo2. dpc= dies post confluència. post-t= post-tractament.

En resum, quan CaCo2 adquireix propietats d'enteròcit, hi ha un augment regional de l'expressió en la major part dels gens de la regió 2q14.2 acompanyat per un increment en els nivells d'H3K9ac i una recuperació de les barreres físiques dins la regió (increment de CTCF), el que seria coherent amb un establiment de subdominis. Finalment, aquests canvis d'expressió i conformació de la cromatina no estan associats a variacions en la metilació de les CpGi promotores, el que suggereix que els mecanismes implicats en la regulació d'aquesta regió durant la diferenciació no són capaços de revertir la metilació del DNA.

2.2 LRES en la línia cel·lular murina de càncer colorectal CT26.

2.2.1 Regions analitzades.

En humans, les regions 2q14.2 i 5q35.2 estan silenciades mitjançant LRES en la major part dels carcinomes colorectals. Les regions ortòlogues en ratolí, 1qE2.3 i 13qB1 (Fig. R15) presenten elevada homologia a nivell de seqüència, mantenen l'ordre de gens i conserven les CpGi promotores. Ens vam plantejar si aquestes regions també estaven silenciades en tumors de ratolí. Si fos el cas, indicaria que els mecanismes de regulació d'aquestes regions s'hauria conservat i, per tant, serien equivalents entre humans i ratolí. D'aquesta manera es podria disposar del model de ratolí per estudiar la dinàmica i la funcionalitat d'aquests processos.

En humans la regió cromosòmica 5q35.2 presenta dues variants del gen COMPLEXIN 2 (CPLX2, (Raevskaya et al., 2005). El *Cplx2* de ratolí és equivalent a la variant 2 d'humans i té associada la CpG47 en la regió promotora. D'altra banda, el mRNA corresponent a la variant 1 del *Cplx2* va ser detectat també en ratolí (el fragment amplificat està indicat en Fig. R14). Aquestes dues variants van presentar perfils diversos en les diferents mostres: l'expressió de la variant 1 es correlacionava amb l'estat de metilació de la CpG87, mentre que l'expressió de la variant 2 estava associada a la metilació de la CpG47.

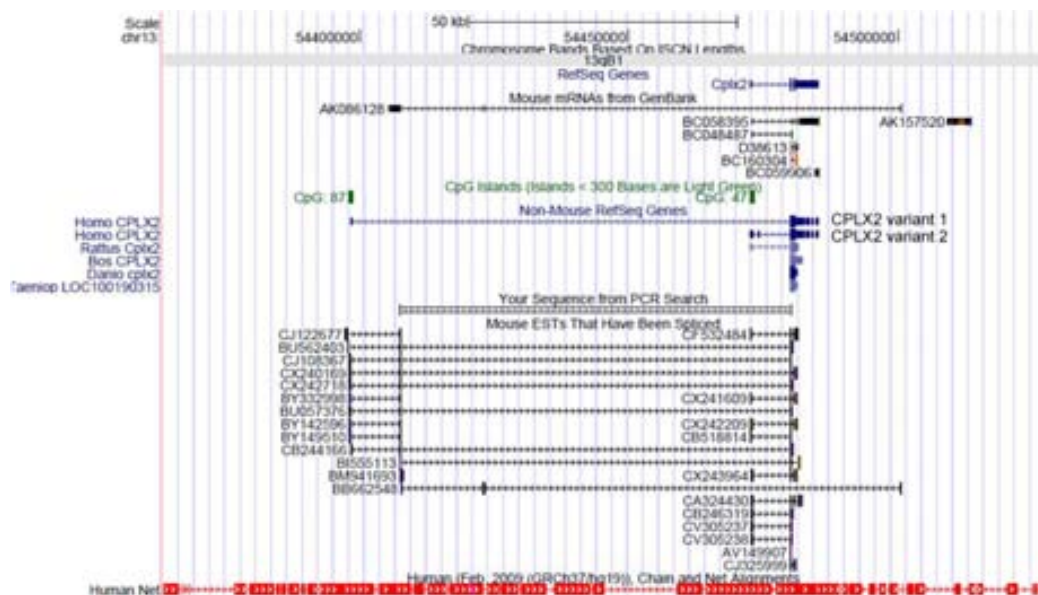


Figura R14. Representació de l'UCSC *Genome Browser* per la regió del gen *Cplx2* en ratolí (NCBI37/mm9). Les CpGi estan dibuixades en verd i les variants del CPLX2 humà també estan representades. "Your Sequence from PCR Search" correspon al cDNA amplificat amb els primers de la variant 1. Aquest producte coincideix amb diferents ESTs descrits. La "net track" mostra que el cromosoma 5 d'humans, de color vermell, té elevada homologia amb aquesta regió del genoma de ratolí.

A més, cal tenir en compte que tot i que en ratolí no hi ha una CpGi descrita en la regió promotora d'SCTR, aquesta és rica en CpG.

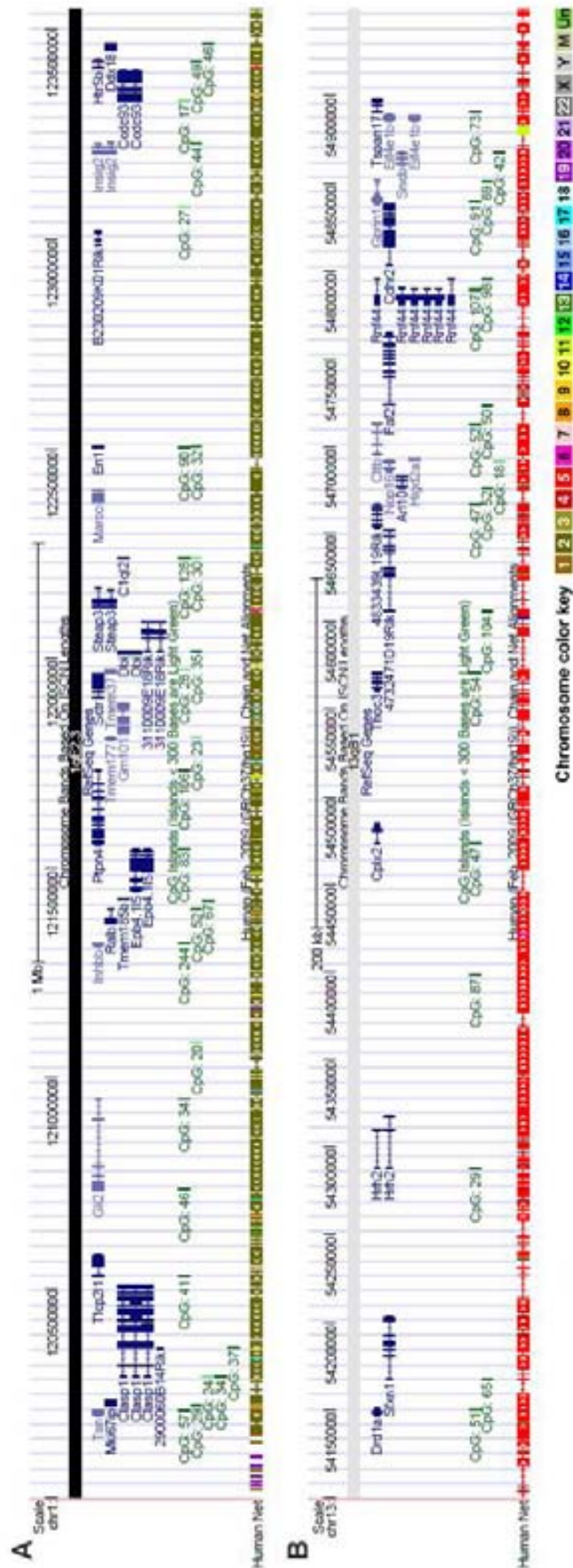


Figura R15. Representacions obtingudes de l'UCSC Genome Browser per les regions 1qE2.3 (A) i 13qB1 (B) de ratolí (NCBI37/mm9). Les CpGi estan representades en verd i la "net track" mostra quina és la regió homòloga en humans (la llegenda de colors pels cromosomes d'humans està inclosa) .

Per tal de tenir una visió global de l'estat transcripcional d'aquestes regions es va analitzar l'expressió gènica en diferents teixits de ratolí sa (C57BL/6J). Tal i com s'observa en la Figura R16, per la regió 1qE2.3 cada teixit presentava valors diferents en gens específics, però el perfil d'expressió de les regions era similar en la major part dels teixits, exceptuant els testicles on els nivells eren més elevats al llarg de la regió.

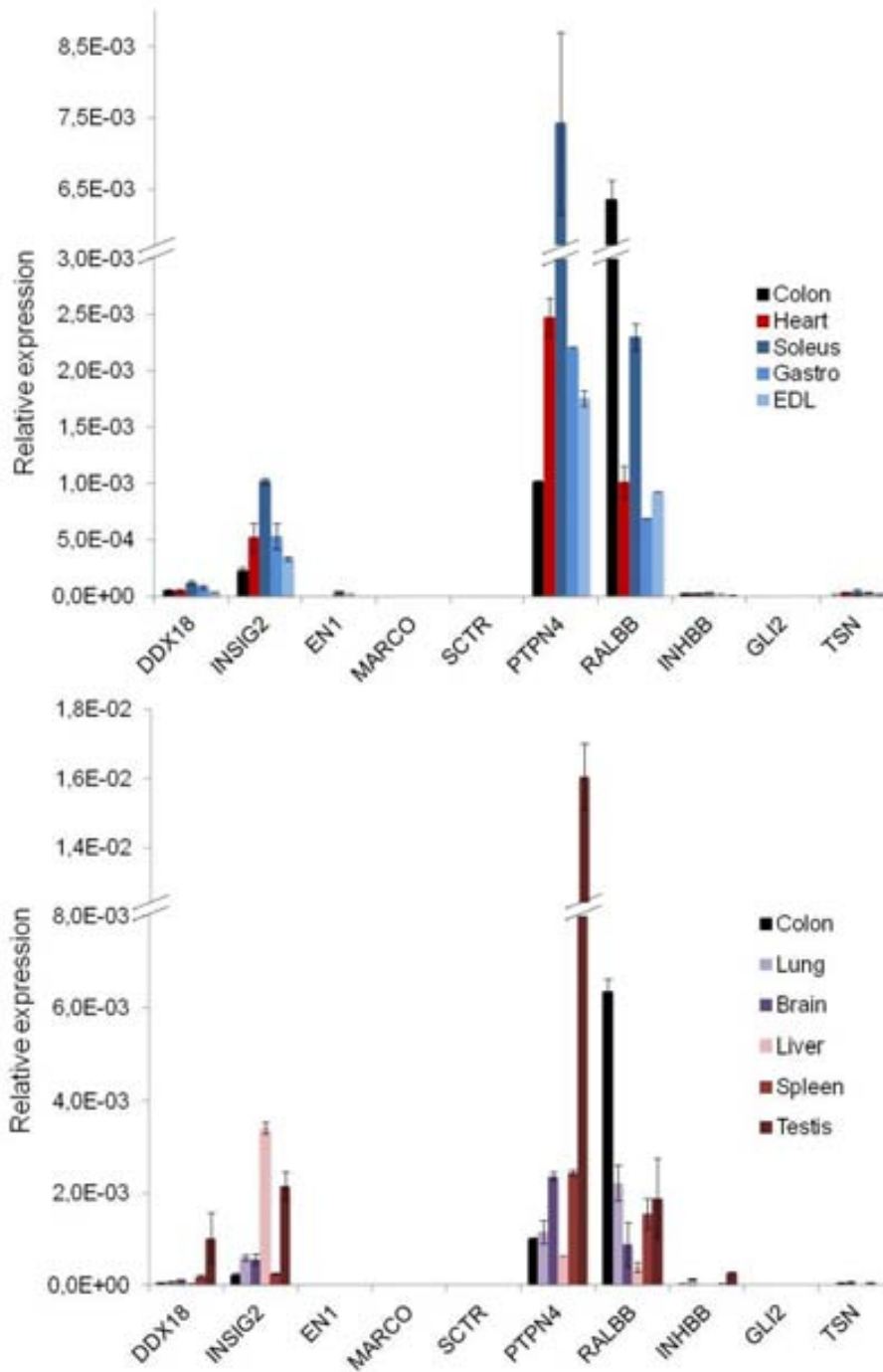


Figura R16. Expressió gènica en diferents teixits de ratolins sans al llarg de la regió 1qE2.3.

2.2.2 Perfils d'expressió i estat de metilació del DNA.

L'anàlisi de la metilació del DNA i l'expressió gènica van confirmar patrons molt similars entre humans i ratolins tant en teixit normal com en línies de càncer colorectal (les humanes HCTT16 i murines CT26). En còlon de ratolins sans tots els gens analitzats es mantenen actius i desmetilats, mentre que CT26 mostrava una disminució global d'expressió en la major part dels gens localitzats en aquestes regions i la hipermetilació de determinades CpGi promotores (Fig. R17.A-D i Apèndix 3.1 i 3.2). En 1qE2.3 la infraexpressió regional anava acompanyada d'una pèrdua en H3K9ac, una modificació d'histona directament correlacionada amb l'expressió gènica (Fig. R17.E-F).

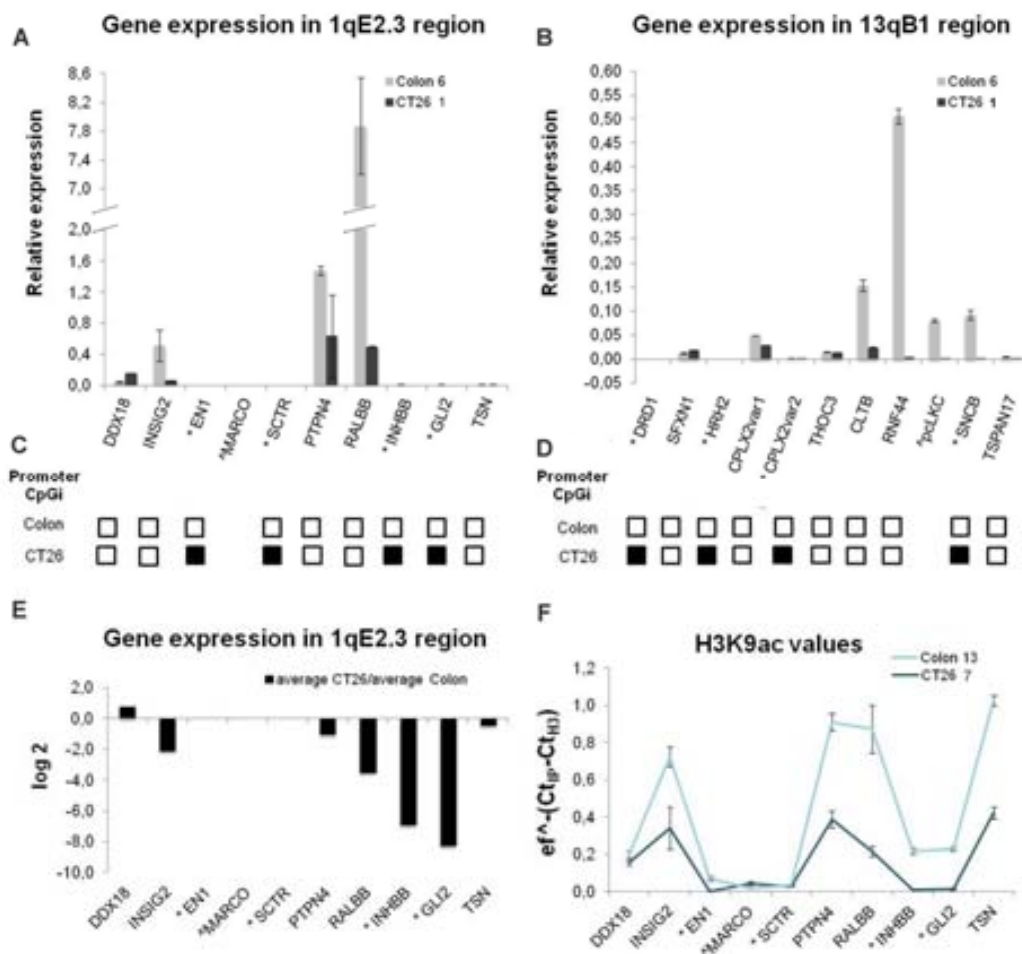


Figura R17. Valors d'expressió gènica en la regió 1qE2.3 (A) i 13qB1(B). L'estat de metilació de les CpGi promotores de cada gen està representada en C i D. Els quadrats representen la CpGi promotora: en negre CpGi metilada, en blanc CpGi no metilada. L'estat de metilació de cada dinucleòtid CpG està representat en l'Apèndix 3.1. E. Expressió relativa del promig de CT26 respecte el promig de teixits normals de còlon en la regió 1qE2.3. Els valors per cada mostra estan representats en l'Apèndix 3.2. F. Valors d'H3K9ac en la regió 1qE2.3. Els gens del primer grup (poc actius) estan marcats amb * i els del tercer grup (no CpGi) amb ^.

Els gens englobats en aquestes regions podien ser classificats en tres grups diferents d'acord als nivells d'expressió gènica i l'estat de metilació de la seva regió promotora. El primer grup consistia en gens silenciats i amb la CpGi promotora hipermetilada en CT26, que estaven poc expressats en teixit normal, gens poc actius: *En1*, *Sctr*, *Inh-β_B*, *Gli2* (1qE2.3), *Hrh2*, *Cplx2 variant 2*, *Sncb* i *Drd1* (13qB1). El segon grup estava compost per gens amb CpGi promotora desmetilada en teixits normals i tumorals i que s'expressaven a alts nivells en teixit normal però que la reduïen en la línia de càncer colorectal, gens actius: *Ddx18*, *Insig2*, *Ptpn4*, *Ralbb*, *Tsn* (1qE2.3), *Sfxn1*, *Cplx2 variant 1*, *Thoc3*, *Cltb*, *Rnf44* i *Tspan17* (13qB1). Un tercer grup incloïa els gens que no tenien CpGi promotora i estaven poc expressats o silenciats tant en mostres normals com tumorals, gens sense CpGi: *Marco* (1qE2.3) i *pcLKC* (13qB1). És important destacar que aquesta classificació es correspon a la que s'ha caracteritzat en teixits normals i de càncer colorectal humans descrita en (Mayor et al., 2011). Així doncs, es confirma que el comportament epigenètic de tota la regió en el model de ratolí és representatiu del que observem en humans, fet que avala la conservació evolutiva del bloc i el manteniment de la funcionalitat de LRES en càncer.

2.2.3 Dominis bivalents de cromatina.

Com ja s'ha explicat a la introducció (apartat 5), en els últims anys diversos estudis han posat de manifest que la major part dels gens que s'hipermetilen en càncer presenten dominis bivalents en SC, és a dir presenten simultàniament marques de cromatina activa (H3K4me3) i inactiva (H3K27me3). Els gens classificats com poc actius i sense CpGi (primer i tercer grup) es caracteritzaven per la presència de la marca repressiva H3K27me3 i l'activa H3K4me3 en el teixit de ratolins sans (còlon i intestí prim, Fig. R18.A), pel que es consideraven bivalents. D'altra banda, els gens actius (pertanyents al segon grup) només tenien marques d'histones actives (H3K4me3 i H3K9ac) en les regions promotores i per tant no es consideraven bivalents, fet que concordava amb l'absència d'hipermetilació de la CpGi corresponent i el manteniment de l'expressió gènica malgrat que els seus nivells d'expressió estaven disminuïts en la línia tumoral.

És important destacar que la detecció per ChIP de dues marques sobre la mateixa regió no demostra la coexistència, ja que es podria tractar de diferents poblacions cel·lulars amb perfils epigenètics diferents. És per això, que es va verificar l'existència dels dominis bivalents en l'intestí prim mitjançant reChIP. Els valors d'histones obtinguts estan representats en la Figura R18.B, normalitzant respecte l'*input* de la segona immunoprecipitació. Per tal d'avaluar que la cromatina obtinguda en la primera immunoprecipitació s'havia eluït correctament i que la segona immunoprecipitació funcionava, en la segona immunoprecipitació es van utilitzar els anticossos contra H3 (control positiu) i IgG (control negatiu). Tal i com es pot apreciar en la Figura R18.B, els valors obtinguts van ser superiors i més clars en els teixits immunoprecipitats primer contra H3K27me3, enlloc d'H3K4me3. Tot i això, en totes les condicions es va poder

Resultats

confirmar la presència de dominis bivalents (H3K4me3+H3K27me3 en groc i H3K27me3+H3K4me3 en taronja) en tots els gens analitzats, excepte en *pcLKC*, en que els nivells de H3K27me3+H3K4me3 eren similars al control negatiu (H3K27me3+IgG).

Tot i que la major part d'aquests gens tenien la CpGi promotora hipermetilada en CT26, els dominis bivalents es mantenien, és a dir, conservaven també la marca activa H3K4me3 (també observat en HCT116). En la Figura R18.A s'observa que els nivells d'ambdues marques d'histones eren inferiors als de teixit normal, fet que va dificultar la detecció mitjançant el protocol estàndard de reChIP. És per això, que els dominis bivalents en CT26 es van analitzar realitzant reChIP amb *beads* magnètiques (*Low Cell CHIP Kit*). Els resultats obtinguts fent la primera immunoprecipitació contra H3K27me3 estan representats en la Figura R18.C, mentre que no hi va haver detecció immunoprecipitant primer contra la marca activa H3K4me3. En els gens en els que s'havia descrit la presència de dominis bivalents en teixit normal (determinat per CHIP o reChIP), es va corroborar el manteniment d'aquests dominis bivalents (H3K27me3+H3K4me3 en taronja) en CT26, excepte en *Inh-β_B* que no va ser analitzat per falta del material.

En conclusió, hem demostrat per primera vegada, que en ratolí gens que s'hipermetilen en càncer de còlon i que es localitzen dins de LRES presenten dominis bivalents en cèl·lules normals d'intestí prim i cèl·lules canceroses.

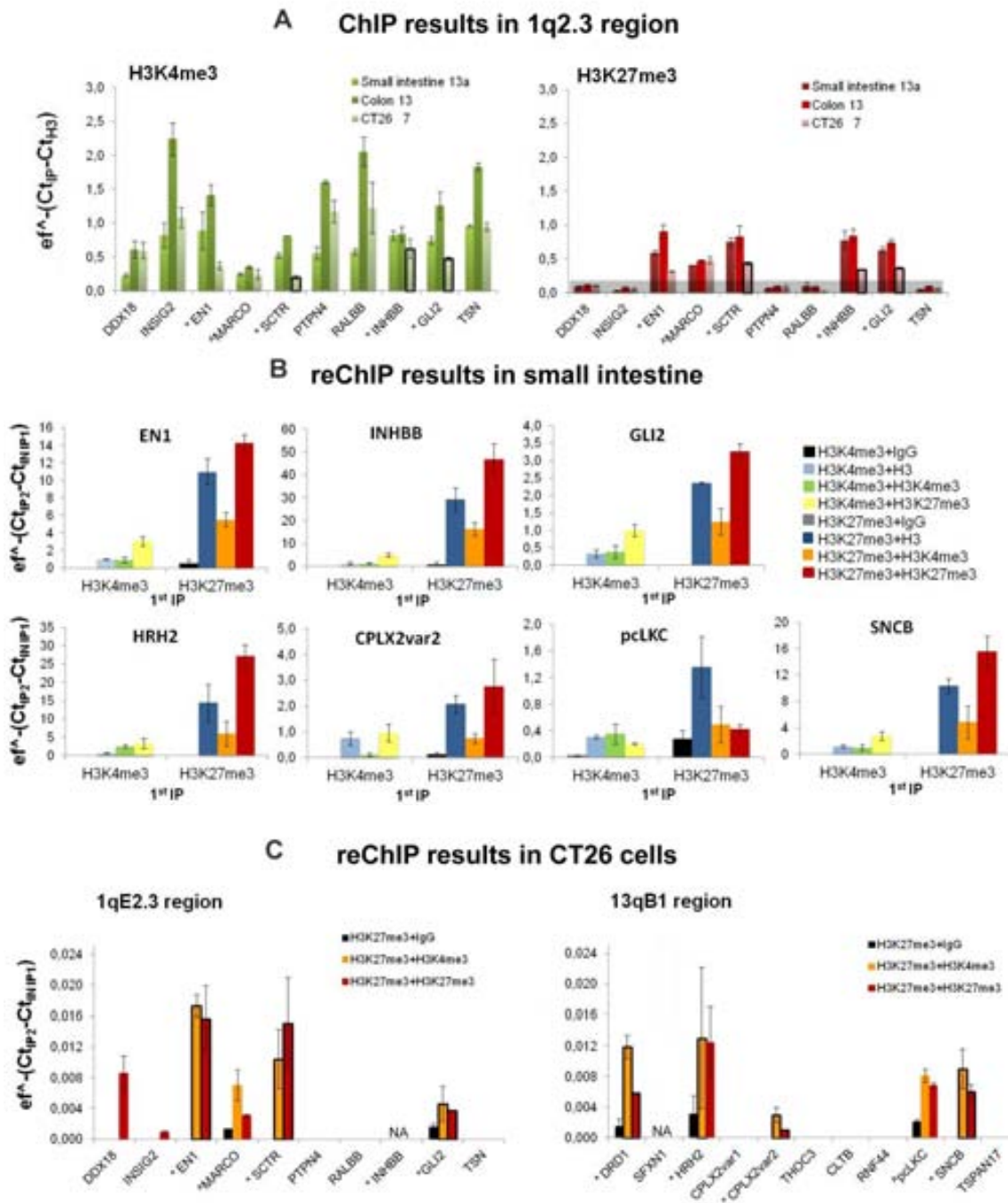


Figura R18. **A.** Valors d'H3K4me3 i H3K27me3 en les regions promotores dels gens pertanyents a la regió 1qE2.3 en intestí prim, còlon i CT26. Les barres amb el contorn negre indiquen les CpGi promotores hipermetilades. En gris s'indiquen els valors d'H3K27me3 considerats soroll. **B.** Resultats de reChIP en teixit normal per diferents gens: *En1*, *Inh-β_B*, *Gli2* (1qE2.3), *Hrh2*, *Cplx2 variant 2*, *pcLKC* i *Sncb* (13qB1). **C.** ReChIP en CT26 utilitzant H3K27me3 en la primera immunoprecipitació i *beads* magnètiques per tal de determinar els dominis bivalents en les regions 1q2.3 i 13qB1. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^ . NA= no analitzat.

2.2.4 Heterocromatització en la regió 1qE2.3.

A més d'H3K27me3 es van analitzar altres marques d'inactivació (H3K9me2 i H3K9me3) en la regió 1qE2.3 (Fig. R19.A-B). En la línia CT26 s'observà un guany d'H3K9me2 en els gens amb la CpGi promotora metilada. D'altra banda els nivells es van mantenir elevats en *Marco*, que estava silenciada tant en cèl·lules normals com en CT26. Per últim, els valors d'H3K9me3 també es van incrementar en alguns dels gens que tenien el DNA hipermetilat: *En1*, *Sctr* i *Gli2*.

La presència de H3K27me3, mostrada en l'apartat anterior, indica la participació de components del sistema *Polycomb* en el silenciament dels gens amb promotor metilat. Per determinar la implicació d'aquests complexos es van estudiar algunes proteïnes pertanyents als diferents complexos *Polycomb*. Si bé es va observar un augment en EZH2 en els gens on hi havia metilació del DNA (Fig. R19.C), d'altres proteïnes com BMI1 i RING (pertanyents al PRC1) no es van poder detectar.

Així doncs, tal i com es podia esperar, la metilació del DNA s'associava a un augment en marques d'histona inactives com H3K9me2 i H3K9me3. Tot i que hi havia una disminució dels nivells d'H3K27me3 en els gens amb la CpGi metilada, en aquests s'observà un augment d'EZH2 i per tant una implicació del sistema *Polycomb*.

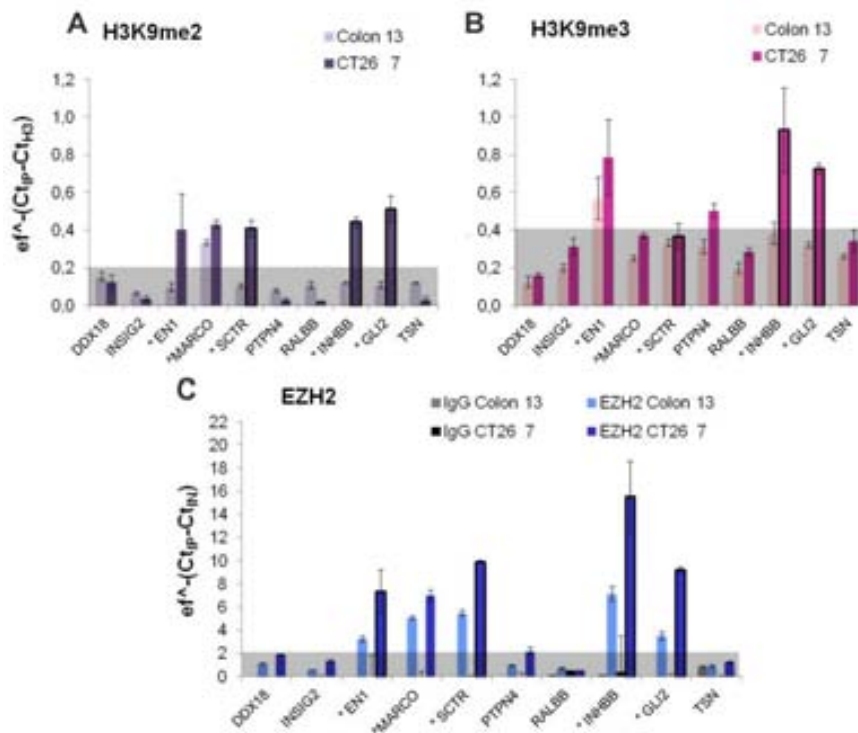


Figura R19. Marques d'histones inactives en la regió 1qE2.3: H3K9me2 (A) i H3K9me3 (B). Els valors per EZH2 també estan representats (C). Les barres amb el contorn negre indiquen els gens amb les CpGi promotores hipermetilades. L'àrea gris marca el nivell que es considera soroll. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^.

2.2.5 Barreres físiques de la cromatina en la regió 1qE2.3.

Per tal d'estudiar la distribució de barreres físiques dins la regió es van analitzar els valors de CTCF en còlon i CT26. Es van estudiar alguns dels llocs d'unió a CTCF de la regió 1qE2.3 que estaven predits en base a anàlisis bioinformàtics ((Kim et al., 2007) i *Insulator Data Base University of Tennessee Health Science Center*). En la major part dels casos es va confirmar la presència de CTCF (barres marrons, Fig. R20) en aquestes regions, que era superior al control negatiu (IgG) i a les de les regions de control (no predites bioinformàticament com llocs d'unió de CTCF, barres verdes).

Exceptuant la regió PRE 7752 i 7755, els nivells de CTCF eren més elevats en teixit normal que en les cèl·lules CT26. En PRE 7750 hi havia més CTCF en la regió control (barres verdes) que en el lloc d'unió predit (barres marrons), però cal tenir en compte que el CTCF és només hipotèticament absent en aquestes regions control. En el seu conjunt, aquests resultats suggerien que el silenciament de la regió anava acompanyat d'una pèrdua de les barreres físiques de la cromatina. Tot i això, caldria determinar la quantitat global de CTCF en còlon i CT26 i caracteritzar els perfils de CTCF en tota la regió per poder extreure conclusions sòlides.

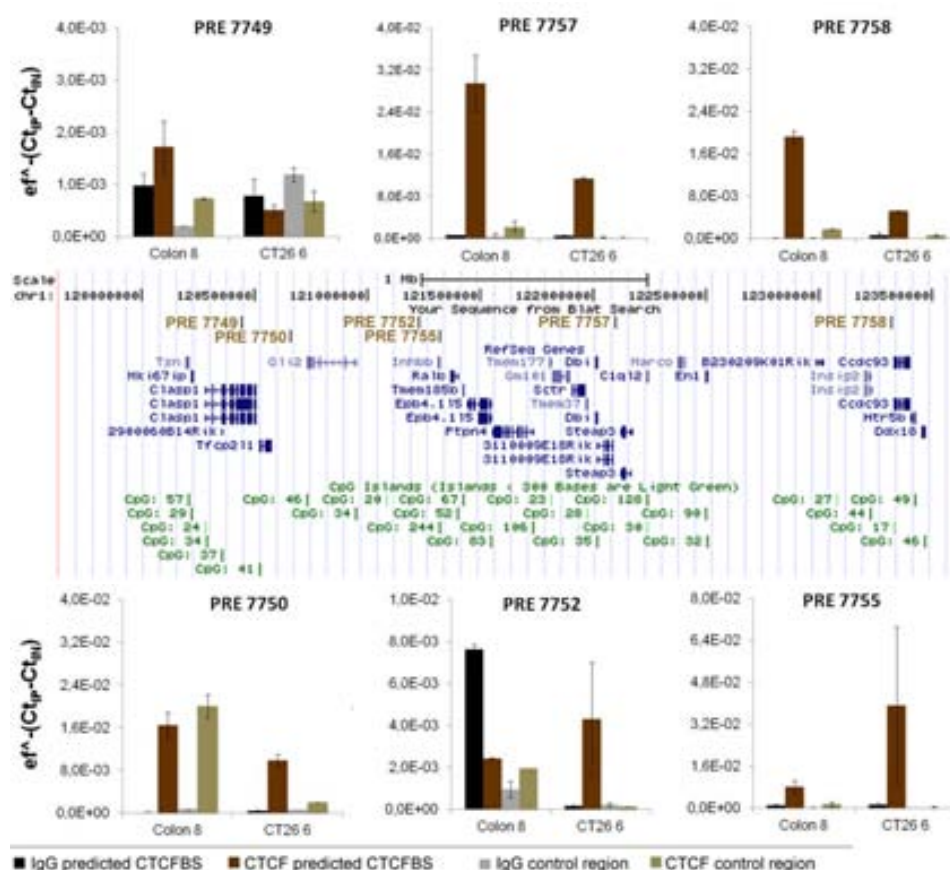


Figura R20. Imatge de la regió 1qE2.3 en ratolí obtinguda de l'*UCSC Genome Browser*. (NCBI37/mm9). La localització dels CTCFBS predits estan anotats en "Your Sequence from *Blat Search*". Els resultats de ChIP en còlon i CT26 estan graficats, incloent els valors controls. CTCFBS = llocs d'unió de CTCF.

En resum, el silenciament de les regions 1qE2.3 i 13qB1 en la línia de càncer colorectal CT26 demostra que el LRES és un fenomen que també es produeix en cèl·lules tumorals de ratolí. Aquest silenciament presenta característiques pràcticament idèntiques a les observades en la línia de càncer colorectal humana HCT116. A més, s'ha demostrat de forma clara la presència de dominis bivalent en els gens que es metilen en càncer i que aquesta bivalència ja està present en les cèl·lules normals. Aquesta hipermetilació del DNA s'associa a guanys en la marca inactiva H3K9me3 i en EZH2. Finalment, s'ha detectat una correlació positiva entre la disminució d'expressió i els nivells de CTCF en la regió, suggerint que el LRES també va associat a la pèrdua al menys parcial de les barreres físiques de la cromatina.

2.3 Perfil epigenètic en la diferenciació epitelial.

Per tal d'aprofundir en la caracterització epigenètica i funcional de les regions que patien LRES es va considerar interessant estudiar l'estat de les regions durant la diferenciació epitelial de l'intestí prim. Amb aquest abordatge es pretenia entendre millor la regulació i funció de la regió i els gens compresos en condicions normals, al mateix temps que es determinava el comportament d'aquestes durant la diferenciació, un procés que també està alterat en la progressió tumoral.

Així doncs, es va utilitzar una disgregació mecànica i química per tal obtenir dues fraccions cel·lulars enriquides en: cèl·lules de la cripta de ratolins (contenen les cèl·lules progenitores) i les cèl·lules del *villi* (cèl·lules diferenciades). A més, es van estudiar les cèl·lules que presenten diferents nivells de diferenciació al llarg de la cripta, seleccionant en base als nivells d'expressió del marcador extracel·lular EphB2 mitjançant citometria de flux: cèl·lules progenitores (EphB2^{high}, *high*), en diferenciació (EphB2^{medium}, *medium*; i EphB2^{low}, *low*) i diferenciades (EphB2^{negative}, *negative*).

En l'estudi de la metilació per seqüenciació amb bisulfit no s'observà cap canvi en CpGi susceptibles a metilarse (d'acord amb les observacions fetes en línies cel·lulars), que romangueren desmetilades en totes les mostres analitzades. La major part dels gens expressats a alts nivells (gens actius) van tendir a estar menys expressats en *villi* (Fig. R21), mentre que els poc actius i sense CpGi van restar invariables durant la diferenciació, exceptuant *Cplx2* i *pLKC*. Tal i com s'ha descrit prèviament, hi ha dues variants descrites per *Cplx2* que presentaren un perfil d'expressió oposat al llarg de la diferenciació: la variant 1 estava més expressada en cèl·lules progenitores, mentre que la variant 2 (poc expressada) estava infraexpressada en les cèl·lules diferenciades. A més, el gen *pLKC*, que codifica per una protocadherina, estava silenciada en les cèl·lules progenitores i augmentava la seva expressió durant la diferenciació. Aquestes dades obren la porta a hipotetitzar la participació d'aquests gens en el procés de diferenciació.

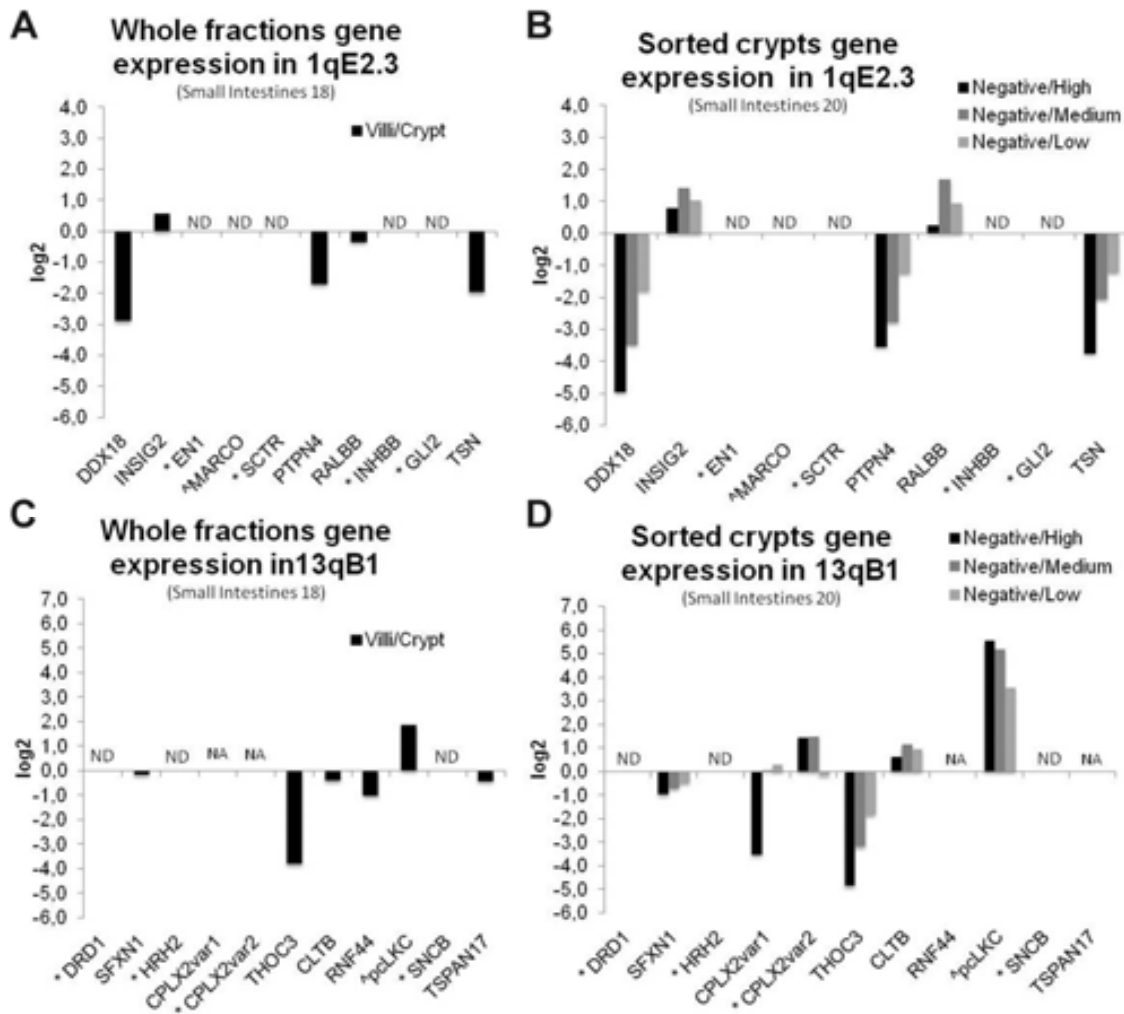


Figura R21. Expressió gènica dels gens de la regió 1qE2.3 (A) i 13qB1 (C) en les cèl·lules diferenciades (*villi*) respecte les de la cripta. En els panells B i D, l'expressió de les cèl·lules diferenciades (*negative*) respecte les cèl·lules en procés de diferenciació (*medium*, *low*) i les cèl·lules progenitores (*high*). Els valors normalitzats per aquestes mostres i d'altres fraccions obtingudes estan representats en l'Apèndix 3.2. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^. NA= no analitzat. ND= no detectat.

Tal i com es mostra en la Figura R.22, els patrons de cromatina de les cèl·lules de la cripta i les del *villi* eren similars, alhora que reproduïen el perfil observat en còlon: els gens expressats presentaven marques actives (H3K9ac i H3K4me2) i els gens poc expressats estaven caracteritzats pels dominis bivalents en les regions promotores. Es pot observar que en alguns gens, com el *Ptpn4* i *Thoc3*, l'augment d'expressió descrit s'associava a un increment en H3K4me2, com caldria esperar.

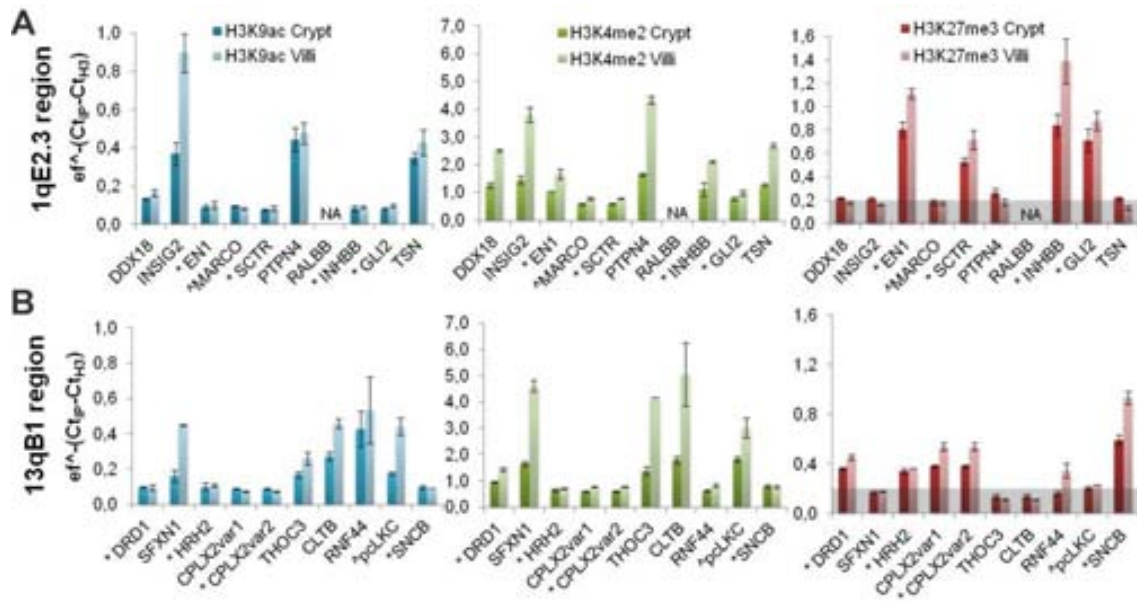


Figura R22. Valors de CHIP per la fracció de la cripta i el villi en 1qE2.3 (A) i 13qB1 (B). Es representen els valors obtinguts per H3K9ac, H3K4me2 i H3K27me3 respecte el total d'Histona H3. En gris s'indiquen els valors de H3K27me3 considerats soroll. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^. NA=no analitzat.

A més, es van analitzar les marques d'histones de la regió 13qB1 en cèl·lules amb diferent grau de diferenciació dins la cripta. Tal i com es pot observar en la Figura R.23, el nivell de soroll del CHIP (valors IgG, control negatiu) era molt elevat degut al baix nombre de cèl·lules que es van utilitzar en l'assaig. Els valors d'H3K4me2 i H3K27me3 es van mantenir constants al llarg de la diferenciació excepte en *Cplx2 variant1*, l'expressió del qual disminuïa i això es traduïa en una pèrdua d'H3K4me2 i un augment d'H3K27me3. A més, les cèl·lules progenitores presentaven un augment de marca inactiva H3K9me3 en *Hrh2*, *Sncb* i *pcLKC*, essent corresponent al perfil d'expressió en *pcLKC*. Tot i que *Cplx2 variant 2* estava més expressat en cèl·lules diferenciades, un augment en H3K9me3 es va observar en aquesta fracció cel·lular.

Així doncs, els gens de les regions 1qE2.3 i 13qB1 no es regulen de forma coordinada durant la diferenciació intestinal, presentant canvis específics, si bé els perfils d'expressió (definites en base als tres grups de gens) es mantenen i els gens actius tendeixen disminuir l'expressió en les cèl·lules diferenciades. D'altra banda, *Cplx2 variant 2* i *pcLKC* es sobreexpressen al llarg de la diferenciació. La major part dels canvis d'expressió van acompanyats de variacions en les marques d'histones concordants amb els canvis d'activitat observats.

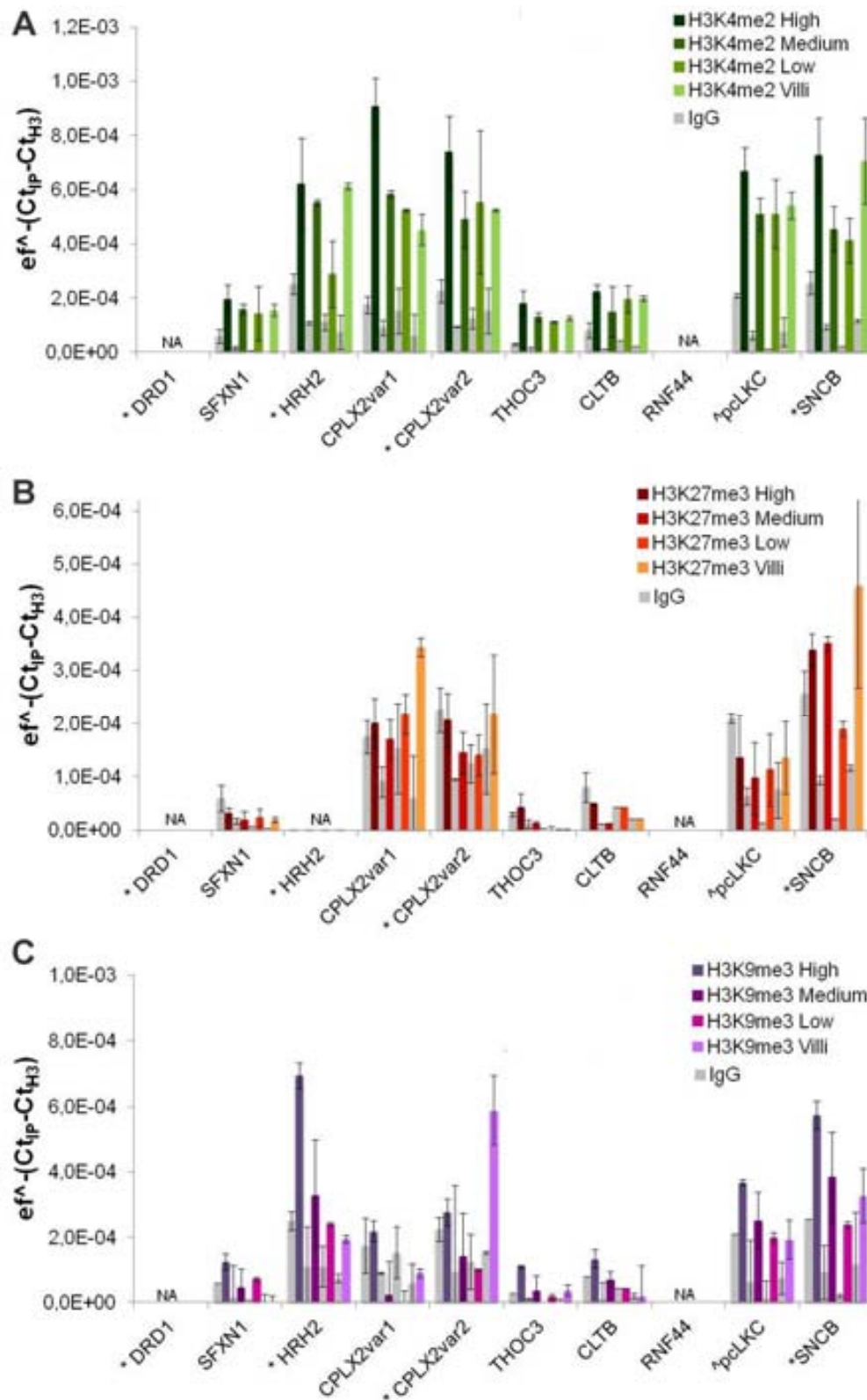


Figura R23. Valors d'H3K4me2 (A), H3K27me3 (B) i H3K9me3 (C) pels gens de la regió 13qB1 en les diferents cèl·lules de la cripta i *villi*. Els valors del control negatiu (IgG) estan representats en color gris a l'esquerra del valor obtingut per la marca d'histona en cada tipus cel·lular. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^ . NA=no analitzat.

2.4 Perfil epigenètic en estadis inicials del procés tumoral.

El LRES és un mecanisme de silenciament associat a estadis avançats de la progressió tumoral. Per limitacions tècniques i ètiques obvies, és difícil estudiar l'estat de les regions regulades mitjançant LRES en estadis inicials del progrés tumoral en humans, el que és imprescindible per tal d'entendre la natura i les implicacions del procés. La conservació d'aquest mecanisme en ratolí facilita l'estudi en estadis primerencs. En concret, ens vam centrar en analitzar els perfils epigenètics de les regions 1qE2.3 i 13qB1 en adenomes macroscòpics d'*Apc^{min/+}* i el corresponent teixit adjacent, alhora que s'analitzava l'intestí prim de ratolins sans.

Les GpGi estaven desmetilades en els adenomes i el teixit adjacent, de forma similar al teixit sa de ratolí (Apèndix 3.1). La major part dels gens estaven sobreexpressats en els adenomes, si bé el fenomen no va ser general. (Fig. R24 i Apèndix 3.2). Els gens poc actius i sense CpGi presentaven un patró variable d'expressió: *Marco*, *En1* i *Drd1* romanien poc expressats; *Inh-β_B* estava més expressat en adenomes; *pLKC* es silenciava en adenomes; i *Sctr*, *Gli2*, *Cplx2 variant 2*, *Hrh2* i *Sncb* es mantenien poc expressats tot i que l'expressió variava en els diferents adenomes.

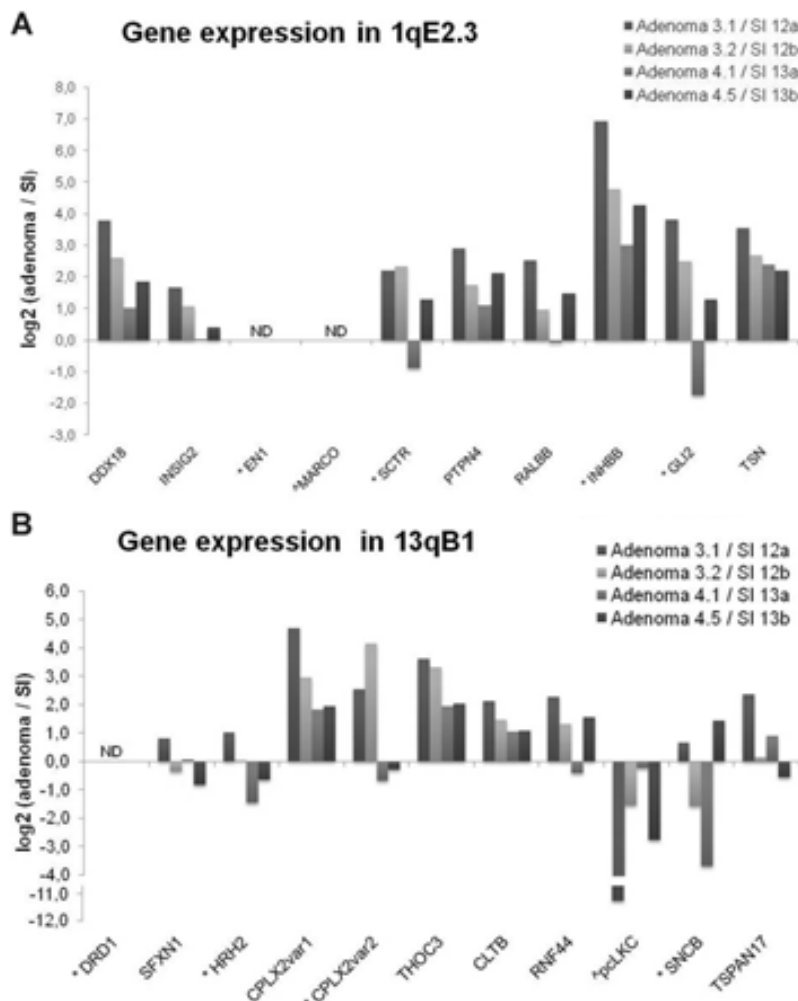


Figura R24. Valors d'expressió en la regió 1qE2.3 (A) i 13qB1 (B) dels adenomes respecte l'intestí prim (SI). Els valors normalitzats estan representats en l'Apèndix 3.2. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^.

ND = no detectat.

Diferents marques d'histones es van estudiar en les regions promotores dels gens mitjançant assajos d'immunoprecipitació de cromatina. Cal tenir en compte que es va realitzar ChIP de teixits conservats en diferents condicions (teixit fresc, congelat a -80°C , conservat en OCT). En l'Apèndix 3.3 es mostra àmpliament els resultats obtinguts en les proves que es van fer per comparar les diferents situacions experimentals, conclouent que el més important alhora d'interpretar els resultats de ChIP és que les diferents mostres s'hagin processat igual.

L'estat de la cromatina era similar en les mostres de ratolins *Apc^{min/+}* i ratolins sans, com es mostra en la Figura R25 per la regió 1qE2.3 (gens de la regió 13qB1 en Apèndix 3.4). Es pot observar que els gens classificats com actius tenien marques d'histona associades a activació (H3K9ac i H3K4me3) i els gens poc actius i sense CpGi presentaven dominis bivalents en les regions promotores. En aquests gens la presència d'H3K27me3 anava acompanyada per la detecció d'EZH2, mantenint uns nivells constants de proteïna en les diferents mostres. Els nivells d'altres marques associades a repressió (H3K9me2/3) eren molt baixos al llarg de la regió, com caldria esperar (valors no mostrats).

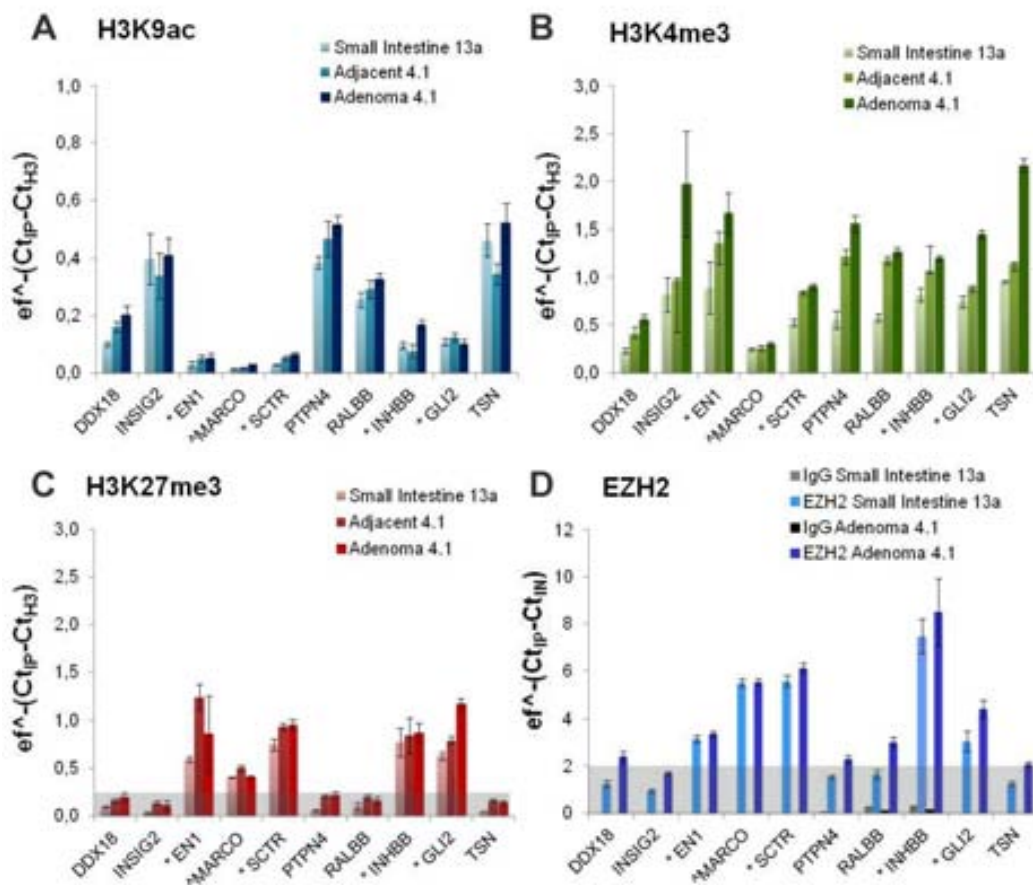


Figura R25. Valors de ChIP per la regió 1qE2.3 en intestí prim de ratolins sans i en teixit de ratolins *Apc^{min/+}*: H3K9ac (A), H3K4me3 (B), H3K27me3 (C), EZH2 i IgG (D). En gris s'indiquen els valors considerats soroll. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^.

Resultats

En resum, no es dona LRES en adenomes de ratolí $Apc^{min/+}$, sinó que els gens tendeixen a estar més expressats en aquestes mostres. Les marques d'histones de les regions promotores i els nivells d'EZH2 es mantenen constants en les diferents mostres, com també l'estat de metilació de les CpGi, que resten desmetilades. Aquest resultat indicaria que, en aquest model en concret, el LRES no és un fenomen inicial i que més probablement es donaria en fases més avançades.

3. Activina B (Inh- β_B) en càncer intestinal.

El gen INH- β_B d'humans es localitza en la regió 2q14.2, regulada mitjançant LRES en CRC. Aquest gen junt amb INH- β_A i INH- α , codifiquen per un grup de citoquines (Activines i Inhibines) pertanyents a la família TGF- β . En humans, l'INH- β_B té la CpGi promotora desmetilada en còlon normal i adenomes, mentre que està hipermetilada en el 25% dels carcinomes colorectals. A més, els pacients amb l'INH- β_B hipermetilat en tumors presenten una supervivència significativament menor (Mayor et al., 2009).

En ratolí, el gen *Inh- β_B* s'expressava poc en còlon i intestí prim de ratolins sans, mentre que es silenciava totalment en CT26, tenint la CpGi promotora totalment metilada (Fig. R26.B), tal i com s'observa en tumors colorectals avançats en humans. Tot i això, *Inh- β_B* estava sobreexpressat en adenomes de ratolins *Apc^{min/+}*. Aquest guany d'expressió es va detectar tant per PCR a temps real (Fig. R26A) com en els *arrays* d'expressió. Analitzant l'estat d'expressió de les altres dues isoformes de la família es va observar que la isoforma *Inh- α* estava molt poc expressada, suggerint que la major part d'*Inh- β_A* i *Inh- β_B* estaven constituint Activines (Activina A, Activina B i/o Activina AB) (veure Fig. i20).

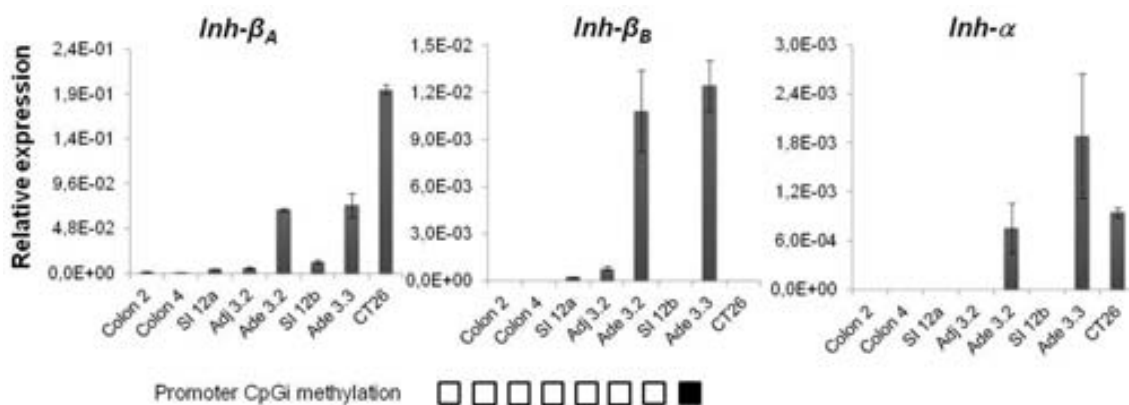


Figura R26. A. Expressió de les tres isoformes d'INH en mostres de ratolí (SI= intestí prim; Adj= teixit adjacent a l'adenoma; Ade= adenoma). **B.** Els quadrats representen l'estat de metilació de la CpGi promotora d'*Inh- β_B* : en negre CpGi metilada i en blanc CpGi no metilada. L'estat de metilació de cada dinucleòtid CpG està representat en l'Apèndix 3.1.

Aquests resultats junt amb les dades d'altres estudis en els que s'assenyala que el desequilibri entre les diferents activines i inhibines pot resultar en alteracions de l'activitat cel·lular (apartat 6 d'introducció), van promoure l'estudi d'aquestes citoquines i els receptors implicats en la seva senyalització tant en mostres murines com humanes. Així doncs, es va analitzar l'expressió i metilació de les isoformes en un panell de línies colorectals humanes (Fig. R27.C-D), observant que INH- β_B estava silenciada en les línies cel·lulars més agressives (HCT116, HT29) però s'expressa en SW480, SKCO1 i CaCo2. A més, cal recordar que l'expressió de l'INH- β_B

disminuïa en la diferenciació de les CaCo2 a cèl·lules amb propietats d'enteròcit (Fig. R10). L'Activina B es va detectar en el sobrenedant de les cèl·lules SW480, però no en el total de proteïna cel·lular. En CaCo2 no es va detectar la proteïna en el sobrenedant en concordança amb la baixa expressió del gen en aquesta línia cel·lular (Fig. R27.E).

A més, en les parelles de teixit normal-tumor humanes analitzades (Fig. R27.A) el gen INH- β_A estava més expressat en les mostres tumorals, tal i com està descrit (Takeno et al., 2008) i la CpGi promotora de l'INH- β_B estava desmetilada en tumors, essent més expressada que en mostres normals. Es va incloure placenta humana com a control positiu, ja que està descrit que ambdós isoformes s'expressen en aquest teixit.

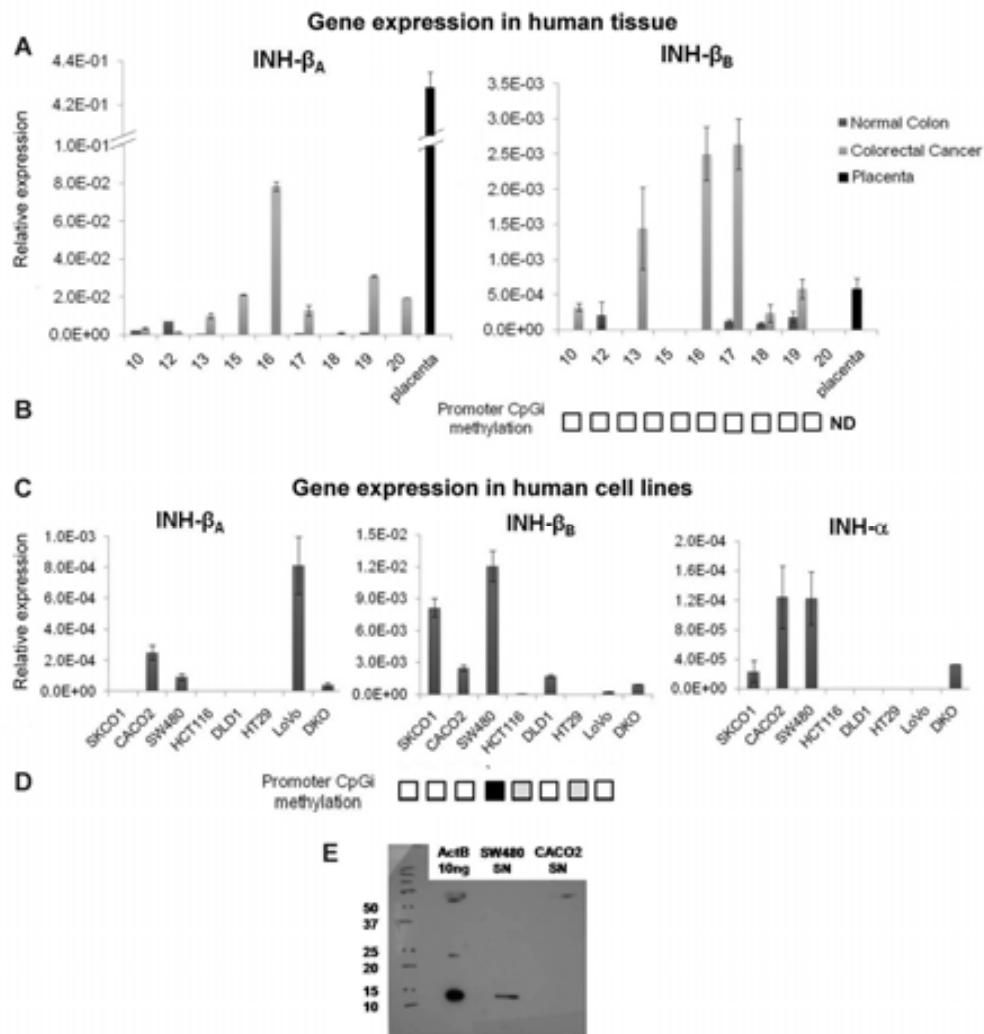


Figura R27. Expressió de les isoformes d'INH en: (A) mostres humanes, el nombre correspon al identificador de la parella normal-tumor; (C) línies cel·lulars humanes. La metilació del DNA de la CpGi promotora d'INH- β_B està representada en, teixit d'humà (B) i les línies cel·lulars humanes (D). Els quadrats representen l'estat de metilació de la CpGi promotora: en negre CpGi metilada, en gris parcialment metilada i en blanc CpGi no metilada. E. Western blot contra Activina B en el sobrenedant de SW480 i CaCo2 (la proteïna recombinant, ActB, també es va incloure com a control positiu).

L'expressió dels gens que constitueixen el complex receptor per la transducció de senyal de les Activines es va determinar en les mostres humanes i murines (Apèndix 4). Breument, els patrons d'expressió eren similars en els diferents teixits de ratolí (intestí prim de ratolí sa i adenomes d'*Apc^{min/+}*), mentre que l'expressió era variable per cada isoforma en cada parella normal-tumor humana. Aquesta diversitat també es va observar en les línies cel·lulars, per exemple la CpGi promotora d'ACRV2A estava metilada en HCT116 i DLD1 i tres de les cinc isoformes dels receptors (*Acrv1b*, *Acrv1c* i *Acrv2a*) estaven silenciats en la línia cel·lular murina CT26.

Aquests resultats es poden interpretar com que l'Activina B podria dur a terme diferents funcions en estadis inicials i avançats del procés tumoral. Per tal d'elucidar aquesta qüestió es van realitzar estudis funcionals *in vitro* silenciant de forma transitòria el gen *INH-β_B* en les cèl·lules SW480. Aquest silenciament es va validar a nivell d'RNA i proteïna (Fig. R28).

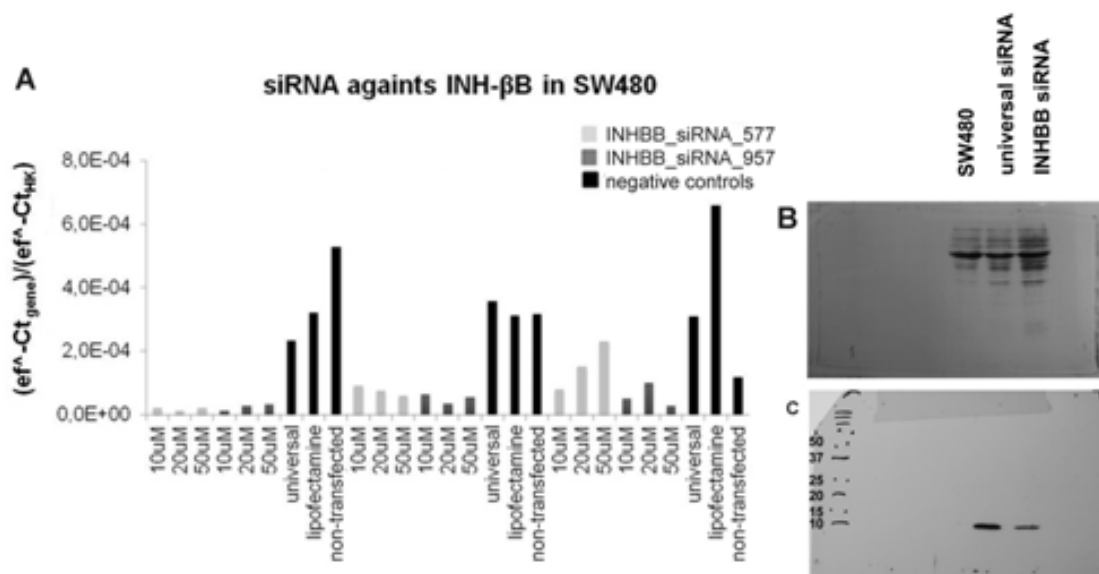


Figura R28. El silenciament transitori d'INH-β_B es va confirmar a nivell d'RNA (A) i proteïna: el gel d'acrilamida es va utilitzar com a control de càrrega (B) del *western blot* contra Activina B (C). Com a controls negatius de la transfecció es van incloure: cèl·lules no transfectades, cèl·lules transfectades només amb lipofectamina i cèl·lules transfectades amb el siRNA universal.

L'activitat cel·lular es va determinar mitjançant l'assaig MTT i XTT en cèl·lules SW480 neutralitzant l'Activina B secretada per la cèl·lula amb un anticòs específic contra aquesta o addicionant la proteïna recombinant. L'assaig també es va dur a terme en SW480 amb l'INH-β_B silenciats de forma transitòria. L'activitat cel·lular es va mantenir constant en totes aquestes condicions experimentals, tal i com es pot observar en la Figura R29 per les SW480 amb l'INH-β_B silenciats.

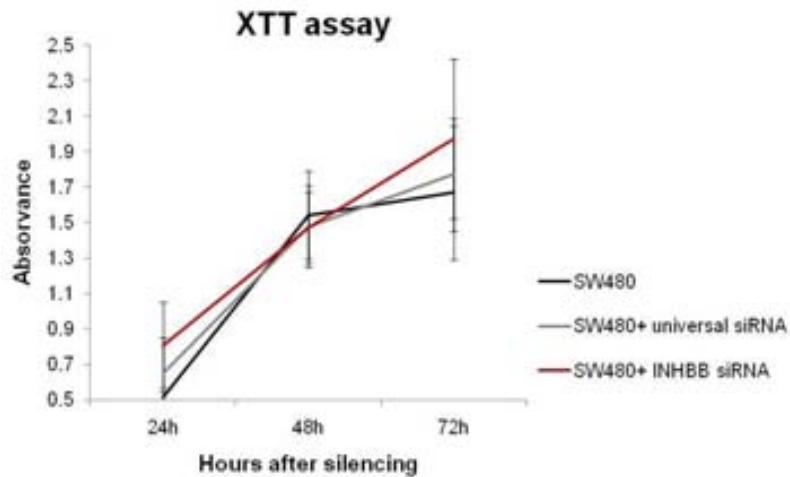


Figura R29. Assajos XTT realitzats a les 24, 48 i 72 hores després de transfectar l'siRNA control i l'siRNA contra INH- β_B .

Per tal d'estudiar el paper d'INH- β_B en la migració cel·lular, es va realitzar un assaig de migració en SW480 amb l'INH- β_B silenciats de forma transitòria i cèl·lules transfectades amb el siRNA universal (control negatiu). Igual que en l'assaig anterior, també es va neutralitzar l'Activina B mitjançant l'addició d'anticòs contra aquesta proteïna en el medi. En la Figura R30 s'observa que les cèl·lules SW480 amb l'INH- β_B silenciats de forma transitòria tendeixen a migrar menys que les cèl·lules control, però aquest resultat no és significatiu i caldria fer més estudis per determinar la consistència d'aquesta observació.

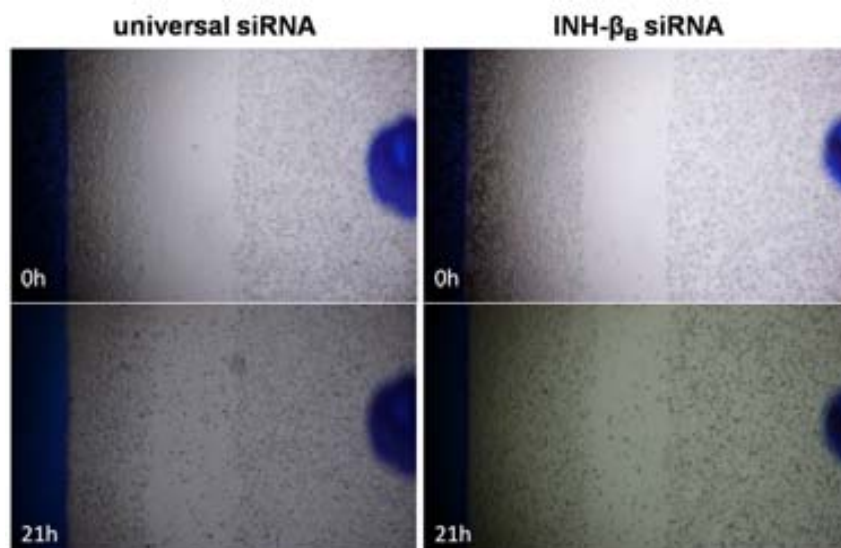


Figura R30. Assaig de migració. 24 hores després d'afegir el siRNA (universal i contra INH- β_B) es va fer la "ferida" i es fotografia l'àrea oberta a les 0h i 21h següents.

La capacitat d'invasió de les SW480 amb l'INH- β_B silenciada de forma transitòria i cèl·lules transfectades amb el siRNA universal es va determinar mitjançant la *BD Biocoat Matrigel Invasion Chamber* (Fig. R31). Tot i que les cèl·lules silenciades tendien a ser menys invasives, aquest resultat no era reproducible en tots els experiments, per la qual cosa, amb aquestes dades, no es pot concloure si el silenciament d'INH- β_B té efectes sobre l'invasivitat.

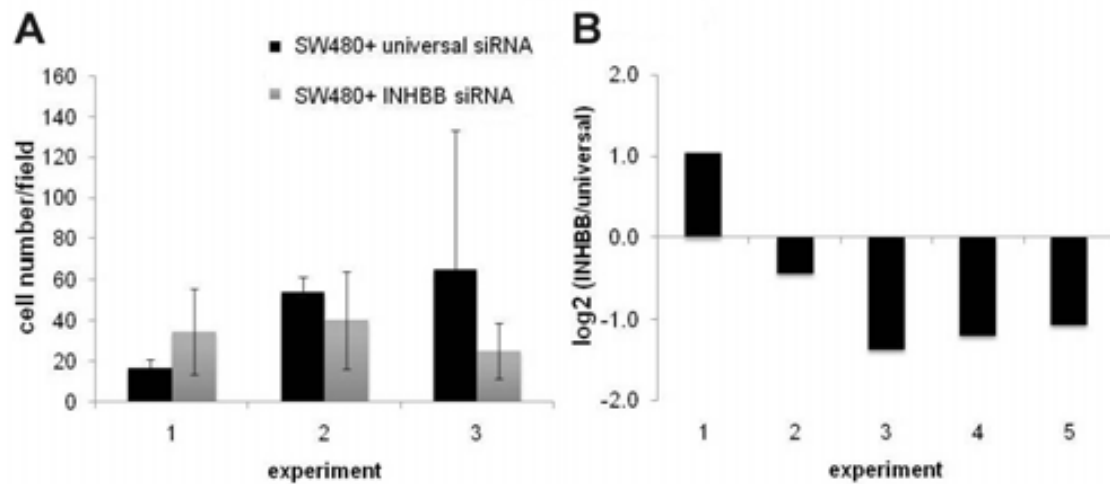


Figura R31. Assaig d'invasió en matrigel **A**. Mitjana de les cèl·lules comptades en 4 camps del *transwell*. **B**. Nombre de cèl·lules silenciades respecte cèl·lules control (s'ha considerat el nombre total de cèl·lules en el *transwell*).

En resum, l'expressió diferencial en mostres tumorals suggereix que l'Activina B pot realitzar diferents funcions al llarg de la progressió tumoral. No obstant, en el model utilitzat (línia cel·lular de càncer colorectal SW480) no ha estat possible demostrar de forma evident quins són els possibles efectes sobre la viabilitat cel·lular i la invasivitat. Altres estudis funcionals són necessaris per tal de determinar el rol de l'Activina B en el càncer colorectal, com per exemple anàlisis d'adhesió o experiments en condicions d'hipòxia i la utilització de diferents línies i models representatius dels diferents perfils moleculars que s'observen en els tumors de pacients.



DISCUSSIÓ

1. Canvis de metilació a escala genòmica.

1.1 AIMS-Seq: qüestions tècniques.

La metilació del DNA és la primera marca epigenètica descrita i una de les més estudiades, fet que ha comportat el desenvolupament d'una gran varietat de tècniques pel seu estudi a escala global (revisat en (Jorda and Peinado, 2010; Laird, 2010)). L'elecció de la tècnica està condicionada pel tipus de mostra analitzada i la finalitat del projecte a desenvolupar.

En aquest treball s'utilitzà l'AIMS-Seq per tal de determinar els canvis que es produeixen durant la diferenciació de l'intestí prim normal i en estadis primerencs de la tumorigènesi. El fet d'estar realitzant un treball exploratori ens va fer decantar per l'ús de la seqüenciació massiva enlloc de la hibridació en *microarrays* comercials o dissenyats específicament.

A més, degut a la naturalesa de les mostres, els resultats podien presentar molts paral·lelismes als descrits en els estudis de metilació en teixits sans (Irizarry et al., 2009). Per tant, l'ús dels enzims de restricció enlloc de mètodes d'enriquiment, com és el MeDip, permetia obtenir informació de CpGi amb baixes densitats CpG, així com, de les regions CpGi *shores*.

Tot i que ens vam centrar en l'estudi de les regions associades a CpGi promotores, l'AIMS-Seq permet analitzar un gran nombre d'elements repetitius (en termes absoluts) de forma individual, fet que és més complex si es treballa amb tècniques basades en la transformació química amb bisulfit. A més, l'anàlisi amb seqüenciació *shotgun* de DNA tractat amb bisulfit requereix un cost elevat si es vol tenir una bona resolució. Així doncs, encara que en el present treball no s'ha aprofundit en l'estudi de variacions de metilació en les regions repetitives, aquest és un tema de gran interès en el nostre grup i l'exploració d'aquestes dades està garantida en un futur proper.

Hi ha diferents enzims sensibles a metilació que poden ser utilitzats per tal de realitzar els estudis a escala genòmica. S'emprà l'*SmaI* i el seu neosquisòmer *XmaI* per aconseguir una reducció de la complexitat de la mostra i facilitar l'anàlisi, encara que també es podria haver plantejat l'ús de *HpaII* (CC[^]GG) i el seu isosquisòmer *MseI*, obtenint així amplicons més petits degut a que la diana de restricció és més recurrent.

Fins ara s'ha demostrat l'adequació de l'AIMS-Seq per tal d'estudiar les variacions en la metilació del DNA en aquestes mostres, però cal tenir en compte que presenta una sèrie de limitacions. Primer de tot, el DNA de partida ha d'estar íntegre i tenir bona qualitat, fet controlat en les anàlisis realitzades. Després, l'amplificació dels fragments digerits mitjançant PCR limita l'anàlisi a amplicons iguals o inferiors a 2Kb. A més, els amplicons *XmaI-XmaI* generats presenten diferents densitats de CpGs i això comporta un biaix en l'amplificació per PCR i en la seqüenciació massiva, ja que s'ha descrit que la baixa densitat de CpG en fragments 1Kb-2Kb es relaciona amb una baixa cobertura (Robinson et al., 2010), i a l'inversa. Aquests factors fan que es pugui comparar el nombre de *reads* d'un amplicó en dues mostres diferents però no es

pugui utilitzar el nombre total de *reads* de dos amplicons diferents i extreure conclusions referent al grau de metilació absolut. És més, el fet que un amplicó no tingui cap *read* no significa que la diana estigui desmetilada, la manca de *reads* pot ser deguda a la baixa eficiència de la PCR del fragment en concret i/o la baixa mapabilitat de la seqüència, entre d'altres factors. Així doncs, l'AIMS-Seq informa sobre les variacions de metilació per cada amplicó entre les mostres comparades.

Una altre factor important és l'elevada sensibilitat de l'AIMS a l'hora de detectar seqüències metilades. En (Frigola et al., 2002) es va testar la capacitat de detecció d'hipermetilacions tumorals fent un banc de dilucions de la mostra tumoral i es conclouí que la tècnica era capaç de detectar seqüències hipermetilades en <1% de cèl·lules, sent la resposta proporcional al factor de dilució. Aquesta sensibilitat es manté en AIMS-Seq i a més, la comparació de mostres amb nivells de metilació baixos i similars, fa que petits canvis de metilació representin un gran augment en el nombre de *reads*. L'elevada sensibilitat s'ha de tenir en compte al validar i interpretar els resultats. Així, les mostres d'intestí prim i còlon eren mostres heterogènies provinents de diferents individus, però la variabilitat en l'AIMS-Seq de les mostres d'intestí prim era més elevada que les mostres de còlon, que es processaren alhora. En el cas de l'intestí prim cal tenir en compte que una de les mostres es fragmentà amb un mètode diferent alhora d'obtenir la llibreria i en les altres dues mostres aquest procediment es dugué a terme en diferents moments per diferents persones. D'altra banda, en l'apartat de resultats es mostra clarament que només es poden comparar aquelles mostres que s'han processat partint de la mateixa quantitat de DNA, malgrat haver escalat les reaccions de restricció i amplificació. Aquestes variacions en el procediment limiten l'anàlisi i interpretació dels resultats.

S'ha descrit en publicacions anteriors per AIMS (Frigola et al., 2002; Paz et al., 2003; Sadikovic et al., 2004) i en dades obtingudes pel grup utilitzant AIMS-Seq (no publicades), que aquesta és una metodologia robusta alhora d'estudiar les alteracions de metilació del DNA en mostres normal-tumor, a on el nombre de canvis és gran i molts d'aquests són hipermetilacions extremes (de 0 a 100%). Els resultats obtinguts en l'anàlisi de les mostres de diferenciació i els estadis inicials de tumorigènesi confirmen la seva aplicabilitat, però en aquest tipus de mostres, donat que hi ha pocs canvis i la majoria impliquen variacions petites en el nivell de metilació, s'emfatitza la necessitat d'un disseny experimental molt curós, processant les mostres conjuntament (sobretot en la obtenció de la llibreria per la seqüenciació) i treballant amb duplicats o triplicats.

1.2 Heterogeneïtat de les mostres analitzades.

Com hem comentat, al treballar amb teixit, l'heterogeneïtat cel·lular de la mostra és un factor a tenir en compte, ja que la presència de diferents tipus cel·lulars pot emascarar diferències o atribuir variacions que són específiques d'una subpoblació minoritària de cèl·lules i que poden no representar la població que es vol estudiar. Les cèl·lules progenitores de la cripta intestinal (EphB2^{high}) i les cèl·lules diferenciades localitzades en la zona superior de la cripta (EphB2^{negative}) analitzades estaven exemptes d'aquesta problemàtica, ja que ambdues poblacions s'obtingueren mitjançant citometria de flux pel marcador extracel·lular EphB2. En aquest cas el fet de treballar amb cèl·lules provinents de diferents animals fa que les variacions observades siguin degudes al procés de diferenciació i no a l'individu.

D'altra banda, les mostres d'intestí prim i còlon d'animals sans, així com les mostres de ratolins *Apc*^{min/+} no s'enriquen per cap tipus cel·lular, fet que cal tenir en compte a l'hora d'analitzar els resultats obtinguts en l'estudi de la metilació del DNA i l'expressió global. En el cas dels ratolins *Apc*^{min/+} les variacions en la metilació del DNA es determinaren mitjançant l'anàlisi de dades aparellades (teixit adjacent-adenoma de cada ratolí). Això, junt amb el fet que els dos ratolins pertanyien a la mateixa camada, permet associar les variacions observades a l'estat tumoral i no al fons genètic i variacions inter-individuals.

En l'estudi s'incloué la línia cel·lular de càncer colorectal CT26 com a referència d'estadis avançats de carcinogènesis murina, malgrat s'ha descrit que els tumors que genera aquesta línia són mesenquimals (Huber et al., 2010). A més a més, hi ha dos factors addicionals que condicionen la comparació d'un teixit amb una línia cel·lular: la qualitat del DNA i RNA és inferior quan s'obté del teixit; i el teixit és molt més heterogeni que la línia cel·lular (Auman and McLeod, 2010), fet accentuat en CT26, ja que és una línia cel·lular clònica. Així doncs, els resultats de les comparacions realitzades amb CT26 s'han de considerar com a orientatius de les alteracions que es produeixen en estadis avançats de la progressió tumoral. Incloure una mostra amb un perfil epigenètic molt diferent va ser útil a l'hora d'avaluar el correcte funcionament de l'AIMS-Seq.

1.3 Guanys de metilació durant la diferenciació d'intestí prim i la tumorigènesi.

Durant la diferenciació intestinal es detectaren guanys de metilació en algunes CpGi i sobretot en les regions CpGi *shore* de gens relacionats amb la diferenciació i la regulació de l'expressió gènica. Canvis de metilació en aquestes regions han estat descrits per Feinberg i col·laboradors durant la diferenciació de diferents fibroblasts parentals a les corresponent SC pluripotents induïdes (Doi et al., 2009). El guany de metilació en CpGi promotores també es descrigué en la diferenciació de cèl·lules progenitores neuronals a cèl·lules piramidals (Mohn et al., 2008), de forma similar al que hem observat durant la diferenciació en la cripta de l'intestí prim (36 CpGi de les quals 31 són promotores).

Tot i això, els canvis de metilació observats en la diferenciació de l'intestí involucraven un petit percentatge de cèl·lules, qüestionant la implicació funcional d'aquesta hipermetilació. Un 78% dels gens amb tendència a la hipermetilació no s'expressaven, el que suggereix que el lleuger increment de metilació no és el mecanisme silenciador si no una tendència en gens silenciats, essent alguns d'ells gens específics de cèl·lules progenitores de la cripta. El fet que gens sobreexpressats en càncer tendixin a hipermetilar-se en cèl·lules diferenciades, és un exemple més de les similituds entre cèl·lules tumorals i progenitores, ja que aquestes últimes no tenen silenciats mitjançant metilació gens importants per la progressió tumoral. Cal destacar, però, que un 32,9% dels amplicons hipermetilats en cèl·lules diferenciades també ho estaven en CT26 respecte còlon, suggerint que si aquesta metilació succeís en cèl·lules amb propietats de pluripotència (cèl·lules progenitores de la cripta), aquestes podrien desenvolupar un fenotip tumoral.

S'ha descrit en diferents treballs que la hipermetilació del DNA està associada a la presència de marques d'histones inactives en cèl·lules pluripotents progenitores (Rada-Iglesias et al., 2009; Schlesinger et al., 2007). Malgrat la major part dels gens hipermetilats en la diferenciació presentin marques actives de cromatina en SC embrionàries, caldria analitzar les marques d'histones en les cèl·lules progenitores de la cripta per tal de determinar si la metilació ve guiada per la presència modificacions d'histones específiques (dominis bivalents o H3K27me3) o esdevé de forma estocàstica.

A més dels treballs que assenyalen la cèl·lula progenitora de la cripta com la causant del procés tumoral (Barker et al., 2009), estudis realitzats per Batlle i col·laboradors descriuen que els tumors colorectals mantenen l'organització en criptes observada en teixit sa (Merlos-Suarez et al., 2011). Els adenomes analitzats eren heterogenis però van presentar un patró d'hipermetilació en regions CpGi promotores similar al de les cèl·lules diferenciades respecte les progenitores. Això podria ser degut a que: part de les cèl·lules descendents de les SC canceroses han adquirit la metilació durant les diferents divisions sofertes (similar al que s'ha descrit durant la diferenciació); o bé, és una població descendent d'una SC cancerosa que ha adquirit aquest perfil aberrant de metilació. Finalment, el fet que el 33% de les hipermetilacions

també s'observessin en CT26 i en molts casos amb un grau de metilació molt elevat, és compatible amb la idea que és el manteniment del silenciament i un elevat nombre de divisions cel·lulars el que determina els nivells de metilació.

Malgrat l'estat de metilació dels adenomes i cèl·lules diferenciades era molt similar en les regions de les CpGi, els dendrogrames agrupaven conjuntament les mostres de l'intestí sa en una branca allunyada dels adenomes, aquestes diferències es traduïren en hipometilacions de l'adenoma en elements repetitius i regions no associades a cap dels elements genòmics analitzats. Aquestes diferències podien ser degudes al procés tumoral (Weisenberger et al., 2005) o al fet de comparar diferents animals (Fraga et al., 2005). Val a dir que algunes d'aquestes hipometilacions observades en adenomes respecte diferenciades també es descrigueren en CT26 respecte còlon: 19% de les hipometilacions en seqüències repetitives.

Tot i que l'estudi de les CpGi discretes pot aportar molta informació sobre la implicació del silenciament de gens específics durant el procés de diferenciació, determinar els canvis observats a nivell regional pot tenir més rellevància funcional. Els estudis realitzat per Feinberg i col·laboradors (Hansen et al., 2011), han descrit 2.871 blocs hipermetilats en CRC humà de 9Kb de mitja, determinats mitjançant *moving windows*. L'AIMS-Seq dona informació sobre l'estat de metilació al llarg del genoma (encara que de forma discontinua, dianes *Xmal* en amplicons de fins a 2Kb), fet que va promoure la determinació dels blocs mitjançant el *software* dissenyat per la detecció de CGHs. Els resultats obtinguts mostraren la presència de dominis hipermetilats que eren variables a nivell de grandària, nombre de gens i CpGi. Malgrat aquestes regions presentaven gens funcionalment interessants cal validar la presència i extensió d'aquests blocs abans d'aprofundir en el seu estudi.

A escala global, el treball realitzat ens indica que els canvis de metilació al llarg de la diferenciació de les cèl·lules epitelials de l'intestí prim són de baixa intensitat o es donen en una petita subfracció de cèl·lules. A continuació cal verificar si aquestes hipermetilacions tenen una repercussió funcional directa (tant a nivell de totes les cèl·lules com si només afecten una subpoblació cel·lular) o són conseqüència d'un procés d'estabilització irreversible de la cromatina en una estat de silenciament gènic durant la diferenciació. La identitat dels gens afectats és consistent amb la hipòtesi de que els gens que es silencien en el procés de diferenciació també tenen funcions antitumorals. La seva inactivació en cèl·lules diferenciades respon a l'estat terminal d'aquestes que implica el cessament de processos proliferatius i d'altres que són comuns de cèl·lules pluripotents i tumorals.

1.4 Estadis inicials de la tumorigènesi: metilació del DNA i expressió gènica diferencials.

Per tal d'estudiar regions diferencialment metilades en estadis inicials de la tumorigènesi s'estudiaren l'intestí de ratolins sans i ratolins $Apc^{min/+}$, incloent la línia cel·lular CT26. Tal i com s'ha comentat a l'inici de la discussió, les rèpliques d'AIMS-Seq de l'intestí prim eren molt variables, fet que va fer centrar-nos en els canvis de metilació que succeïen en els adenomes macroscòpics de ratolins $Apc^{min/+}$ respecte el seu teixit adjacent. En aquest cas s'observà la hipermetilació en regions promotores associades a una CpGi, però aquest augment no es traduí en canvis d'expressió gènica, malgrat el 63% dels gens analitzats per *microarrays* s'expressaven en aquests teixits. També es determinà, que els gens relacionats amb el desenvolupament presentaven un increment de metilació en adenomes alhora que estaven hipermetilats en CT26 respecte còlon. Això indica la importància de la regulació d'aquestes vies en la progressió tumoral, que majoritàriament estaven silenciades o poc expressades en els teixits analitzats. A més, s'observà l'associació de la hipermetilació en adenomes amb zones promotores de gens relacionats amb la regulació transcripcional, que està alterada en el procés tumoral. Cal destacar que a nivell regional es va observar una correlació entre els dominis hipometilats en CT26 i els blocs descrits per Feinberg i col·laboradors en CRC (Hansen et al., 2011), observant un enriquiment en senyalització cel·lular i remodelació de la matriu, respectivament.

A nivell d'expressió gènica, els adenomes es caracteritzaren per la sobreexpressió de gens relacionats amb la migració i la quimiotaxis, la desregulació dels quals està associada amb la capacitat metastàtica i invasiva del tumor (Bissell and Radisky, 2001; Koizumi et al., 2007). D'altra banda s'observà un silenciament de GPX6 i GPX5 en adenomes, sent ambdues proteïnes encarregades de detoxificar el peròxid d'hidrogen (via de la glutatió peroxidasa). Aquesta família de proteïnes pot desenvolupar funcions de protecció o patogènics i s'ha descrit la seva implicació en la resistència a drogues quimioterapèutiques en CRC, entre d'altres càncers (revisat en (Balendiran et al., 2004)). El fet que estiguessin infraexpressats en adenomes podia ser degut a que aquests tumors eren benignes i no havien adquirit totes les propietats necessàries per dur a terme la progressió tumoral, entre aquestes podria estar la capacitat de detoxificació per augmentar la supervivència cel·lular.

En l'anàlisi d'expressió global no es detectaren canvis significatius entre l'intestí prim del ratolí sa i el del ratolí $Apc^{min/+}$ (teixit adjacent). Malgrat això, cal destacar que sí que es van trobar variacions petites ($-1,2 < \log FC < 1,2$) i, a més, eren variables entre individus ($FDR > 0,01$). D'altra banda, les variacions d'expressió eren més grans entre intestí prim i adenomes macroscòpics que entre adenomes i el seu teixit adjacent. El fet que els gens diferencialment expressats en adenomes respecte intestí prim tinguessin perfils d'expressió heterogenis en les mostres i aquests presentessin diferent enriquiment funcional fa difícil la comparació i interpretació dels resultats.

Tot i això, és important destacar que els gens que es sobreexpressaven en adenomes respecte el teixit normal, mantenien un enriquiment en processos biològics relacionats amb quimiotaxis, citoquines i angiogènesi, de forma similar a l'enriquiment observat en adenomes respecte el seu teixit adjacent. D'altra banda s'observà una sobreexpressió en gens relacionats amb la via de senyalització *Wnt* i l'orientació axonal, fet que no es detectava al comparar amb el teixit adjacent, degut possiblement a que el ratolí *Apc^{min/+}* tenia alterada *per se* aquesta via de senyalització i, com a conseqüència, la ordenació axial també es veia afectada. Malgrat els diferents treballs que han estudiat alteracions d'expressió gènica en adenomes *Apc^{min/+}* (Sabates-Bellver et al., 2007; Segditsas et al., 2008; Van der Flier et al., 2007) presenten poc sol·lapament en els gens diferencialment expressats (20% en alguns casos), tots ells han reportat alteracions en els mateixos processos biològics descrits també en aquest treball.

Les anàlisis de metilació i expressió global en mostres de ratolins *Apc^{min/+}* també destaquen el paper la metilació del DNA en la regulació dels gens implicats en el desenvolupament. A més, suggereixen que l'alteració de gens relacionats amb la migració, l'angiogènesi, la quimiotaxis i la senyalització via citoquines són les encarregades d'iniciar el procés tumoral. L'adquisició de fenotips malignes manté relació amb l'alteració d'aquests processos biològics però variacions en altres gens són necessàries per tal d'obtenir la capacitat d'invasió i metàstasi.

2. Silenciament epigenètic regional de gran abast.

2.1 Regulació de dominis cromosòmics en diferenciació

cel·lular i carcinogènesi: el cas de LRES.

Com hem descrit àmpliament en la introducció (apartat 4.1) el LRES és un mecanisme de silenciament epigenètic identificat primerament en CRC (Frigola et al., 2006), observat en altres tumors i caracteritzat a escala global en càncer de pròstata (Coolen et al., 2010). Una de les principals limitacions alhora d'estudiar la dinàmica del LRES en càncer colorectal és la manca de models *in vitro* de teixit normal de còlon. Tot i que recentment s'ha descrit un protocol de cultiu de criptes de còlon partint de cèl·lules progenitores humanes (Jung et al., 2011a), els requeriments tècnics i l'elevat cost limiten la seva aplicació i l'ús per determinats estudis. D'altra banda, la diferenciació i polarització de les cèl·lules d'adenocarcinoma colorectal CaCo2 és un model *in vitro* que permet estudiar les regions silenciades mitjançant LRES en cèl·lules canceroses, en cèl·lules amb propietats d'enteròcits i en estadis entremitjos d'aquest procés de diferenciació (Saaf et al., 2007).

Durant la diferenciació en confluència de Caco2 a enteròcit s'observà un guany d'expressió gènica en la regió 2q14.2 acompanyat per un augment d'H3K9ac en els promotors dels gens i un augment de CTCF en regions intergèniques. Aquesta reorganització de la cromatina adquirint un estat més actiu no comportà la desmetilació del DNA en les CpGi promotores. L'increment en l'expressió gènica i el manteniment de la metilació de les CpGi s'observà també en les CaCo2 diferenciades per l'efecte de l'àcid butíric. Aquests canvis es mantingueren estables quan les cèl·lules diferenciades es cultivaren en absència d'aquest inhibidor de deacetilases. Així doncs, el LRES es reverteix de forma parcial durant la diferenciació de CaCo2, el que fa pensar, que en aquestes cèl·lules l'estat repressiu es manté de forma activa i que encara és possible recuperar l'expressió d'alguns dels gens en condicions apropiades.

Tal i com s'havia descrit en l'estudi de càncer de pròstata (Coolen et al., 2010), les variacions en l'expressió gènica presentaren una correlació directa amb els nivells d'H3K9ac. A més, els canvis en els nivells de CTCF suggereixen que el silenciament mitjançant LRES va acompanyat per la pèrdua de les barreres físiques, que promouien la regulació conjunta de gens contigus. Aquest fet ja s'ha descrit anteriorment en una altre regió silenciada mitjançant LRES, observant que els co-tractaments amb inhibidors de DNA metiltransferases i deacetilases promouen la pèrdua de les barreres facilitant la propagació de la marca H3K27me3 al llarg de la regió (Rodriguez et al., 2008). Aquestes observacions són conseqüents amb el paper de CTCF com un barrera entre dos estats diferents de la cromatina (Cuddapah et al., 2009). D'altra banda, s'ha descrit àmpliament l'elevada promiscuïtat d'interacció de CTCF amb d'altres factors (revisat Zlatanova and Caiafa, 2009), els nivells dels quals podrien disminuir degut a la pèrdua de CTCF, col·laborant en l'establiment del LRES. En qualsevol cas queda per demostrar si aquests canvis de CTCF són globals (afectant múltiples

regions del genoma) o es donen de forma particular en determinades zones, el que implicaria la participació de mecanismes a nivell local regulant l'estructura de la cromatina.

En càncer de pròstata s'ha descrit que la major part de les regions de LRES estan localitzades en eucromatina (bandes R en tinció amb Giemsa, Coolen et al., 2010), suggerint que les regions, malgrat estar silenciades, no es reubiquen en zones d'heterocromatina. De forma similar Baylin i col·laboradors (Easwaran et al., 2010) van mostrar que la desmetilació de regions silenciades per LRES en cèl·lules canceroses no comporta un canvi en la localització dins els compartiments de cromatina. Tenint en compte aquests treballs, és probable que la pèrdua de les barreres físiques associada al LRES comporti alteracions en l'accessibilitat de la regió a les factories de transcripció (Osborne et al., 2004), modificant les interaccions o la proximitat a determinades regions de cromatina, però sense comportar canvis profunds de l'organització nuclear.

Cal mencionar un resultat inesperat: en les cèl·lules diferenciades el gen SCTR es reexpressava malgrat tenir la CpGi promotora totalment metilada. Es podria hipotetitzar que enlloc de 5mC sigui 5hmC, però tenint en compte que als 40 dies la CpGi seguia totalment metilada i que la 5hmC s'ha identificat com un estadi intermedi de desmetilació del DNA (Tahiliani et al., 2009), aquesta explicació no sembla molt probable. D'altra banda, un fenomen similar s'ha descrit en cèl·lules tractades amb inhibidors de deacetilases (Raynal et al., 2012), on les diferents drogues fan que la cromatina adquireixi un estat actiu, els gens s'expressin i el manteniment de la metilació del DNA actui com a memòria del silenciament, que es recupera 14 dies després del tractament. De forma similar, en les cèl·lules diferenciades l'activació de la cromatina en SCTR preval a la metilació del DNA. Finalment es podria plantejar la participació d'altres regions alternatives (CpGi o d'altres) en la regulació de l'expressió de SCTR.

2.2 El ratolí, un model per l'estudi de LRES en càncer.

La dificultat de l'estudi del LRES en mostres humanes va promoure l'ús del ratolí com a model. S'ha descrit en treballs anteriors del nostre grup que les cèl·lules HCT116 presenten perfils de silenciament similars als dels carcinomes colorectals en les regions cromosòmiques 2q14.2 i 5q35.2 (Frigola et al., 2006; Rodriguez et al., 2008). En aquestes cèl·lules, les regions regulades per LRES es caracteritzen per la disminució global de l'expressió i la hipermetilació de CpGi associades a gens poc expressats que presenten dominis bivalents (H3K4me3 i H3K27me3) (Mayor et al., 2009; Rodriguez et al., 2008). Aquests mateixos gens també presenten dominis bivalents en SC embrionàries (Pan et al., 2007; Zhao et al., 2007). En ratolí, es constata la conservació del LRES com a mecanisme de silenciament de les regions ortòlogues en la línia de càncer colorectal CT26, ja que el perfil epigenètic (metilació del DNA i modificacions d'histones) i l'expressió gènica del teixit de còlon sa eren similars en ambdues espècies, així com en les línies cel·lulars de càncer colorectal HCT116 i CT26.

A més, l'ús del ratolí va permetre analitzar mitjançant reChIP la presència de dominis bivalents en teixit normal en els gens poc expressats de la regió, corroborant així el manteniment dels dominis que s'havien descrit en ESC mitjançant ChIP (Mikkelsen et al., 2007). De igual manera, es va confirmar la conservació d'aquests dominis bivalents en línies cel·lulars tumorals, malgrat presentar metilació de la regió promotora del DNA. Diferents treballs han descrit la resolució dels dominis bivalents durant el procés de diferenciació (Meissner et al., 2008; Mohn et al., 2008) o la progressió tumoral (Iliou et al., 2011) associant la hipermetilació del DNA amb la pèrdua de la marca activa. En aquest cas, es va confirmar que la detecció de dominis bivalents no era deguda a la presència de dues poblacions cel·lulars diferents, i que quan les CpGi estan metilades els nivells de marca activa i inactiva disminuïen respecte el teixit normal, però es mantenia la bivalència.

La hipermetilació del DNA també s'associà a un augment en els nivells de H3K9me₂, tal i com s'ha descrit àmpliament en la bibliografia (Fahrner et al., 2002; Kondo et al., 2003; Weng et al., 2009). A més hi hagué un increment en els nivells d'EZH2, malgrat els nivells d'H3K27me₃ van disminuir en els gens metilats. S'ha descrit que els nivells globals de H3K27me₃ són inferiors en diferents tumors (Wei et al., 2008), fet que podria explicar la contradicció observada en CT26 (pèrdua H3K27me₃, guany de EZH2), però caldria corroborar-ho determinant els nivells globals d'H3K27me₃ en ambdues mostres. D'altra banda l'augment d'EZH2 podria ser el causant del reclutament de les DNMTs que hipermetilarien les CpGi promotores dels gens (Vire et al., 2006).

Així doncs, podem concloure que el LRES és una alteració que també es produeix en tumors de ratolins. Aquest silenciament presenta les mateixes característiques descrites en LRES per les cèl·lules canceroses humanes a nivell de perfils de marques d'histones (Coolen et al., 2010; Rodriguez et al., 2008), i va acompanyat per la disminució de CTCF, de forma similar a la situació observada durant la diferenciació de CaCo2, el que suggereix un cert paral·lisme entre els processos de transformació i diferenciació cel·lular.

2.3 Implicacions del LRES en diferenciació intestinal i estadis inicials de la carcinogènesi.

Un altra limitació per la comprensió del LRES és determinar la regulació d'aquests gens en fases inicials de la tumorigènesi i si el fenomen de LRES ja es manifesta en aquestes etapes. Els ratolins *Apc*^{min/+} han estat una bona eina per estudiar la progressió tumoral i els processos moleculars associats (Halberg et al., 2009; Sakatani et al., 2005; Samuel et al., 2009; Sodikin et al., 2006, per exemple). Es determinà el perfil epigenètic de les regions silenciades per LRES en CRC en adenomes de ratolins *Apc*^{min/+}, mostrant que en aquestes regions no hi havia un infraexpressió gènica, ans al contrari, s'observà una tendència a la sobreexpressió. Tenint en compte que estudis en humans han determinat que el nombre d'alteracions en adenomes de

pacients amb FAP és inferior al dels adenomes esporàdics (Tarafa et al., 2003) i que la major part dels adenomes de ratolins $Apc^{min/+}$ són benignes, desenvolupant cap o pocs carcinomes, es pot considerar que estem estudiant estadis molt primerencs del procés tumoral hereditari. Així doncs, aquesta sobreexpressió podria significar un mecanisme de contraposició al silenciament regional per LRES associat a estadis de malignitat (adenomes i carcinomes CRC).

Treballs en diferenciació de la línia cel·lular CaCo2 han mostrat similituds en els perfils d'expressió d'aquesta línia cel·lular i les criptes de l'intestí, així com en les CaCo2 diferenciades i les cèl·lules diferenciades del *villi* (Saaf et al., 2007). Malgrat aquests paral·lelismes, s'ha determinat que el LRES no juga un paper en la diferenciació al llarg de l'axis cripta/*villi* en ratolins sans, essent exclusiu de la progressió de cèl·lules tumorals. D'altra banda, s'observa que alguns dels gens expressats tendien a estar-ho més en cèl·lules de la cripta, de forma similar als patrons descrits en adenomes. Així doncs, aquesta sobreexpressió podria ser un mecanisme per tal d'evitar el silenciament de la regió en cèl·lules amb elevada proliferació que no presenten (o encara no presenten) propietats tumorals agressives. Aquest fet, asseguraria un context favorable per l'expressió del gens supressors de tumors que estan inclosos en aquestes regions.

Tot i aquesta tendència regional, gens puntuals, com *Cplx2*, presenten un patró d'expressió específic durant la diferenciació cel·lular. El gen *Cplx2* codifica per una proteïna citosòlica que participa en l'exocitosi de vesícules sinàptiques en neurones excitades del còrtex cerebral, l'hipocamp i el cerebel. Estudis duts a terme en humans i rates (Raevskaya et al., 2005) han mostrat que les dues variants s'expressen diferencialment en aquests teixits en ambdues espècies, però no s'ha aclarit un rol funcional. La major part dels treballs es centren en les implicacions d'aquestes proteïnes en el desenvolupament cerebral, associant el seu silenciament amb patologies mentals, tals com la depressió, l'esquizofrènia i la malaltia de Huntington (Glynn et al., 2010). L'expressió diferencial d'aquestes isoformes suggereix la presència de mecanismes reguladors que varien durant la diferenciació de l'intestí. Es podria especular sobre l'associació entre aquestes variants amb la transmissió de senyals necessaris pel manteniment de l'arquitectura intestinal, però calen estudis funcionals per corroborar-ho.

De la mateixa forma que *Cplx2*, *pLKC* també mostra variacions en l'expressió durant la diferenciació. El gen *pLKC*, que codifica per la Protocadherina 24, està sobreexpressat en cèl·lules diferenciades respecte les fraccions progenitores (cripta), infraexpressat en adenomes respecte el teixit sa i finalment silenciament en CRC. L'estudi d'aquesta Protocadherina en cèl·lules epitelials renals mostra que la seva sobreexpressió està associada a la polarització cel·lular (Michael P 2010). A més, els estudis realitzats per Koga i col·laboradors han elucidat que la sobreexpressió del gen en les cèl·lules HCT116 indueix la inhibició per contacte i evita la formació de tumors *in vivo* (Okazaki et al., 2002), fet promogut per la supressió de la via de senyalització de la β -Catenina (Ose et al., 2009). El perfil d'expressió de la Protocadherina 24 en la diferenciació intestinal i la progressió tumoral és un exemple més de les similituds funcionals que presenten SC adultes i cèl·lules tumorals.

2.4 Model de regulació de les zones amb LRES durant la diferenciació i la tumorigènesi.

El conjunt d'aquests resultats (Fig. D1) permet afirmar que el LRES és un mecanisme de silenciament associat a la tumorigènesi, i que està conservat entre humans i ratolí, fet que avala la seva funcionalitat biològica. La infraexpressió gènica de la regió està acompanyada per la disminució de l'acetilació de la Histona H3 i la pèrdua de les barreres físiques internes de la regió. A més, en estadis avançats de la carcinogènesi el silenciament regional es reforça amb la hipermetilació de les CpGi promotores de determinats gens de la regió (poc expressats i amb marques bivalents) i la heterocromatització d'aquestes regions promotores (2meH3K9 i EZH2).

A més a més, el fet que les regions silenciades mitjançant LRES en càncer tendeixen a tenir més activitat gènica en cèl·lules amb capacitat proliferant en comparació a les respectives cèl·lules diferenciades, suggereix la presència de mecanismes per evitar el LRES en les cèl·lules actives sense capacitat metastàtica. En les cèl·lules tumorals hauria fracassat aquest mecanisme i per tant, es perdrien els possibles efectes antitumorals dels gens de la regió.

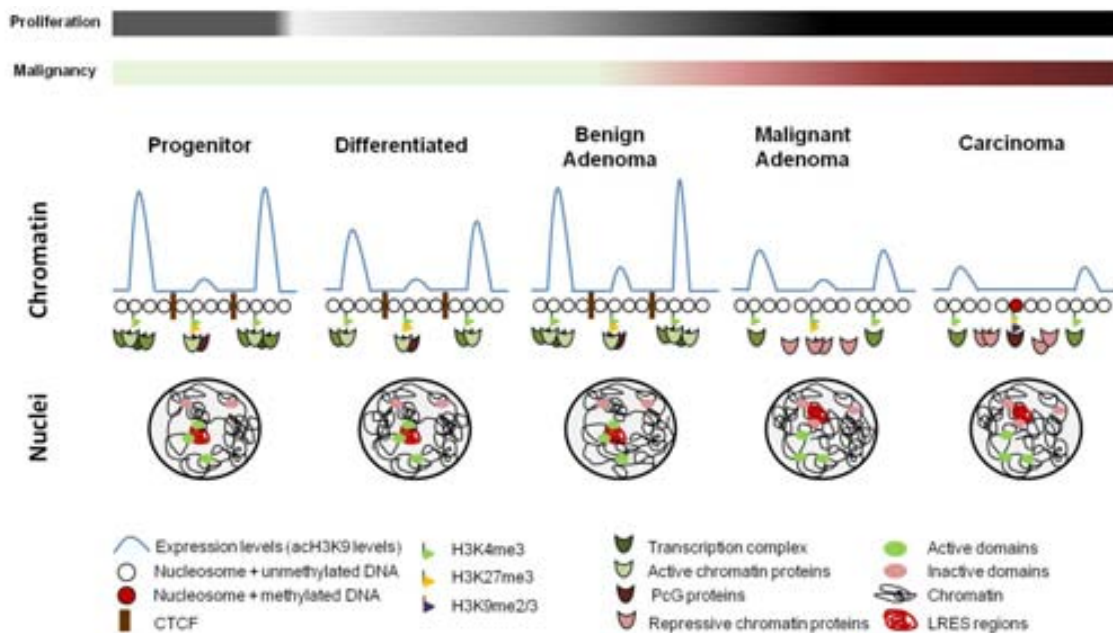


Figura D1. Diagrama on es presenta el model desenvolupat en base a la síntesi dels resultats obtinguts en l'anàlisi de les regions regulades mitjançant LRES en mostres normals i tumorals d'humans i ratolins.

La conservació d'aquest mecanisme de silenciament en ratolí descrita en aquest treball, així com la seva implicació en un ampli nombre de regions en diferents càncers (Coolen et al., 2010; Frigola et al., 2006; Hitchins et al., 2007; Javierre et al., 2011; Rodriguez et al., 2008), corrobora la importància funcional del LRES. Tot i que les alteracions en la regulació de gens discrets permet obtenir biomarcadors i pot ser molt important alhora de desenvolupar teràpies, cada vegada apareixen més evidències d'alteracions epigenètiques que impliquen regions genòmiques de diferent abast (Berman et al., 2012; Hansen et al., 2011). Aquest canvi en l'enfocament de l'anàlisi és degut a la viabilitat d'estudis epigenètics a escala global. A més, en els últims anys ha crescut l'interès per les implicacions de l'organització nuclear en la diferenciació i situacions patològiques, ja que diferents treballs han mostrat el seu rol en la regulació de la transcripció gènica, la replicació i reparació del DNA (Finlan et al., 2008; Nunez et al., 2009; Splinter et al., 2006; Tiwari et al., 2008; van Steensel and Dekker, 2010). Així doncs, la detecció de regions regulades coordinadament i l'estudi dels mecanismes implicats en la definició i control dels seus estats cromatínics és un factor clau a l'hora d'entendre el procés tumoral i en el disseny de noves estratègies terapèutiques.

El nostre estudi recolza que el LRES comporta primerament una alteració en la cromatina, que afecta els subdominis de la regió facilitant la infraexpressió al llarg de la regió, i en estadis més avançats el silenciament es reforça mitjançant la hipermetilació del DNA i heterocromatinització de gens marcats amb dominis bivalents. Cal destacar que aquest gens tenen dominis bivalents en SC embrionàries, però que no es resolen en la diferenciació, mantenint la doble potencialitat en teixit normal, com a mínim en intestí. Caldrà determinar les implicacions del silenciament transcripcional mitjançant LRES en l'organització nuclear, per tal d'elucidar les interaccions amb altres zones de la cromatina i elements nuclears associats a aquest silenciament regional.

3. Cara i creu de l'Activina B en càncer intestinal.

El gen $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$ junt amb $\text{INH-}\beta_{\text{A}}$ i $\text{INH-}\alpha$ són membres de la família del $\text{TGF-}\beta$, citoquines implicades en el desenvolupament i tumorigènesi entre d'altres processos. Aquestes dimeritzen combinant-se de forma diversa i constituint les Activines i Inhibines (Fig. i21), glicoproteïnes amb funcions oposades.

L'anàlisi d'expressió del gen $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$ en les diferents mostres murines i humanes mostra com l'expressió d'aquest és molt variable al llarg del procés tumoral: no expressat en intestí de ratolí normal (ni en cèl·lules progenitores de la cripta, ni en població diferenciada); poc expressat en intestí de ratolí $\text{Apc}^{\text{min}/-}$ i cèl·lules CaCo2 diferenciades amb propietats d'enteròcit; reexpressat en estadis inicials de la progressió tumoral, associat a teixit hiperproliferatiu però benigne com els adenomes d' $\text{Apc}^{\text{min}/-}$; mantenint la seva expressió en tumor (CaCo2 , SW480 i tumors analitzats); i essent silenciats en línies cel·lulars agressives, com HCT116, i tumors de pacients amb pitjor supervivència (Mayor et al., 2009). El grau d'expressió de la isoforma $\text{INH-}\alpha$, suggereix que en mostres tumorals d' $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$ forma homodimers o heterodimers amb $\text{INH-}\beta_{\text{A}}$, constituint les Activines. A més s'ha detectat la presència d'Activina B en el sobredant del cultiu d'SW480.

Tenint en compte que l' $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$ s'ha vist implicat en la migració epitelial durant el desenvolupament i la reepitelització de ferides (Burdette et al., 2005; Deng et al., 2006) es podria esperar que el silenciament d'aquest gen disminueixi la capacitat de la cèl·lula de migrar *in vitro*, fet que no s'ha observat en els estudis realitzats amb SW480. Això podria ser degut a: (1) una qüestió tècnica com que els efectes s'observin a temps més llargs (per exemple 30h) (Davalos et al., 2011); (2) que en cèl·lules tumorals aquest procés ja estigui desregulat *downstream* d' $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$; o (3) que existeix una redundància funcional i l'Activina B participi durant la reepitelització en càncer juntament amb d'altres mecanismes.

En càncer renal s'ha descrit que el silenciament d'Activina B disminueix la capacitat d'invasió i augmenta l'adhesió a la matriu extracel·lular, essent regulat pel factor induïble d'hipòxia HIF (Wacker et al., 2009). Els estudis d'invasió realitzats amb SW480, suggereixen que el silenciament d' $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$ comporta una disminució de la capacitat invasiva de la cèl·lula, tot i això, cal mencionar les petites variacions obtingudes amb aquests estudis.

Els estudis en càncer renal també han mostrat que el silenciament de l'Activina B disminueix el creixement del tumor (Wacker et al., 2009), però el silenciament transitori d' $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$ en la línia cel·lular SW480 no comporta alteracions en l'activitat cel·lular, fet que permet concloure que la manca d' $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$ no disminueix la proliferació de la cèl·lula *in vitro*.

El fet que el silenciament d' $\text{INH-}\beta_{\text{B}}$ amb hipermetilació de la CpG promotoria s'associï amb estadis agressius en CRC (Mayor et al., 2009), podria suggerir que el silenciament d'aquest gen en SW480 hauria d'accentuar les propietats agressives de les cèl·lules, augmentant els

nivells de proliferació i la capacitat invasiva. Aquesta hipòtesi no s'ha corroborat amb els estudis funcionals duts a terme amb el silenciament transitori d'INH- β_B en SW480, ja que no es demostra la implicació directa d'aquest silenciament i en l'assaig d'invasió s'observa una tendència contrària. Així doncs, per tal de determinar si el silenciament de l'INH- β_B té una implicació clau en la invasió tumoral és necessària l'optimització de l'estudi de la invasió i l'anàlisi funcional en altres línies i models representatius dels diferents perfils moleculars observats en tumors de pacients. Per tal de tenir una visió global de les implicacions funcionals de l'Activina B en la progressió tumoral, és imprescindible determinar si té un paper en l'adhesió cel·lular.

Malgrat calgui ampliar els estudis funcionals, els resultats presentats junt amb els obtinguts en càncer renal per Wacker i col·laboradors suggereixen que el silenciament d'INH- β_B no es relaciona amb un estat tumoral més agressiu. Així doncs, el fet que els tumors colorectals que tenen la CpGi promotora d'INH- β_B hipermetilada es correlacionin amb una menor supervivència (Fig. i22) no és degut a la pèrdua de funció d'INH- β_B , sinó a la presència d'un LRES més extens o avançat. En suport d'aquesta hipòtesi, cal dir que la hipermetilació d'INH- β_B en càncer colorectal gairebé sempre va acompanyada d'hipermetilació en d'altres illes properes en la regió de LRES (Mayor et al., 2009). Així doncs, es proposaria el grau de repressió de la regió silenciada mitjançant LRES com un possible factor pronòstic.



CONCLUSIONS

En referència als objectius plantejats, les conclusions són:

Objectiu 1: Determinar els canvis de metilació associats a la diferenciació de l'intestí prim i els estadis inicials de la carcinogènesi.

1. L'anàlisi per AIMS-Seq ha permès determinar que durant la diferenciació de cèl·lules progenitores d'intestí prim hi ha petits guanys de metilació concentrats majoritàriament en les regions conegudes com *CpG island shores*.
2. La major part dels gens hipermetilats, tant en processos de diferenciació cel·lular com en la tumorigènesi, solen estar implicats en el desenvolupament i s'expressen a nivells molt baixos en cèl·lules diferenciades.
3. En estadis inicials de la tumorigènesi, en adenomes de ratolins APCmin/+, s'observa una sobreexpressió de gens implicats en processos de comunicació cel·lular, angiogènesi i migració.

Objectiu 2: Estudiar la dinàmica del mecanisme de Silenciament Epigenètic de Gran Abast (LRES) en processos de diferenciació i càncer.

4. En el procés de diferenciació de la línia cel·lular de càncer colorectal CaCo2 hi ha una reversió del LRES en la regió 2q14.2 que es tradueix en un increment de l'expressió gènica i l'establiment de barreres (CTCF) dins de la regió.
5. El LRES, com a mecanisme de silenciament associat a la tumorigènesi, afecta regions genòmiques conservades al llarg de l'evolució i presenta perfils genètics i epigenètics molt semblants en cèl·lules tumorals humanes i murines.
6. Assajos de reChIP han demostrat la bivalència de la cromatina en la zona promotora de gens pertanyents a regions regulades per LRES en cèl·lules tumorals, així com han permès determinar que aquests dominis ja són presents en teixit normal.
7. En cèl·lules amb elevat grau de proliferació (progenitores i adenomes benignes) les regions regulades per LRES en cèl·lules tumorals presenten una major activitat transcripcional, suggerint que l'elevada expressió gènica podria exercir un paper antitumoral que es perd amb el silenciament en etapes més avançades.

Objectiu 3: Elucidar les implicacions funcionals del silenciament de gens supressors de tumors pertanyents a regions regulades mitjançant LRES en càncer colorectal.

8. El silenciament d'INH- β_B *in vitro* no sembla conferir característiques més agressives o invasives a la cèl·lula tumoral, suggerint que la baixa supervivència dels pacients amb INH- β_B hipermetilat en càncer colorectal estaria relacionada amb l'extensió del LRES en sí, més que amb un paper directe d'INH- β_B .



BIBLIOGRAFIA

- Adli, M., J. Zhu, and B.E. Bernstein. 2010. Genome-wide chromatin maps derived from limited numbers of hematopoietic progenitors. *Nat Methods*. 7:615-618.
- Auman, J.T., and H.L. McLeod. 2010. Colorectal cancer cell lines lack the molecular heterogeneity of clinical colorectal tumors. *Clin Colorectal Cancer*. 9:40-47.
- Bai, L., and A.V. Morozov. 2010. Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends Genet*. 26:476-483.
- Balendiran, G.K., R. Dabur, and D. Fraser. 2004. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct*. 22:343-352.
- Bannister, A.J., and T. Kouzarides. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 21:381-395.
- Barker, N., R.A. Ridgway, J.H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A.R. Clarke, O.J. Sansom, and H. Clevers. 2009. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 457:608-611.
- Barker, N., M. van de Wetering, and H. Clevers. 2008. The intestinal stem cell. *Genes Dev*. 22:1856-1864.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T.Y. Roh, D.E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev, and K. Zhao. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 129:823-837.
- Beisel, C., and R. Paro. 2011. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet*. 12:123-135.
- Bejar, L., M. Gili, V. Diaz, G. Ramirez, J. Lopez, J.L. Cabanillas, and A. Cayuela. 2009. Incidence and mortality by colorectal cancer in Spain during 1951-2006 and its relationship with behavioural factors. *Eur J Cancer Prev*.
- Berman, B.P., D.J. Weisenberger, J.F. Aman, T. Hinoue, Z. Ramjan, Y. Liu, H. Noushmehr, C.P. Lange, C.M. van Dijk, R.A. Tollenaar, D. Van Den Berg, and P.W. Laird. 2012. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet*. 44:40-46.
- Bernstein, B.E., T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S.L. Schreiber, and E.S. Lander. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 125:315-326.
- Bibikova, M., E. Chudin, B. Wu, L. Zhou, E.W. Garcia, Y. Liu, S. Shin, T.W. Plaia, J.M. Auerbach, D.E. Arking, R. Gonzalez, J. Crook, B. Davidson, T.C. Schulz, A. Robins, A. Khanna, P. Sartipy, J. Hyllner, P. Vanguri, S. Savant-Bhonsale, A.K. Smith, A. Chakravarti, A. Maitra, M. Rao, D.L. Barker, J.F. Loring, and J.B. Fan. 2006. Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature. *Genome Res*. 16:1075-1083.
- Bissell, M.J., and D. Radisky. 2001. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 1:46-54.
- Borras, J.M., A. Sanchez-Hernandez, M. Navarro, M. Martinez, E. Mendez, J.L. Ponton, J.A. Espinas, and J.R. Germa. 2001. Compliance, satisfaction, and quality of life of patients with colorectal cancer receiving home chemotherapy or outpatient treatment: a randomised controlled trial. *BMJ*. 322:826.
- Branco, M.R., and A. Pombo. 2006. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol*. 4:e138.
- Brunner, A.L., D.S. Johnson, S.W. Kim, A. Valouev, T.E. Reddy, N.F. Neff, E. Anton, C. Medina, L. Nguyen, E. Chiao, C.B. Oyolu, G.P. Schroth, D.M. Absher, J.C. Baker, and R.M. Myers. 2009. Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver. *Genome Res*. 19:1044-1056.
- Burdette, J.E., J.S. Jeruss, S.J. Kurley, E.J. Lee, and T.K. Woodruff. 2005. Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 65:7968-7975.

- Buschbeck, M., I. Uribealago, I. Wibowo, P. Rue, D. Martin, A. Gutierrez, L. Morey, R. Guigo, H. Lopez-Schier, and L. Di Croce. 2009. The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes. *Nat Struct Mol Biol.* 16:1074-1079.
- Clark, S.J., A. Statham, C. Stirzaker, P.L. Molloy, and M. Frommer. 2006. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc.* 1:2353-2364.
- Collas, P. 2009. Epigenetic states in stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 1790:900-905.
- Compton, C.C., and F.L. Greene. 2004. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin.* 54:295-308.
- Coolen, M.W., C. Stirzaker, J.Z. Song, A.L. Statham, Z. Kassir, C.S. Moreno, A.N. Young, V. Varma, T.P. Speed, M. Cowley, P. Lacaze, W. Kaplan, M.D. Robinson, and S.J. Clark. 2010. Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat Cell Biol.* 12:235-246.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.* 2:292-301.
- Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet.* 7:349-359.
- Cuddapah, S., R. Jothi, D.E. Schones, T.Y. Roh, K. Cui, and K. Zhao. 2009. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res.* 19:24-32.
- Chang, K.P., H.K. Kao, Y. Liang, M.H. Cheng, Y.L. Chang, S.C. Liu, Y.C. Lin, T.Y. Ko, Y.S. Lee, C.L. Tsai, T.H. Wang, S.P. Hao, and C.N. Tsai. 2010. Overexpression of activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. *Ann Surg Oncol.* 17:1945-1956.
- Chodavarapu, R.K., S. Feng, Y.V. Bernatavichute, P.Y. Chen, H. Stroud, Y. Yu, J.A. Hetzel, F. Kuo, J. Kim, S.J. Cokus, D. Casero, M. Bernal, P. Huijser, A.T. Clark, U. Kramer, S.S. Merchant, X. Zhang, S.E. Jacobsen, and M. Pellegrini. 2010. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature.* 466:388-392.
- Choi, S.C., and J.K. Han. 2011. Negative regulation of activin signal transduction. *Vitam Horm.* 85:79-104.
- Davalos, V., C. Moutinho, A. Villanueva, R. Boque, P. Silva, F. Carneiro, and M. Esteller. 2011. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene.*
- de la Chapelle, A. 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 4:769-780.
- Deng, M., W.L. Chen, A. Takatori, Z. Peng, L. Zhang, M. Mongan, R. Parthasarathy, M. Sartor, M. Miller, J. Yang, B. Su, W.W. Kao, and Y. Xia. 2006. A role for the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 in epithelial wound healing. *Mol Biol Cell.* 17:3446-3455.
- Djupedal, I., and K. Ekwall. 2009. Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. *Cell Res.* 19:282-295.
- Doi, A., I.H. Park, B. Wen, P. Murakami, M.J. Aryee, R. Irizarry, B. Herb, C. Ladd-Acosta, J. Rho, S. Loewer, J. Miller, T. Schlaeger, G.Q. Daley, and A.P. Feinberg. 2009. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet.* 41:1350-1353.
- Easwaran, H.P., L. Van Neste, L. Cope, S. Sen, H.P. Mohammad, G.J. Pageau, J.B. Lawrence, J.G. Herman, K.E. Schuebel, and S.B. Baylin. 2010. Aberrant silencing of cancer-related genes by CpG hypermethylation occurs independently of their spatial organization in the nucleus. *Cancer Res.* 70:8015-8024.
- Ernst, J., P. Kheradpour, T.S. Mikkelsen, N. Shores, L.D. Ward, C.B. Epstein, X. Zhang, L. Wang, R. Issner, M. Coyne, M. Ku, T. Durham, M. Kellis, and B.E. Bernstein. 2011.

- Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. 473:43-49.
- Eskeland, R., M. Leeb, G.R. Grimes, C. Kress, S. Boyle, D. Sproul, N. Gilbert, Y. Fan, A.I. Skoultchi, A. Wutz, and W.A. Bickmore. 2010. Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. *Mol Cell*. 38:452-464.
- Espada, J., E. Ballestar, R. Santoro, M.F. Fraga, A. Villar-Garea, A. Nemeth, L. Lopez-Serra, S. Ropero, A. Aranda, H. Orozco, V. Moreno, A. Juarranz, J.C. Stockert, G. Langst, I. Grummt, W. Bickmore, and M. Esteller. 2007. Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells. *Nucleic Acids Res*. 35:2191-2198.
- Esteller, M. 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 8:286-298.
- Fahrner, J.A., S. Eguchi, J.G. Herman, and S.B. Baylin. 2002. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res*. 62:7213-7218.
- Fearon, E.R., and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61:759-767.
- Feinberg, A.P., and B. Tycko. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 4:143-153.
- Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 301:89-92.
- Felsenfeld, G., and M. Groudine. 2003. Controlling the double helix. *Nature*. 421:448-453.
- Feng, S., S.E. Jacobsen, and W. Reik. 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*. 330:622-627.
- Filion, G.J., J.G. van Bommel, U. Braunschweig, W. Talhout, J. Kind, L.D. Ward, W. Brugman, I.J. de Castro, R.M. Kerkhoven, H.J. Bussemaker, and B. van Steensel. 2010. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell*. 143:212-224.
- Finlan, L.E., D. Sproul, I. Thomson, S. Boyle, E. Kerr, P. Perry, B. Ylstra, J.R. Chubb, and W.A. Bickmore. 2008. Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet*. 4:e1000039.
- Fleet, J.C., L. Wang, O. Vitek, B.A. Craig, and H.J. Edenberg. 2003. Gene expression profiling of Caco-2 BBe cells suggests a role for specific signaling pathways during intestinal differentiation. *Physiol Genomics*. 13:57-68.
- Fraga, M.F., E. Ballestar, M.F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M.L. Ballestar, D. Heine-Suner, J.C. Cigudosa, M. Urioste, J. Benitez, M. Boix-Chornet, A. Sanchez-Aguilera, C. Ling, E. Carlsson, P. Poulsen, A. Vaag, Z. Stephan, T.D. Spector, Y.Z. Wu, C. Plass, and M. Esteller. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:10604-10609.
- Frigola, J., M. Ribas, R.A. Risques, and M.A. Peinado. 2002. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res*. 30:e28.
- Frigola, J., J. Song, C. Stirzaker, R.A. Hinshelwood, M.A. Peinado, and S.J. Clark. 2006. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet*. 38:540-549.
- Gao, Z., J. Zhang, R. Bonasio, F. Strino, A. Sawai, F. Parisi, Y. Kluger, and D. Reinberg. 2012. PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell*. 45:344-356.
- Gardiner-Garden, M., and M. Frommer. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 196:261-282.

- Gaspar, C., J. Cardoso, P. Franken, L. Molenaar, H. Morreau, G. Moslein, J. Sampson, J.M. Boer, R.X. de Menezes, and R. Fodde. 2008. Cross-species comparison of human and mouse intestinal polyps reveals conserved mechanisms in adenomatous polyposis coli (APC)-driven tumorigenesis. *Am J Pathol.* 172:1363-1380.
- Gaudet, F., J.G. Hodgson, A. Eden, L. Jackson-Grusby, J. Dausman, J.W. Gray, H. Leonhardt, and R. Jaenisch. 2003. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science.* 300:489-492.
- Globisch, D., M. Munzel, M. Muller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Bruckl, M. Biel, and T. Carell. 2010. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One.* 5:e15367.
- Glynn, D., H.E. Gibson, M.K. Harte, K. Reim, S. Jones, G.P. Reynolds, and A.J. Morton. 2010. Clorgyline-mediated reversal of neurological deficits in a Complexin 2 knockout mouse. *Hum Mol Genet.* 19:3402-3412.
- Gondor, A., and R. Ohlsson. 2009. Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature.* 461:212-217.
- Gronbaek, K., C. Hother, and P.A. Jones. 2007. Epigenetic changes in cancer. *APMIS.* 115:1039-1059.
- Halberg, R.B., J. Waggoner, K. Rasmussen, A. White, L. Clipson, A.J. Prunuske, J.W. Bacher, R. Sullivan, M.K. Washington, H.C. Pitot, J.H. Petrini, D.G. Albertson, and W.F. Dove. 2009. Long-lived Min mice develop advanced intestinal cancers through a genetically conservative pathway. *Cancer Res.* 69:5768-5775.
- Hanada, M., D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, and J.C. Reed. 1993. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 82:1820-1828.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646-674.
- Hansen, K.D., W. Timp, H.C. Bravo, S. Sabunciyan, B. Langmead, O.G. McDonald, B. Wen, H. Wu, Y. Liu, D. Diep, E. Briem, K. Zhang, R.A. Irizarry, and A.P. Feinberg. 2011. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet.* 43:768-775.
- He, Y.F., B.Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C.X. Song, K. Zhang, C. He, and G.L. Xu. 2011. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science.* 333:1303-1307.
- Hitchins, M.P., V.A. Lin, A. Buckle, K. Cheong, N. Halani, S. Ku, C.T. Kwok, D. Packham, C.M. Suter, A. Meagher, C. Stirzaker, S. Clark, N.J. Hawkins, and R.L. Ward. 2007. Epigenetic inactivation of a cluster of genes flanking MLH1 in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res.* 67:9107-9116.
- Howard, G., R. Eiges, F. Gaudet, R. Jaenisch, and A. Eden. 2008. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene.* 27:404-408.
- Huber, M.A., H.J. Maier, M. Alacakaptan, E. Wiedemann, J. Braunger, G. Boehmelt, J.B. Madwed, E.R. Young, D.R. Marshall, H. Pehamberger, T. Wirth, N. Kraut, and H. Beug. 2010. BI 5700, a Selective Chemical Inhibitor of I κ B Kinase 2, Specifically Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Mouse Models of Tumor Progression. *Genes Cancer.* 1:101-114.
- Iliou, M.S., A. Lujambio, A. Portela, O. Brustle, P. Koch, P.H. Andersson-Vincent, E. Sundstrom, O. Hovatta, and M. Esteller. 2011. Bivalent histone modifications in stem cells poise miRNA loci for CpG island hypermethylation in human cancer. *Epigenetics.* 6.
- Irizarry, R.A., C. Ladd-Acosta, B. Wen, Z. Wu, C. Montano, P. Onyango, H. Cui, K. Gabo, M. Rongione, M. Webster, H. Ji, J.B. Potash, S. Sabunciyan, and A.P. Feinberg. 2009. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* 41:178-186.

- Ito, S., L. Shen, Q. Dai, S.C. Wu, L.B. Collins, J.A. Swenberg, C. He, and Y. Zhang. 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 333:1300-1303.
- Javierre, B.M., J. Rodriguez-Ubreva, F. Al-Shahrour, M. Corominas, O. Grana, L. Ciudad, X. Agirre, D.G. Pisanó, A. Valencia, J. Roman-Gomez, M.J. Calasanz, F. Prosper, M. Esteller, R. Gonzalez-Sarmiento, and E. Ballestar. 2011. Long-range epigenetic silencing associates with deregulation of Ikaros targets in colorectal cancer cells. *Mol Cancer Res*. 9:1139-1151.
- Ji, H., L.I. Ehrlich, J. Seita, P. Murakami, A. Doi, P. Lindau, H. Lee, M.J. Aryee, R.A. Irizarry, K. Kim, D.J. Rossi, M.A. Inlay, T. Serwold, H. Karsunky, L. Ho, G.Q. Daley, I.L. Weissman, and A.P. Feinberg. 2010. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature*. 467:338-342.
- Jin, S.G., Y. Jiang, R. Qiu, T.A. Rauch, Y. Wang, G. Schackert, D. Krex, Q. Lu, and G.P. Pfeifer. 2011a. 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res*. 71:7360-7365.
- Jin, S.G., X. Wu, A.X. Li, and G.P. Pfeifer. 2011b. Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Res*. 39:5015-5024.
- Jones, P.A., and S.B. Baylin. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 3:415-428.
- Jones, P.a.B., S. B. 2007. Epigenetic Determinants of Cancer. In *Epigenetics*. C.D. Allis, Jenuwein, T. and Reinberg, D., editor. Cold Spring Harbor, NY. 457-476.
- Jorda, M., and M.A. Peinado. 2010. Methods for DNA methylation analysis and applications in colon cancer. *Mutat Res*. 693:84-93.
- Jorda, M., J. Rodriguez, J. Frigola, and M.A. Peinado. 2009. Analysis of DNA methylation by amplification of intermethylated sites (AIMS). *Methods Mol Biol*. 507:107-116.
- Jung, B., J. Gomez, E. Chau, J. Cabral, J.K. Lee, A. Anselm, P. Slowik, D. Ream-Robinson, K. Messer, J. Sporn, S.K. Shin, C.R. Boland, A. Goel, and J.M. Carethers. 2009. Activin signaling in microsatellite stable colon cancers is disrupted by a combination of genetic and epigenetic mechanisms. *PLoS One*. 4:e8308.
- Jung, B., E.J. Smith, R.T. Doctolero, P. Gervaz, J.C. Alonso, K. Miyai, T. Keku, R.S. Sandler, and J.M. Carethers. 2006. Influence of target gene mutations on survival, stage and histology in sporadic microsatellite unstable colon cancers. *Int J Cancer*. 118:2509-2513.
- Jung, B.H., S.E. Beck, J. Cabral, E. Chau, B.L. Cabrera, A. Fiorino, E.J. Smith, M. Bocanegra, and J.M. Carethers. 2007. Activin type 2 receptor restoration in MSI-H colon cancer suppresses growth and enhances migration with activin. *Gastroenterology*. 132:633-644.
- Jung, P., T. Sato, A. Merlos-Suarez, F.M. Barriga, M. Iglesias, D. Rossell, H. Auer, M. Gallardo, M.A. Blasco, E. Sancho, H. Clevers, and E. Batlle. 2011a. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med*. 17:1225-1227.
- Jung, Y., S. Lee, H.S. Choi, S.N. Kim, E. Lee, Y. Shin, J. Seo, B. Kim, W.K. Kim, H.K. Chun, W.Y. Lee, and J. Kim. 2011b. Clinical validation of colorectal cancer biomarkers identified from bioinformatics analysis of public expression data. *Clin Cancer Res*. 17:700-709.
- Kang, H.Y., and C.R. Shyr. 2011. Activins and cell migration. *Vitam Horm*. 85:129-148.
- Kanhere, A. 2010. Short RNAs are transcribed from repressed Polycomb target genes and interact with Polycomb Repressive Complex-2. *Mol. Cell*. 38:675-688.
- Khorasanizadeh, S. 2004. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 116:259-272.
- Kim, H., J. Watkinson, V. Varadan, and D. Anastassiou. 2010a. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Med Genomics*. 3:51.

- Kim, J.Y., K.D. Siegmund, S. Tavaré, and D. Shibata. 2005. Age-related human small intestine methylation: evidence for stem cell niches. *BMC Med.* 3:10.
- Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M.J. Aryee, H. Ji, L.I. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K.C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T.J. Yoon, R.A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S.H. Orkin, I.L. Weissman, A.P. Feinberg, and G.Q. Daley. 2010b. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.* 467:285-290.
- Kim, T.H., Z.K. Abdullaev, A.D. Smith, K.A. Ching, D.I. Loukinov, R.D. Green, M.Q. Zhang, V.V. Lobanenko, and B. Ren. 2007. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell.* 128:1231-1245.
- Koizumi, K., S. Hojo, T. Akashi, K. Yasumoto, and I. Saiki. 2007. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci.* 98:1652-1658.
- Kondo, Y., L. Shen, and J.P. Issa. 2003. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol.* 23:206-215.
- Kosak, S.T., and M. Groudine. 2004. Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev.* 18:1371-1384.
- Kouzarides, T. 2007a. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128:693-705.
- Kouzarides, T.a.B., S.L. 2007b. Chromatin Modifiers and Their Mechanism of Action. *In* Epigenetics. C.D. Allis, Jenuwein, T. and Reinberg, D., editor. Cold Spring Harbour, NY. 191-209.
- Ku, M., R.P. Koche, E. Rheinbay, E.M. Mendenhall, M. Endoh, T.S. Mikkelsen, A. Presser, C. Nusbaum, X. Xie, A.S. Chi, M. Adli, S. Kasif, L.M. Ptaszek, C.A. Cowan, E.S. Lander, H. Koseki, and B.E. Bernstein. 2008. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* 4:e1000242.
- Kudo, Y., K. Tateishi, K. Yamamoto, S. Yamamoto, Y. Asaoka, H. Ijichi, G. Nagae, H. Yoshida, H. Aburatani, and K. Koike. 2012. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci.*
- Kuzmichev, A., K. Nishioka, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. Reinberg. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* 16:2893-2905.
- Laird, P.W. 2010. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 11:191-203.
- Lanctot, C., T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli, and T. Cremer. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* 8:104-115.
- Lascorz, J., A. Forsti, B. Chen, S. Buch, V. Steinke, N. Rahner, E. Holinski-Feder, M. Morak, H.K. Schackert, H. Gorgens, K. Schulmann, T. Goecke, M. Kloor, C. Engel, R. Buttner, N. Kunkel, M. Weires, M. Hoffmeister, B. Pardini, A. Naccarati, L. Vodickova, J. Novotny, S. Schreiber, M. Krawczak, C.D. Broring, H. Volzke, C. Schafmayer, P. Vodicka, J. Chang-Claude, H. Brenner, B. Burwinkel, P. Propping, J. Hampe, and K. Hemminki. 2010. Genome-wide association study for colorectal cancer identifies risk polymorphisms in German familial cases and implicates MAPK signalling pathways in disease susceptibility. *Carcinogenesis.* 31:1612-1619.
- Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 3:662-673.
- Lister, R., M. Pelizzola, R.H. Downen, R.D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J.R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q.M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A.H. Millar, J.A. Thomson, B. Ren, and J.R. Ecker. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 462:315-322.
- Liu, C.F., K. Parker, and H.H. Yao. 2010. WNT4/beta-catenin pathway maintains female germ cell survival by inhibiting activin betaB in the mouse fetal ovary. *PLoS One.* 5:e10382.

- Loeb, L.A. 2001. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 61:3230-3239.
- Lopez-Serra, L., and M. Esteller. 2008. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer.* 98:1881-1885.
- Lujambio, A., S. Ropero, E. Ballestar, M.F. Fraga, C. Cerrato, F. Setien, S. Casado, A. Suarez-Gauthier, M. Sanchez-Cespedes, A. Git, I. Spiteri, P.P. Das, C. Caldas, E. Miska, and M. Esteller. 2007. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 67:1424-1429.
- Margueron, R., N. Justin, K. Ohno, M.L. Sharpe, J. Son, W.J. Drury, 3rd, P. Voigt, S.R. Martin, W.R. Taylor, V. De Marco, V. Pirrotta, D. Reinberg, and S.J. Gamblin. 2009. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature.* 461:762-767.
- Margueron, R., and D. Reinberg. 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 469:343-349.
- Mayor, R., L. Casadome, D. Azuara, V. Moreno, S.J. Clark, G. Capella, and M.A. Peinado. 2009. Long-range epigenetic silencing at 2q14.2 affects most human colorectal cancers and may have application as a non-invasive biomarker of disease. *Br J Cancer.* 100:1534-1539.
- Mayor, R., M. Munoz, M.W. Coolen, J. Custodio, M. Esteller, S.J. Clark, and M.A. Peinado. 2011. Dynamics of bivalent chromatin domains upon drug induced reactivation and resilencing in cancer cells. *Epigenetics.* 6.
- Meissner, A., T.S. Mikkelsen, H. Gu, M. Wernig, J. Hanna, A. Sivachenko, X. Zhang, B.E. Bernstein, C. Nusbaum, D.B. Jaffe, A. Gnirke, R. Jaenisch, and E.S. Lander. 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature.* 454:766-770.
- Mendivil, A., K.M. Schuler, and P.A. Gehrig. 2009. Non-endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus: a review of selected histological subtypes. *Cancer Control.* 16:46-52.
- Meng, C.F., X.J. Zhu, G. Peng, and D.Q. Dai. 2009. Promoter histone H3 lysine 9 di-methylation is associated with DNA methylation and aberrant expression of p16 in gastric cancer cells. *Oncol Rep.* 22:1221-1227.
- Merlos-Suarez, A., F.M. Barriga, P. Jung, M. Iglesias, M.V. Cespedes, D. Rossell, M. Sevillano, X. Hernando-Momblona, V. da Silva-Diz, P. Munoz, H. Clevers, E. Sancho, R. Mangués, and E. Batlle. 2011. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell.* 8:511-524.
- Merlos-Suarez, A., and E. Batlle. 2008. Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 20:194-200.
- Mikkelsen, T.S., M. Ku, D.B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T.K. Kim, R.P. Koche, W. Lee, E. Mendenhall, A. O'Donovan, A. Presser, C. Russ, X. Xie, A. Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch, C. Nusbaum, E.S. Lander, and B.E. Bernstein. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 448:553-560.
- Mills, A.A. 2010. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat Rev Cancer.* 10:669-682.
- Mohn, F., M. Weber, M. Rebhan, T.C. Roloff, J. Richter, M.B. Stadler, M. Bibel, and D. Schubeler. 2008. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell.* 30:755-766.
- Muller, J., C.M. Hart, N.J. Francis, M.L. Vargas, A. Sengupta, B. Wild, E.L. Miller, M.B. O'Connor, R.E. Kingston, and J.A. Simon. 2002. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell.* 111:197-208.
- Nagae, G., T. Isagawa, N. Shiraki, T. Fujita, S. Yamamoto, S. Tsutsumi, A. Nonaka, S. Yoshida, K. Matsusaka, Y. Midorikawa, S. Ishikawa, H. Soejima, M. Fukayama, H. Suemori, N. Nakatsuji, S. Kume, and H. Aburatani. 2011. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genet.* 20:2710-2721.

- Nekrasov, M., B. Wild, and J. Muller. 2005. Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of *Drosophila* PRC2. *EMBO Rep.* 6:348-353.
- Novak, P., T. Jensen, M.M. Oshiro, G.S. Watts, C.J. Kim, and B.W. Futscher. 2008. Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer. *Cancer Res.* 68:8616-8625.
- Nunez, E., X.D. Fu, and M.G. Rosenfeld. 2009. Nuclear organization in the 3D space of the nucleus - cause or consequence? *Curr Opin Genet Dev.* 19:424-436.
- Ohga, E., T. Matsuse, S. Teramoto, and Y. Ouchi. 2000. Activin receptors are expressed on human lung fibroblast and activin A facilitates fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Life Sci.* 66:1603-1613.
- Ohm, J.E., K.M. McGarvey, X. Yu, L. Cheng, K.E. Schuebel, L. Cope, H.P. Mohammad, W. Chen, V.C. Daniel, W. Yu, D.M. Berman, T. Jenuwein, K. Pruitt, S.J. Sharkis, D.N. Watkins, J.G. Herman, and S.B. Baylin. 2007. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet.* 39:237-242.
- Okazaki, N., N. Takahashi, S. Kojima, Y. Masuho, and H. Koga. 2002. Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis.* 23:1139-1148.
- Osborne, C.S., L. Chakalova, K.E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J.A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, and P. Fraser. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet.* 36:1065-1071.
- Ose, R., T. Yanagawa, S. Ikeda, O. Ohara, and H. Koga. 2009. PCDH24-induced contact inhibition involves downregulation of beta-catenin signaling. *Mol Oncol.* 3:54-66.
- Pan, G., S. Tian, J. Nie, C. Yang, V. Ruotti, H. Wei, G.A. Jonsdottir, R. Stewart, and J.A. Thomson. 2007. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 1:299-312.
- Pandey, R.R., T. Mondal, F. Mohammad, S. Enroth, L. Redrup, J. Komorowski, T. Nagano, D. Mancini-Dinardo, and C. Kanduri. 2008. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell.* 32:232-246.
- Park, J.H., J. Park, J.K. Choi, J. Lyu, M.G. Bae, Y.G. Lee, J.B. Bae, D.Y. Park, H.K. Yang, T.Y. Kim, and Y.J. Kim. 2011. Identification of DNA methylation changes associated with human gastric cancer. *BMC Med Genomics.* 4:82.
- Pauler, F.M., M.A. Sloane, R. Huang, K. Regha, M.V. Koerner, I. Tamir, A. Sommer, A. Aszodi, T. Jenuwein, and D.P. Barlow. 2009. H3K27me3 forms BLOCs over silent genes and intergenic regions and specifies a histone banding pattern on a mouse autosomal chromosome. *Genome Res.* 19:221-233.
- Paz, M.F., M.F. Fraga, S. Avila, M. Guo, M. Pollan, J.G. Herman, and M. Esteller. 2003. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 63:1114-1121.
- Perucho, M., M.A. Peinado, Y. Ionov, S. Casares, S. Malkhosyan, and E. Stanbridge. 1994. Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 59:339-348.
- Peters, A.H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, and T. Jenuwein. 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 107:323-337.
- Phillips, J.E., and V.G. Corces. 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell.* 137:1194-1211.
- Pinto, M. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell.* 47:323-330.

- Portela, A., and M. Esteller. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 28:1057-1068.
- Poulaki, V., N. Mitsiades, F.E. Kruse, S. Radetzky, E. Iliaki, B. Kirchhof, and A.M. Jousseaume. 2004. Activin a in the regulation of corneal neovascularization and vascular endothelial growth factor expression. *Am J Pathol.* 164:1293-1302.
- Psaila, B., and D. Lyden. 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 9:285-293.
- Puppa, G., A. Sonzogni, R. Colombari, and G. Pelosi. 2010. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Arch Pathol Lab Med.* 134:837-852.
- Rada-Iglesias, A., S. Enroth, R. Andersson, A. Wanders, L. Pahlman, J. Komorowski, and C. Wadelius. 2009. Histone H3 lysine 27 trimethylation in adult differentiated colon associated to cancer DNA hypermethylation. *Epigenetics.* 4:107-113.
- Radtke, F., and H. Clevers. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science.* 307:1904-1909.
- Raevskaya, N.M., L.V. Dergunova, I.P. Vladychenskaya, V.V. Stavchansky, M.V. Oborina, A.B. Poltaraus, and S.A. Limborska. 2005. Structural organization of the human complexin 2 gene (CPLX2) and aspects of its functional activity. *Gene.* 359:127-137.
- Raynal, N.J., J. Si, R.F. Taby, V. Gharibyan, S. Ahmed, J. Jelinek, M.R. Estecio, and J.P. Issa. 2012. DNA Methylation Does Not Stably Lock Gene Expression but Instead Serves as a Molecular Mark for Gene Silencing Memory. *Cancer Res.*
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 293:1089-1093.
- Riddle, N.C., A. Minoda, P.V. Kharchenko, A.A. Alekseyenko, Y.B. Schwartz, M.Y. Tolstorukov, A.A. Gorchakov, J.D. Jaffe, C. Kennedy, D. Linder-Basso, S.E. Peach, G. Shanower, H. Zheng, M.I. Kuroda, V. Pirrotta, P.J. Park, S.C. Elgin, and G.H. Karpen. 2011. Plasticity in patterns of histone modifications and chromosomal proteins in Drosophila heterochromatin. *Genome Res.* 21:147-163.
- Rinn, J.L. 2007. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 129:1311-1323.
- Robertson, K.D., and A.P. Wolffe. 2000. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 1:11-19.
- Robinson, M.D., C. Storz, A.L. Statham, M.W. Coolen, J.Z. Song, S.S. Nair, D. Strbenac, T.P. Speed, and S.J. Clark. 2010. Evaluation of affinity-based genome-wide DNA methylation data: effects of CpG density, amplification bias, and copy number variation. *Genome Res.* 20:1719-1729.
- Rodriguez, J., M. Munoz, L. Vives, C.G. Frangou, M. Groudine, and M.A. Peinado. 2008. Bivalent domains enforce transcriptional memory of DNA methylated genes in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:19809-19814.
- Roy, S., J. Ernst, P.V. Kharchenko, P. Kheradpour, N. Negre, M.L. Eaton, J.M. Landolin, C.A. Bristow, L. Ma, M.F. Lin, S. Washietl, B.I. Arshinoff, F. Ay, P.E. Meyer, N. Robine, N.L. Washington, L. Di Stefano, E. Berezikov, C.D. Brown, R. Candeias, J.W. Carlson, A. Carr, I. Jungreis, D. Marbach, R. Sealfon, M.Y. Tolstorukov, S. Will, A.A. Alekseyenko, C. Artieri, B.W. Booth, A.N. Brooks, Q. Dai, C.A. Davis, M.O. Duff, X. Feng, A.A. Gorchakov, T. Gu, J.G. Henikoff, P. Kapranov, R. Li, H.K. MacAlpine, J. Malone, A. Minoda, J. Nordman, K. Okamura, M. Perry, S.K. Powell, N.C. Riddle, A. Sakai, A. Samsonova, J.E. Sandler, Y.B. Schwartz, N. Sher, R. Spokony, D. Sturgill, M. van Baren, K.H. Wan, L. Yang, C. Yu, E. Feingold, P. Good, M. Guyer, R. Lowdon, K. Ahmad, J. Andrews, B. Berger, S.E. Brenner, M.R. Brent, L. Cherbass, S.C. Elgin, T.R. Gingeras, R. Grossman, R.A. Hoskins, T.C. Kaufman, W. Kent, M.I. Kuroda, T. Orr-Weaver, N. Perrimon, V. Pirrotta, J.W. Posakony, B. Ren, S. Russell, P. Cherbass, B.R. Graveley, S. Lewis, G. Micklem, B. Oliver, P.J. Park, S.E. Celniker, S. Henikoff, G.H. Karpen, E.C. Lai, D.M. MacAlpine, L.D. Stein, K.P. White, and M. Kellis. 2010.

- Identification of functional elements and regulatory circuits by Drosophila modENCODE. *Science*. 330:1787-1797.
- Saaf, A.M., J.M. Halbleib, X. Chen, S.T. Yuen, S.Y. Leung, W.J. Nelson, and P.O. Brown. 2007. Parallels between global transcriptional programs of polarizing Caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer. *Mol Biol Cell*. 18:4245-4260.
- Sabates-Bellver, J., L.G. Van der Flier, M. de Palo, E. Cattaneo, C. Maake, H. Rehrauer, E. Laczko, M.A. Kurowski, J.M. Bujnicki, M. Menigatti, J. Luz, T.V. Ranalli, V. Gomes, A. Pastorelli, R. Faggiani, M. Anti, J. Jiricny, H. Clevers, and G. Marra. 2007. Transcriptome profile of human colorectal adenomas. *Mol Cancer Res*. 5:1263-1275.
- Sadikovic, B., T.R. Haines, D.T. Butcher, and D.I. Rodenhiser. 2004. Chemically induced DNA hypomethylation in breast carcinoma cells detected by the amplification of intermethylated sites. *Breast Cancer Res*. 6:R329-337.
- Sakatani, T., A. Kaneda, C.A. Iacobuzio-Donahue, M.G. Carter, S. de Boom Witzel, H. Okano, M.S. Ko, R. Ohlsson, D.L. Longo, and A.P. Feinberg. 2005. Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science*. 307:1976-1978.
- Samuel, M.S., H. Suzuki, M. Buchert, T.L. Putoczki, N.C. Tebbutt, T. Lundgren-May, A. Christou, M. Inglese, M. Toyota, J.K. Heath, R.L. Ward, P.M. Waring, and M. Ernst. 2009. Elevated Dnmt3a activity promotes polyposis in Apc(Min) mice by relaxing extracellular restraints on Wnt signaling. *Gastroenterology*. 137:902-913, 913 e901-911.
- Sangiorgi, E., and M.R. Capecchi. 2008. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet*. 40:915-920.
- Sato, T., J.H. van Es, H.J. Snippert, D.E. Stange, R.G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N.F. Shroyer, M. van de Wetering, and H. Clevers. 2011. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 469:415-418.
- Sato, T., R.G. Vries, H.J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D.E. Stange, J.H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, and H. Clevers. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 459:262-265.
- Schlesinger, Y., R. Straussman, I. Keshet, S. Farkash, M. Hecht, J. Zimmerman, E. Eden, Z. Yakhini, E. Ben-Shushan, B.E. Reubinoff, Y. Bergman, I. Simon, and H. Cedar. 2007. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*. 39:232-236.
- Schmitges, F.W., A.B. Prusty, M. Faty, A. Stutzer, G.M. Lingaraju, J. Aiwanian, R. Sack, D. Hess, L. Li, S. Zhou, R.D. Bunker, U. Wirth, T. Bouwmeester, A. Bauer, N. Ly-Hartig, K. Zhao, H. Chan, J. Gu, H. Gut, W. Fischle, J. Muller, and N.H. Thoma. 2011. Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell*. 42:330-341.
- Schoeftner, S., A.K. Sengupta, S. Kubicek, K. Mechtler, L. Spahn, H. Koseki, T. Jenuwein, and A. Wutz. 2006. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J*. 25:3110-3122.
- Schuettengruber, B., D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc, and G. Cavalli. 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 128:735-745.
- Seder, C.W., W. Hartojo, L. Lin, A.L. Silvers, Z. Wang, D.G. Thomas, T.J. Giordano, G. Chen, A.C. Chang, M.B. Orringer, and D.G. Beer. 2009. INHBA overexpression promotes cell proliferation and may be epigenetically regulated in esophageal adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 4:455-462.
- Segditsas, S., O. Sieber, M. Deheragoda, P. East, A. Rowan, R. Jeffery, E. Nye, S. Clark, B. Spencer-Dene, G. Stamp, R. Poulson, N. Suraweera, A. Silver, M. Ilyas, and I. Tomlinson. 2008. Putative direct and indirect Wnt targets identified through consistent gene expression changes in APC-mutant intestinal adenomas from humans and mice. *Hum Mol Genet*. 17:3864-3875.
- Shibata, D. 2009. Inferring human stem cell behaviour from epigenetic drift. *J Pathol*. 217:199-205.

- Shimizu, S., N. Seki, T. Sugimoto, S. Horiguchi, H. Tanzawa, T. Hanazawa, and Y. Okamoto. 2007. Identification of molecular targets in head and neck squamous cell carcinomas based on genome-wide gene expression profiling. *Oncol Rep.* 18:1489-1497.
- Simonis, M., P. Klous, E. Splinter, Y. Moshkin, R. Willemsen, E. de Wit, B. van Steensel, and W. de Laat. 2006. Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet.* 38:1348-1354.
- Snippert, H.J., L.G. van der Flier, T. Sato, J.H. van Es, M. van den Born, C. Kroon-Veenboer, N. Barker, A.M. Klein, J. van Rheenen, B.D. Simons, and H. Clevers. 2010. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell.* 143:134-144.
- Sodir, N.M., X. Chen, R. Park, A.E. Nickel, P.S. Conti, R. Moats, J.R. Bading, D. Shibata, and P.W. Laird. 2006. Smad3 deficiency promotes tumorigenesis in the distal colon of ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* 66:8430-8438.
- Splinter, E., H. Heath, J. Kooren, R.J. Palstra, P. Klous, F. Grosveld, N. Galjart, and W. de Laat. 2006. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Dev.* 20:2349-2354.
- Steenman, M.J., S. Rainier, C.J. Dobry, P. Grundy, I.L. Horon, and A.P. Feinberg. 1994. Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. *Nat Genet.* 7:433-439.
- Steward, M.M., J.S. Lee, A. O'Donovan, M. Wyatt, B.E. Bernstein, and A. Shilatifard. 2006. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol.* 13:852-854.
- Surface, L.E., S.R. Thornton, and L.A. Boyer. 2010. Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. *Cell Stem Cell.* 7:288-298.
- Szenker, E., D. Ray-Gallet, and G. Almouzni. 2011. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.* 21:421-434.
- Tahiliani, M., K.P. Koh, Y. Shen, W.A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L.M. Iyer, D.R. Liu, L. Aravind, and A. Rao. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 324:930-935.
- Takeda, N., R. Jain, M.R. LeBoeuf, Q. Wang, M.M. Lu, and J.A. Epstein. 2011. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science.* 334:1420-1424.
- Takeo, A., I. Takemasa, Y. Doki, M. Yamasaki, H. Miyata, S. Takiguchi, Y. Fujiwara, K. Matsubara, and M. Monden. 2008. Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. *Br J Cancer.* 99:1307-1315.
- Talbert, P.B., and S. Henikoff. 2010. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:264-275.
- Tarafa, G., E. Prat, R.A. Risques, S. Gonzalez, J. Camps, M. Grau, E. Guino, V. Moreno, M. Esteller, J.G. Herman, J.R. Germa, R. Miro, M.A. Peinado, and G. Capella. 2003. Common genetic evolutionary pathways in familial adenomatous polyposis tumors. *Cancer Res.* 63:5731-5737.
- Tiwari, V.K., K.M. McGarvey, J.D. Licchesi, J.E. Ohm, J.G. Herman, D. Schubeler, and S.B. Baylin. 2008. PcG proteins, DNA methylation, and gene repression by chromatin looping. *PLoS Biol.* 6:2911-2927.
- Toribara, N.W., and M.H. Sleisenger. 1995. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med.* 332:861-867.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4350-4354.

- van der Flier, L.G., and H. Clevers. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 71:241-260.
- Van der Flier, L.G., J. Sabates-Bellver, I. Oving, A. Haegebarth, M. De Palo, M. Anti, M.E. Van Gijn, S. Suijkerbuijk, M. Van de Wetering, G. Marra, and H. Clevers. 2007. The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology.* 132:628-632.
- van Steensel, B. 2011. Chromatin: constructing the big picture. *EMBO J.* 30:1885-1895.
- van Steensel, B., and J. Dekker. 2010. Genomics tools for unraveling chromosome architecture. *Nat Biotechnol.* 28:1089-1095.
- Vaquero, A., R. Sternglanz, and D. Reinberg. 2007. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene.* 26:5505-5520.
- Villardell Tarrés, M. 1990. Tumors malignes d'intestí gros. In Enciclopedia de Medicina i Salut. Vol. Aparell digestiu. F.E.C. Editor, editor, Barcelona.
- Vire, E., C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J.M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de Launoit, and F. Fuks. 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 439:871-874.
- Vogelstein, B., and K.W. Kinzler. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 10:789-799.
- Vries, R.G., M. Huch, and H. Clevers. 2010. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol.* 4:373-384.
- Wacker, I., M. Sachs, K. Knaup, M. Wiesener, J. Weiske, O. Huber, Z. Akcetin, and J. Behrens. 2009. Key role for activin B in cellular transformation after loss of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Mol Cell Biol.* 29:1707-1718.
- Walton, K.L., Y. Makanji, D.M. Robertson, and C.A. Harrison. 2011. The synthesis and secretion of inhibins. *Vitam Horm.* 85:149-184.
- Wang, Z., C. Zang, J.A. Rosenfeld, D.E. Schones, A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T.Y. Roh, W. Peng, M.Q. Zhang, and K. Zhao. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet.* 40:897-903.
- Watanabe, R. 2011. Activin receptor-like kinase and the insulin gene. *Vitam Horm.* 85:1-27.
- Weber, M., I. Hellmann, M.B. Stadler, L. Ramos, S. Paabo, M. Rebhan, and D. Schubeler. 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 39:457-466.
- Wei, Y., W. Xia, Z. Zhang, J. Liu, H. Wang, N.V. Adsay, C. Albarracin, D. Yu, J.L. Abbruzzese, G.B. Mills, R.C. Bast, Jr., G.N. Hortobagyi, and M.C. Hung. 2008. Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. *Mol Carcinog.* 47:701-706.
- Weisenberger, D.J., M. Campan, T.I. Long, M. Kim, C. Woods, E. Fiala, M. Ehrlich, and P.W. Laird. 2005. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.* 33:6823-6836.
- Wen, B., H. Wu, Y. Shinkai, R.A. Irizarry, and A.P. Feinberg. 2009. Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nat Genet.* 41:246-250.
- Weng, Y.I., T.H. Huang, and P.S. Yan. 2009. Methylated DNA immunoprecipitation and microarray-based analysis: detection of DNA methylation in breast cancer cell lines. *Methods Mol Biol.* 590:165-176.
- Wildi, S., J. Kleeff, H. Maruyama, C.A. Maurer, M.W. Buchler, and M. Korc. 2001. Overexpression of activin A in stage IV colorectal cancer. *Gut.* 49:409-417.
- Wu, H., B. Caffo, H.A. Jaffee, R.A. Irizarry, and A.P. Feinberg. 2010. Redefining CpG islands using hidden Markov models. *Biostatistics.* 11:499-514.

- Yamada, Y., L. Jackson-Grusby, H. Linhart, A. Meissner, A. Eden, H. Lin, and R. Jaenisch. 2005. Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13580-13585.
- Yao, H.H., J. Aardema, and K. Holthusen. 2006. Sexually dimorphic regulation of inhibin beta B in establishing gonadal vasculature in mice. *Biol Reprod.* 74:978-983.
- Yatabe, Y., S. Tavaré, and D. Shibata. 2001. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10839-10844.
- Zhang, L., M. Deng, R. Parthasarathy, L. Wang, M. Mongan, J.D. Molkentin, Y. Zheng, and Y. Xia. 2005. MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol Cell Biol.* 25:60-65.
- Zhao, J., B.K. Sun, J.A. Erwin, J.J. Song, and J.T. Lee. 2008. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science.* 322:750-756.
- Zhao, X.D., X. Han, J.L. Chew, J. Liu, K.P. Chiu, A. Choo, Y.L. Orlov, W.K. Sung, A. Shahab, V.A. Kuznetsov, G. Bourque, S. Oh, Y. Ruan, H.H. Ng, and C.L. Wei. 2007. Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 1:286-298.
- Zhu, L., P. Gibson, D.S. Currele, Y. Tong, R.J. Richardson, I.T. Bayazitov, H. Poppleton, S. Zakharenko, D.W. Ellison, and R.J. Gilbertson. 2009. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature.* 457:603-607.
- Zlatanova, J., and P. Caiafa. 2009. CTCF and its protein partners: divide and rule? *J Cell Sci.* 122:1275-1284.



APÈNDIX

1. Primers emprats.

LOCATION	GENE	FORWARD PRIMER OUTER (5'-3')	REVERSE PRIMER OUTER (5'-3')	FORWARD PRIMER INNER (5'-3')	REVERSE PRIMER INNER (5'-3')	PRODUCT POSITION (GRCh37/hg19)
Promoter CpG 41 and shore	ACVR1b	GGGGGTTTAGGGTGA	AACCTCCAAATCTTAAAA	GGGATGGAGAGGGTT	ATCTTAAACTAAAAACTCAA	chr12:52345347-52345643
Promoter CpG 84	ACVR1c	GTAGATTTTTTTTTTAGTTTTT	TTCTAAATATCTAATCCC	GAGTAGTAGGAGAGTTTG	CCTACCCCTACAACAACAA	chr2:158485109-158485492
Promoter CpG123	ACVR2a	GGGAATGGATTTAAGTTG	CTCAAAATCCCTAAACTAT	GTGTGTAGAAGTTGTAG	CTCAAAATCCCTAAACTAT	chr2:148601399-148601773
Promoter CpG181	ACVR2B	GTATTATTTGTATTAGTTTTT	TTCCATCTTACCCACC	GATTTTTGTTTGTGTAGTTAT	CCCTCCCAAAATACCCAA	chr3:38496052-38496499

Taula A1. Primers humans per la seqüenciació directa de bisulfit.

GENE	FORWARD PRIMER (5'-3')	REVERSE PRIMER (5'-3')	PRODUCT LENGTH (nt)	PRODUCT POSITION (NCBI37/mm9)
INH-β _A	GAGGGCAGAAATGAATGAACCTT	GCACGCTCCACCCTGAC	132	chr7:41730071-41739646
INH-α	GTTCTGGCCAAAGGTGAGG	GCCGGAAACATGTATCTGAAG	265	chr2:220437181-220439496
ACVR2a	ATTGTTTTGCTACCTGGAAGAA	CATTACACATATTTGCCCTCACA	159	chr2:148653990-148657097
ACVR2b	GTGGCCACTGAGGAGAACC	AAAGCCAGCAGGACGAT	201	chr3:38519362-38519732
ACVR1	CACATTCGAAGGGCTCATCAC	TTGTACCAGAAAAAGGAAGCCA	109	chr2:158630640-158634691
ACVR1b	CCACTGCTGCTACACTGACTACT	TTAATGACAAGGAAAAACAATGATG	171	chr12:52369236-52370228
ACVR1c	CAAAAGCTGACATCTAATTCTG	AACAACCTTTCTCATTTCCCTATC	148	chr2:158395136-158397669
E-CADHERIN	AGGAGGTCTTAAGGGGTCTGT	TGGCGGCATTGTAGGTGT	108	chr16:68844203-68845652
VIMENTIN	TGCAGGCTCAGATTTCAGG	GCAGGGCGCATTGTTC	195	chr10:17275782-17276737
VEGFa	CGAGGGCCTGGAGTGTG	ATGTGCTGGCCCTTGGTGA	84	chr6:43745354+43746231

Taula A2. Primers humans per l'anàlisi d'expressió d'RNA.

LOCATION	GENE	FORWARD PRIMER OUTER (5'-3')	REVERSE PRIMER OUTER (5'-3')	FORWARD PRIMER INNER (5'-3')	REVERSE PRIMER INNER (5'-3')	PRODUCT LENGTH (nt)	PRODUCT POSITION (NCBI37/mm9)
Promoter CpG 57	TSN	GTAGTAAAAAGTTTGTAGTTT	ATTTCCTAAATACCTATCTAC	TTGGTTGTTTATAATAGTTAGT	CTCCCTTAAATTAACACTACC	358	chr1:120207648-120208005
Promoter CpG 244 (a)	INHBB	GAATTTATTTGTTTTGTAAG	ATAAAAAACACATCTTAAAC	GTTTTGTAAAGTTGATGAT	ATAAAAAACACATCTTAAAC	215	chr1:121317206-121317420
Promoter CpG 244 (b)	INHBB	GTAGTATAGAAAGGATTG	ATCATCAACTTTACAAAAAC	GTAGTATAGAAAGGATTG	ACCACAAAAACACAAAAAC	174	chr1:121317021-121317194
Promoter CpG 244	INHBB	GTGAGTTAGGATGAAGGT	ATAACTTCTAAACAACAATAAAA	GTAAGGATTTGTAGTTGGG	CAATAAAAAACACATCTTAAAC	426	chr1:121316997-121317422
Promoter CpG 52	RALBB	TGGAATTAGAGGTTGTAAT	CTTCTATCAACTCAATCTTTC	GTATAGTATTTTATTTGGGGG	CACAACCTTAACCTAACCTCC	476	chr1:121401139-121401614
Promoter CpG 106	PTPN4	GATTTATTAAGAAAGGGAAG	TACACTCTCACACAAAAC	ATATAAAAGGATGAGGTTT	AAACTTAAAAAAACTTAACCTTC	287	chr1:121733539-121733825
Promoter	SCTR	GATATTTAGTTTTGAAGAGT	CCTAAATACAAATATCTAACAC	ATAAAGGGGATTAATAGTGGG	ACTACAAAATATCTCTAAAAAAA	356	chr1:121903807-121904162
Promoter and shore (a)	EN1	TTTGAAGGGGGGAGGG	TCTTTACAAAACTCTCTC	TATAAATGGGGGTAGGGT	AMACACACTTTTACCTTCA	217	chr1:122498724-122498940
Promoter CpG47 and shore (b)	EN1	TTAATATTGAAATTTGTTGTT	CTACTATCTTCCATCTC	TTATGTTATTTGGATGTTTATA	CTCCCCACCCACTTTTA	196	chr1:122499359-122499554
Promoter CpG 90 (c)	EN1	AAAGTGGGTGGGGAG	ACCAAAACTTAAACAACAAAAC	AGTATGGAAGAATAGTAGT	AACTATTCCTTTTACAACC	380	chr1:122499607-122499886
Promoter CpG 90	EN1	AGTAGTAGGAGGGAAGT	CTTAAAAATCTAAACATAACCT	GATTGGTGTAGTAGAGATT	CTAAACACATAACACATCCC	460	chr1:122500074-122500534
Exon 2 CpG 32	EN1	AGTAGTTGAGAGATTAAGG	TTTTTCCCCATAACACCTA	GGAGTTTGTAGTTGAATGAGTT	TATTCCTATATAAATGCCACTC	344	chr1:122503601-122503945
Promoter CpG 44	INSIG2	TTTTGATGTTTTTATTGTTAG	AACTCTCTCTCCGCCAA	TAAAGTTGTTTTTTTATGAGTT	CAAAAATCCCACCTCCCTTC	473	chr1:123224046-123224518
Promoter CpG 46	DDX18	GAACCTGGGGAAGAAGT	AAACTCTAAACCATTAAACAAA	GGTAGAATTAATGAAGGGTTTA	CTCTCACAAAAACTATTTCC	365	chr1:123464218-123464582
Promoter CpG 51	DRD1	ATTTTGGTAAAGATAGAATTT	AAAAACTACCTCTCCACC	GTTGAGTTGTTATTGAGTGT	CTTATAACTTAAACCTACTAA	274	chr13:54150867-54151140
Promoter CpG 65	SFXN1	GGGGTTGTAGGGGATTA	AAAAACAAAACTTAATAAT	GTTGGGGTATGTTTTGAGG	TCCCTTAAAAAAATTTAAAAACTAA	326	chr13:54167404-54167729
Promoter CpG 29	HRH2	GTTAGTTTTATTTTTGTTTAGT	CTAACATCCCTCACATCC	ATTTTTGTTTTAGTTAGTGAAG	TAACTCATAACCCCTTTTAA	331	chr13:54287487-54287817
Promoter CpG 87	CPLX2 VARI	GTTGGATTTAGTTTAGTTAT	CCCTCCAAAACTTCCCTAT	GGGTTTGTAGTTAGGATTGGG	CTCAACCTCACACTTTCTAA	238	chr13:54398658-54398895
Promoter CpG87 (b)	CPLX2 VARI	TTTAATAGGGGGGATTTT	CCCAATCCTAACTAAACC	GGAGGAGTGAGGAGGA	ATAACTAAACCTAAATCCAAC	477	chr13:54398127-54398603
Promoter CpG87 and shore	CPLX2 VARI	AGGTGTATAGATATGGAG	AAAAATAAAAAACAAAAAAC	GTTTATAAATTTAAGATAGAG	TAAAAACTACAAATTCCTCC	364	chr13:54397851-54398214
Promoter CpG 47	CPLX2 VAR2	GGAGTTTTGTAGTGGTTTAG	AAATAACTCTCTACTCCTATAA	GGTTGTGGGATTAATAGGT	TCCAAAATTCACACTTAAATCTC	329	chr13:54472922-54473250
Promoter CpG47 and shore	CPLX2 VAR2	AGTTTAGTTGTAGGTAGAT	ATCTTAAAAACCCCTCAA	AGGTTTTGAATTTTTTTTTTG	CCTAATAATCCCAACAC	230	chr13:54472711-54472940
Promoter CpG 54	THOC3	GTGTTTTATAAGTTTATTAGT	AAAAATCAATCCTATTTCAAA	GAGTGTATTTTAGTATTGTG	CAAACTCAAAATATCCAAC	228	chr13:54569990-54570217
Promoter CpG 52	CLTB	TATTTTTGGTTATTTGGAGAGT	ATCAACTAAAAAAAACTTTTTC	GAGTATAGTAGGATTTAGGT	ACCAACCCAACTACTACTAACA	522	chr13:54712339-54712860
Promoter CpG 98	RNF44	TGATGGTTTTGTGTTAGTG	CCTTTTCCCCCCCCCC	GATTTTTAGTTATTTGGTTGTT	CCACTAAAAAATTCCTATTAC	372	chr13:54795420-54795791
Promoter	PCLKC	TTGAGGAGGTGTGTTTTT	CTCCACTCCAAATACC	AGAAGAGGTGGAGATGGT	CTCAATCCAAAAACAAC	182	chr13:54802784-54802965
Promoter CpG 42	SNCB	TTTAGGTTTTAGAGTTATGTT	AATCCATCCATCCCAAC	GGAGATTTGTAATTTTGTAGGT	CCACAACCTCCATCCCC	416	chr13:54867287-54867702
Promoter CpG 73	TSPAN17	GTTTGGGGTTTATTAGAGG	CAATAATAAAAACCAACAAAAA	GGAGTTTGTAGAGGATTAAGTT	TCCTAAAAATTAATACTACTACC	413	chr13:54890572-54890984
Promoter CpG44	LGR5	GAGTTGTAGAGGGTAG	TATATTCTTTCAATCCATAA	GGGAGTTTTTTTTTTTGAAGT	CCCTAAATATCCCTTTAAAT	409	chr10:115024740-115025149

Taula A3. Primers murins per la seqüenciació directa de bisulfit

GENE	FORWARD PRIMER (5'-3')	REVERSE PRIMER (5'-3')	PRODUCT LENGTH (nt)	PRODUCT POSITION (NCBI37/mm9)
mGAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	GATGCAGGGATGATGTTTC	176	chr9:51810166-51856810
mB2M	GCTATCCAGAAAACCCCTCAA	CATGTCTCGATCCCAGTAGACGGT	300	chr2:121973423-121978818
18s	TTGACGGGAAGGGCACCACCAG	GCACCACCACCCACGGAAATCG	130	chr17:39984505-39984635
L7	GAAGCTCATCTATGAGAAGGC	AAGACGAAGGAGCTGCAGAAC	202	chr1:16092859-16093398
SDHA	AGTGCGGGTCGATGAGTATGAT	TATGAGGGGAAACGCAGGTAAG	271	chr13:74460466-74461403
ACTB	CTGCGTTTTACACCCTTTCTT	ACGCGACCATCCTCCTCTTA	283	chr5:143665069-143665460
Ki67	CTGCCCGACCCTACAAAATG	CTGCTGCTGCTTCTCCTTCAC	119	chr7:142893694-142895822
FABP2	ACACGTGTAGACAATGGAAAGGAG	CTCTGAGAAGTTGACTTATTC	132	chr3:122601661-122602214
TSN	TCTTCTGGCAGCATTTGTG	GTAGTCTCCAGCAGTGACAC	197	chr1:120197576-120201854
GLI2	TCCACACACCCGCAACAC	TGGCTCAGCATCGTCACTTC	147	chr1:120734652-120736874
INHBB	GCGTCTCCGAGATCATCA	ACATAGGGGAGCAGTTTCAG	148	chr1:121314560-121317236
RALBB	AGGACAAGATCCCCTGCTG	TTTTTGCCCGGATTTCTCTC	185	chr1:121368366-121372620
PTPN4	AGAGGGCTGAAAAGAAGAG	GTGGATAAACTGGCTGATTG	123	chr1:121564144-121572165
SCTR	GGGGTTCTCCAGCCATTTTGTG	AGGGATCAGCAGGAGGGTGGACTT	260	chr1:121950248-121953004
MARCO	CCAGAGGGAGAGCACTTAGCA	CCACACCCGCATCTTCATTA	153	chr1:122371247-122373163
EN1	TACTGCACACGCTATTCGG	TGGGACTCATTACGGCTG	209	chr1:122500465-122503624
INSIG2	CTCTATGTCCGTTCTTGTTG	ATAAGACGTCTGCCCTCTTC	141	chr1:123202465-123203521
DDX18	ACTCTCACTCTCAAGCAG	TTTCTGGTAGCCGAATCCGC	164	chr1:123450651-123451891
DRD1	AGTCGGGGAGCGTGGTCT	CAATCTCAGTCACTTTTCGGG	131	chr13:54149879-54150956
SFXN1	TGGTTGGCTTTTGTGTTGTTTTC	ACACGCCGATTTTACAGGAT	136	chr13:49125318-54201950
HRH2	CAGTGCAAGCGCGAGTCCTAA	GAGACTGAGGCACTGCTGGATG	221	chr13:54287501-54309096
CPLX2var1	GTGCTATCTACTCTGCTTGGTGTG	CAGGCTTTGGTTAATGCTCTC	145	chr13:54407413-54480028
CPLX2var2	CCCTGCAGTGGCTTAGACG	CATCCTGCAGGCTTTGGTTA	127	chr13:54472904-54480035
THOC3	CATCAATGCCATCCTTCTAACT	CCAGCATTTTCCATCGTG	148	chr13:54564881-54565177
CLTB	ACCTGGAGGAGTGAACC	TGCTGCTCTGGGATTGAAG	144	chr13:54695303-54700143
RNF44	CTTTCAATGCTGCCAATGTCA	TGTCAGGGTTAAAGCGATACGA	139	chr13:54783496-54783777
pcLKC (a)	TGAGAACTCTGTGGACTTGG	CTTTTCTGCTGTTCCGCTCG	142	chr13:54836655-54837896
pcLKC (b)	TCAGCTGCTTCTGGGGG	TCTGGCAGGGTTACTAATGTC	154	chr13:54802898-54814343
pcLKC (c)	AACCTGCCAGAGGACTTAC	GTTCCGCTTGACGGAGAAG	127	chr13:54814332-54815377
SNCB	AGCAGGCATCGCATCTGG	GGCTCGTATTCTGGTATTC	214	chr13:54860880-54864104
TSPAN17	CCCTTTTCTGCTGTGTTAG	CACGATCAGGTTGTCTTGTAG	159	chr13:54896510-54897407

Taula A4. Primers murins per l'anàlisi d'expressió d'RNA.

LOCATION	GENE	FORWARD PRIMER (5'-3')	REVERSE PRIMER (5'-3')	PRODUCT LENGTH (nt)	PRODUCT POSITION (NCBI37/mm9)
Promoter	GAPDH	TCCCCTCCCCCTATCAGTTC	CATTTCCCTCCTCCCTCTC	91	chr6:125115783-125115873
Promoter	MSUBTEL	ATGCCTTCTGGTTGCCTACTGTT	GCACCTGCACCTACCATCTTTT	131	chr1:197167796-197167926
Promoter	LGR5	GAAGCGCCAGCACTCC	CTCCTCCCTCCACCATCC	78	chr10:115024926-115025003
Promoter	TSN	CCTGCCGTCGGGATTCTG	GTCGCCGTCGCCACTG	162	chr1:120207733-120207894
Promoter	GLI2	GGTGCTTTCCTTGCTGG	GATCGTCGGTCCTTAG	142	chr1:120950326-120950467
Promoter	INHBB	GGGAAAGAGCGGAGGGAAGA	CAGTGCGGGAGGAGACG	124	chr1:121318896-121319019
Promoter	RALBB	CATTGGTGAAGTTTGAAGTA	GAATCGCCGCTCTCACG	227	chr1:121401198-121401424
Promoter	PTPN4	CGCGCTTCCCTGCTC	ACGCGCCCCGAAAGTG	137	chr1:121733762-121733898
Promoter	SCTR	CTGCTCTATGCGGGTGTCT	GAATAGCAGGGAGGGTTGG	85	chr1:121903482-121903566
Promoter	MARCO	ACTATAGTTTGGATTTGGTCTG	TGCTTCTCTTTATGTTTTCTC	158	chr1:122401674-122401831
5' to promoter	EN1	CCCATTAAGACCAATCACTGA	CTCTGGTGGAGCAAATCTC	148	chr1:122499273-122499420
5' to promoter	EN1	CGGCACTGGCGGAGAC	TAGGCAGTAGAGGGGTTTGAC	121	chr1:122499022-122499142
Promoter	EN1	CGCTCGCCTTTCTTTTTTC	TCCCCACCCACTTTGCC	113	chr1:122499441-122499553
Exon1	EN1	CCGCACCACCAACTTTTTTC	CCTCGGTCACGCTCCAC	150	chr1:122499921-122500070
Exon1	EN1	ACAGTGGCGGTGGTAGTGG	CGGTCCGAATAGCGTGTG	181	chr1:122500307-122500487
Intron1	EN1	GCTCCAGTTTTTGCCTTTGAT	AGCGCCCTTCCCTACTAA	124	chr1:122500713-122500836
Promoter	INSIG2	AGCCTCTCCTCCTCCAG	CTTACAGCTGACGGTAGG	149	chr1:123224389-123224537
Promoter	DDX18	TAGCAGTGAAGGGAAGAGA	TACAAACCAAGACTGCACAATAAA	85	chr1:123464682-123464766
Promoter	DRD1	GAGGCCCTGCATCTTGTTA	CCGGGGCCTCTGGTTTC	94	chr13:54151117-54151210
Promoter	SFXN1	CAGTGTGGCCAGAAGCAGAAG	GCCCCGCCAGAGGT	112	chr13:54167067-54167178
Promoter	HRH2	AAAGGAGCGGCTTTCAGAAC	TTACCTGGTGTGCTGCTG	162	chr13:54287405-54287566
Promoter	CPLX2var1	ACAGCTGAACAGGTAGGTG	ACTCGTAGCTCTGTCTTGAA	120	chr13:54397762-54397881
Promoter	CPLX2var2	GAGGTGATTACTTGAGTTTCTG	TGCAGTAGGCTTCATTCC	123	chr13:54472357-54472479
Promoter	THOC3	CTGCATGGCGGATTTGT	GCGCCGGAAGCTGGATACT	118	chr13:54570190-54570307
Promoter	CLTB	TGCTGGCACGCTCTGGA	CCGGCTTGCTGTCACTG	159	chr13:54712689-54712847
Promoter	RNF44	CCATTGCACGCTGTGAGGC	ATCCCCAGTGTGCTATG	147	chr13:54795253-54795399
Promoter	pclKC	AGCCAGGAGAGACAGAAGG	ACCAGAGCAGGCAAAACCC	138	chr13:54802593-54802730
Promoter	SNCB	ATTGCCACCTCCACCATC	CCCTCCGCTGACTGACA	140	chr13:54867957-54868096
Promoter	TSPAN17	AGTCGTGTTATGGGCGG	GGCTCGTCTTCTGGAG	81	chr13:54890606-54890686

Taula A5. Primers murins per ChIP.

PRIMER NAME	PRIMER (5'-3')
Blue	CCGAATTCGCAAAGCTCTGA
MCA-Blue	CCGGTCAGAGCTTTGCGAAT
Blue-diana	ATTCGCAAAGCTCTGACCGG
Blue-CAAC	ATTCGCAAAGCTCTGACCGGGCAAC
Blue-CGCG	ATTCGCAAAGCTCTGACCGGGCGG

Taula A6. Primers emprats en AIMS-Seq.

PRIMER NAME	PRIMER (5'-3')
INHBB_siRNA_577	CCUGUGGCUUUACCUGAAATT
INHBB_siRNA_577	UUUCAGGUAAAGCCACAGGTT
INHBB_siRNA_957	GCAGGCAACAGUUCUUAUTT
INHBB_siRNA_957	AUGAAGAACUGUUGCCUGCTT

Taula A7. Primers pel silenciament d'INH-β_B humà.

2. Metilació a escala genòmica.

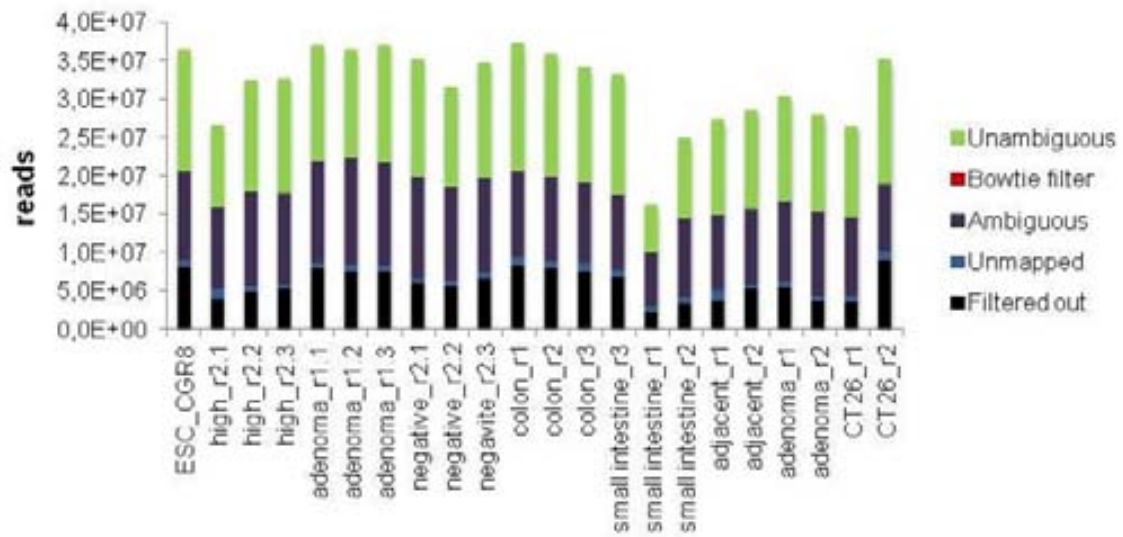


Figura A1. Nombre de *reads* mapats de forma única (unambiguous) i descartats per diferents raons.

Term	Gene number	FDR
<u>Biological Process Hierarchy 5</u>		
regulation of transcription, DNA-dependent	66	1,4E-04
regulation of gene expression	96	1,7E-04
regulation of macromolecule biosynthetic process	94	2,3E-04
regulation of RNA metabolic process	66	2,4E-04
regulation of cellular biosynthetic process	96	3,2E-04
neurogenesis	32	4,3E-04
regulation of transcription	88	4,9E-04
generation of neurons	30	6,5E-04
regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	91	7,6E-04
muscle organ development	16	8,8E-04
striated muscle tissue development	13	1,8E-03
cell morphogenesis	21	2,7E-03
muscle tissue development	13	3,5E-03
proximal/distal pattern formation	6	6,4E-03
negative regulation of transcription, DNA-dependent	20	7,1E-03
negative regulation of gene expression	24	7,2E-03
negative regulation of RNA metabolic process	20	7,7E-03
tissue development	32	9,5E-03
odontogenesis of dentine-containing tooth	7	9,8E-03
chordate embryonic development	24	1,0E-02
cell projection morphogenesis	15	1,3E-02
negative regulation of cell differentiation	14	1,5E-02
odontogenesis	7	1,6E-02
positive regulation of transcription, DNA-dependent	23	2,0E-02
cell part morphogenesis	15	2,1E-02
dorsal/ventral pattern formation	8	2,1E-02
positive regulation of RNA metabolic process	23	2,2E-02
negative regulation of macromolecule metabolic process	26	2,5E-02
central nervous system development	21	2,5E-02
neuron development	18	2,6E-02
organ morphogenesis	29	2,7E-02
negative regulation of transcription	21	2,8E-02
neural crest cell migration	5	4,2E-02
hemopoietic or lymphoid organ development	17	4,4E-02
regulation of cell development	12	4,6E-02
negative regulation of macromolecule biosynthetic process	22	4,8E-02
<u>Cellular Component Hierarchy 5</u>		
intracellular organelle	244	1,0E-04
intracellular membrane-bounded organelle	213	4,7E-03
intrinsic to Golgi membrane	6	1,4E-02
integral to Golgi membrane	6	1,4E-02
<u>Molecularr Function Hierarchy 5</u>		
cation transmembrane transporter activity	26	1,7E-03
<u>KEGG Pathway</u>		
Pathways in cancer	20	7,9E-03

Taula A8. Resultats en termes GO i KEGG (realitzat amb el *software* DAVID) pels 608 gens que tenen la CpGi i/o regió *shore* promotora diferencialment metilada. El DAVID en reconeix 471 gens dels 608.

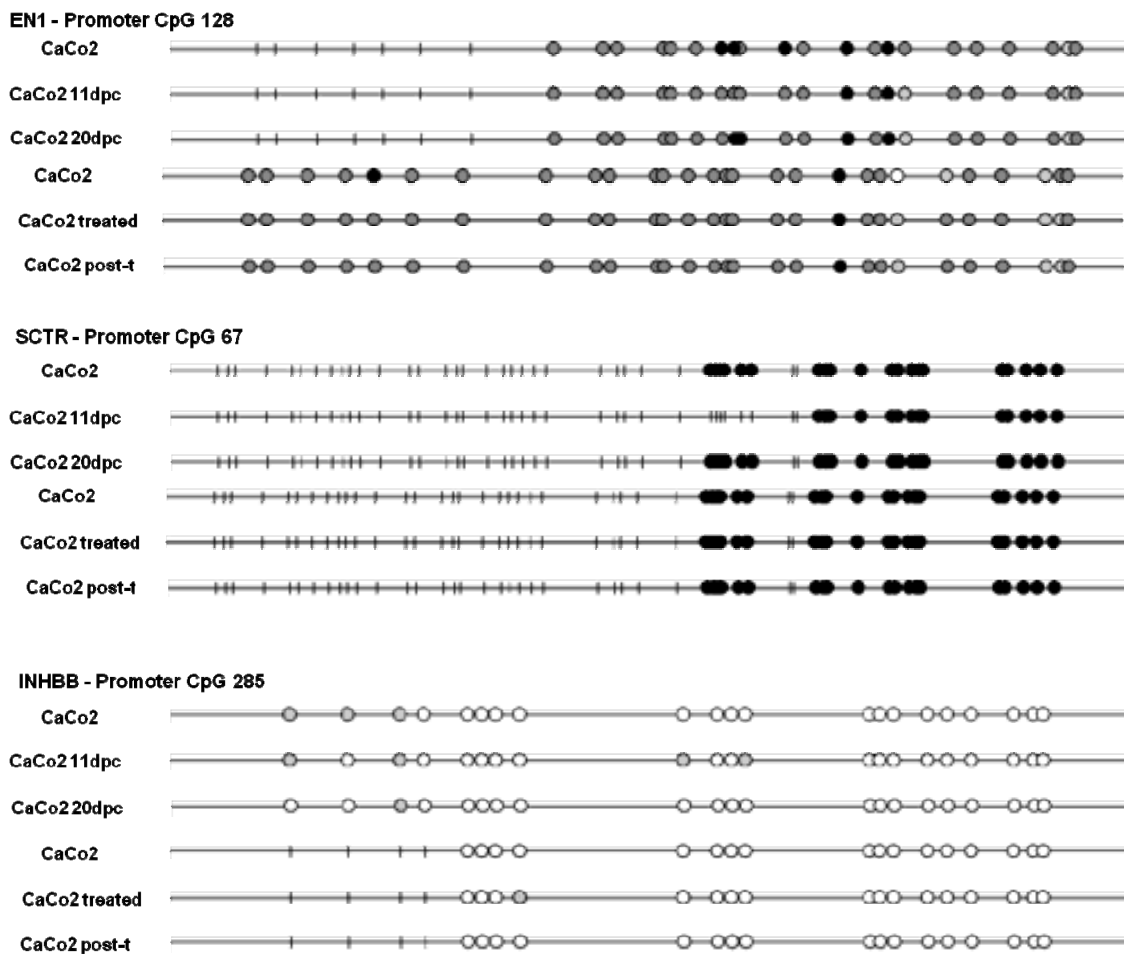
3. Silenciament Epigenètic Regional de Gran Abast (LRES).

3.1 Dades de metilació.

Es representen els valors per cada dinucleòtidCpG.

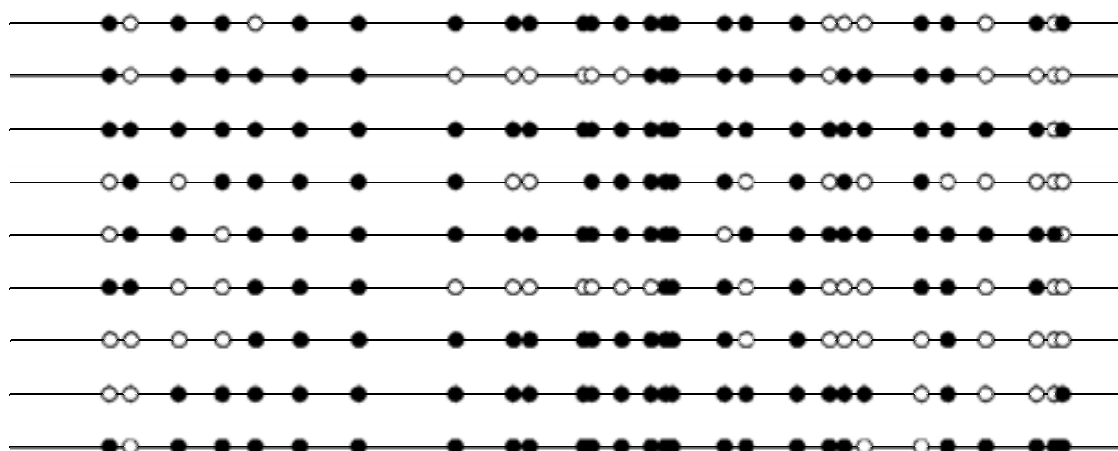


Figura A2. Metilació durant la diferenciació de CaCo2. dpc = dies post confluència. post-t = post tractament

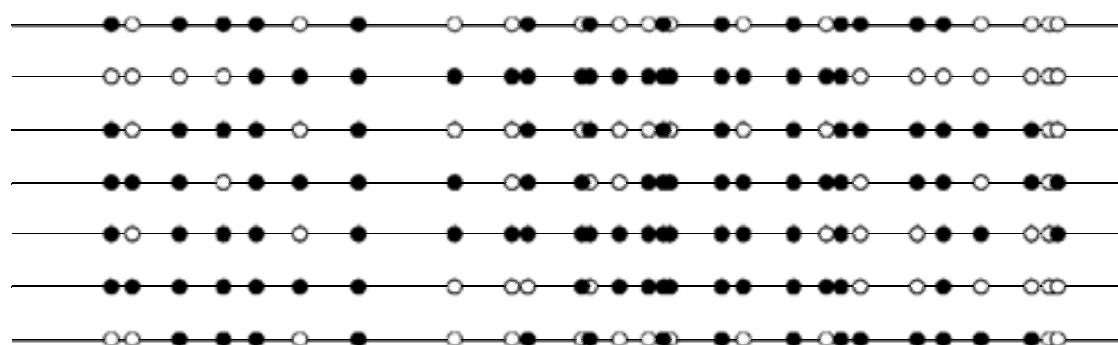


(Continuació Figura A2)

EN1 - Promoter CpG 128. Seqüència directa de bisulfit de clons. Caco2 wt.



EN1 - Promoter CpG 128. Seqüència directa de bisulfit de clons. Caco2 treated



EN1 - Promoter CpG 128. Seqüència directa de bisulfit de clons. Caco2 post- treatment

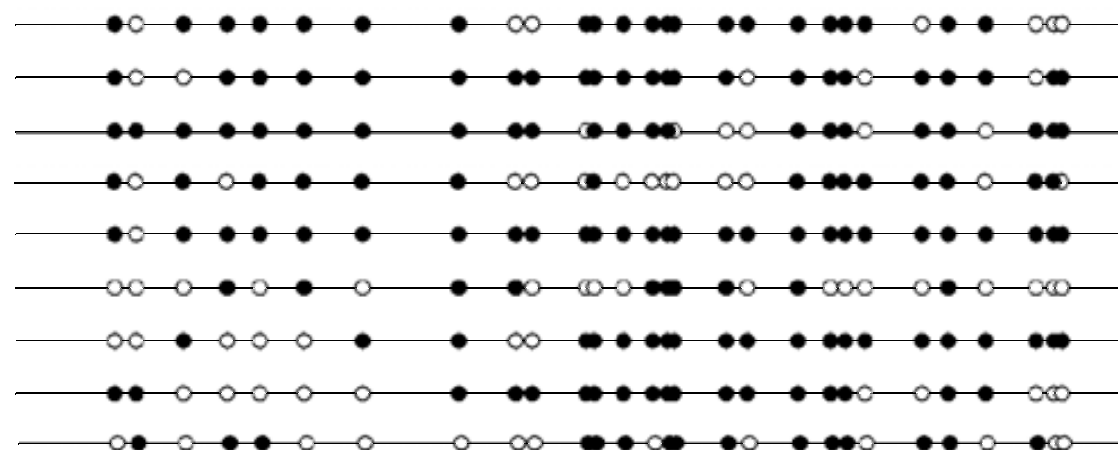
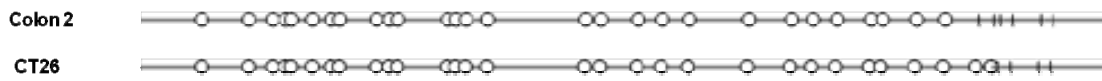


Figura A3. Metilació en la regió murina 1qE2.3.

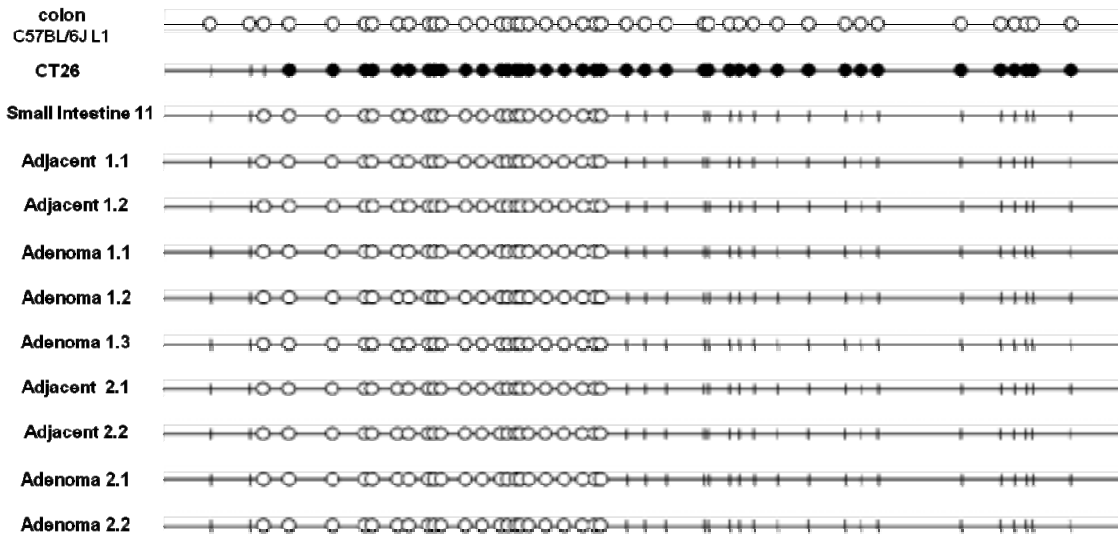
DDX18- Promoter CpG 46



INSIG2- Promoter CpG 44



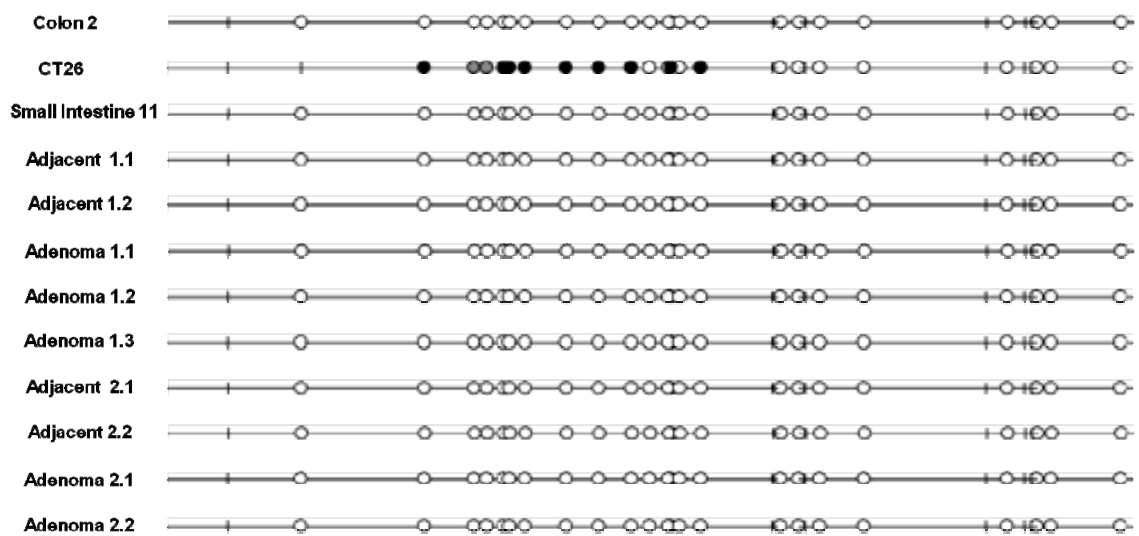
EN1 – Promoter CpG 90



EN1- Exon2 CpG 32



SCTR - Promoter region

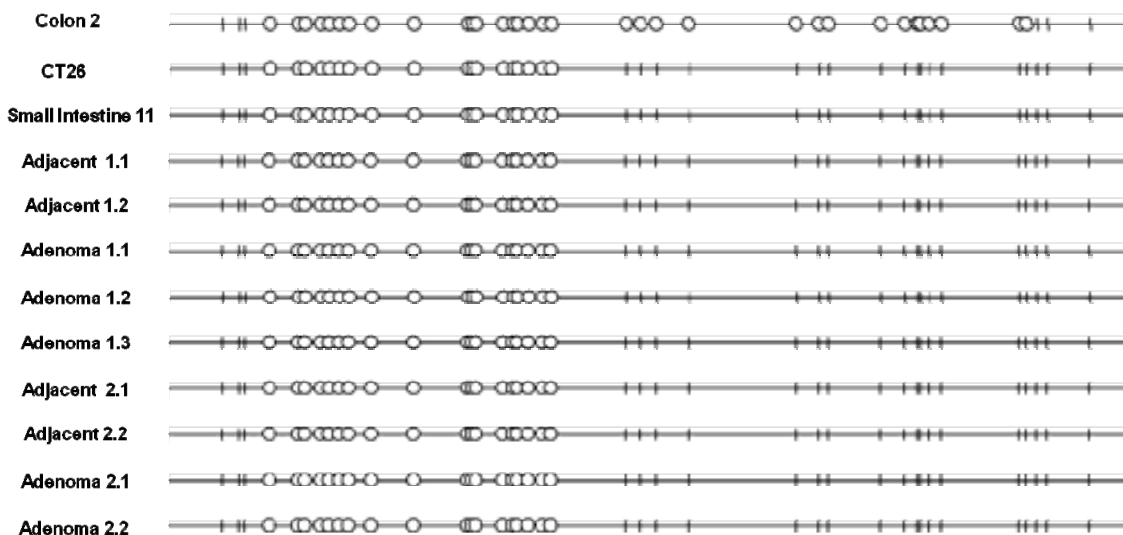


(Continuació Figura A3)

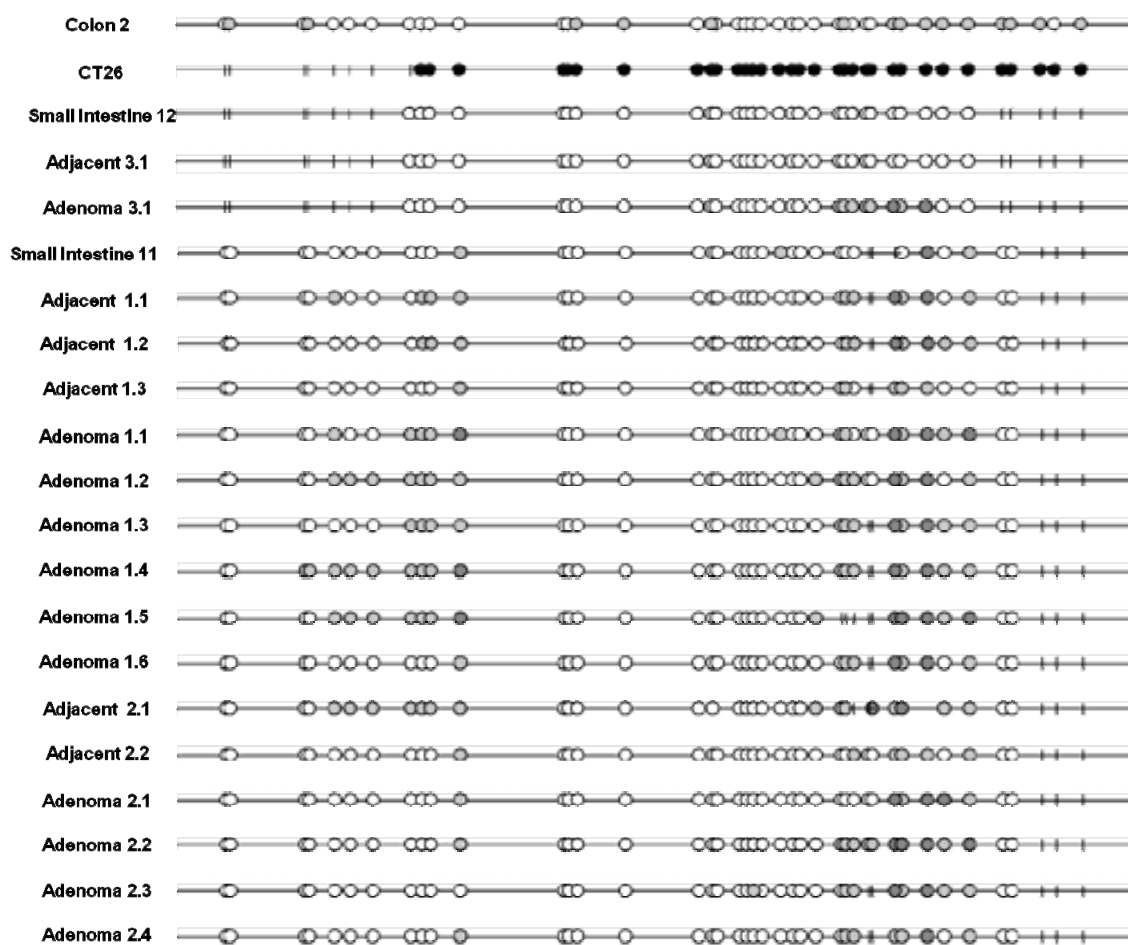
PTPN4 - Promoter CpG 106



RALBB-Promoter CpG 52

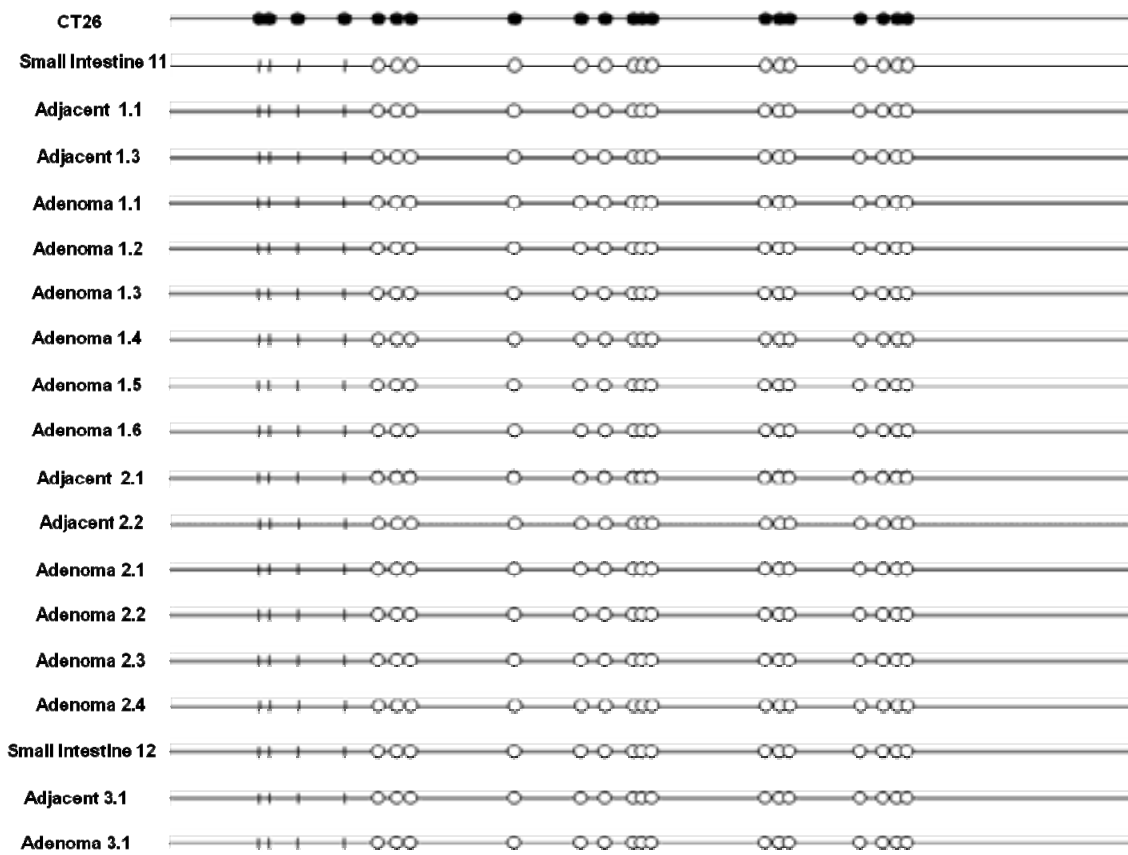


INHBB - Promoter CpG 244



(Continuació Figura A3)

GLI2 - Promoter CpG 34



TSN - Promoter CpG 57

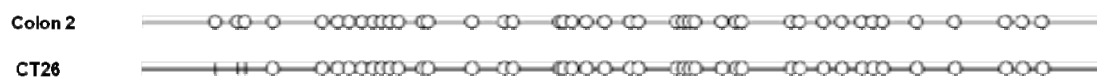
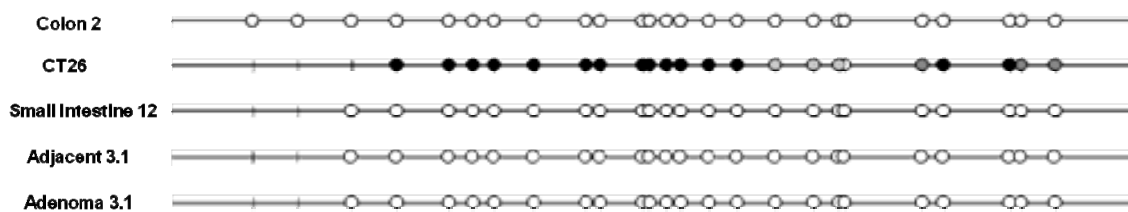
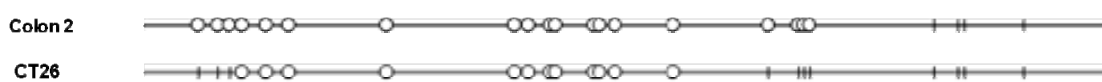


Figura A4. Metilació en la regió murina 13qB1.

DRD1 - Promoter CpG 51

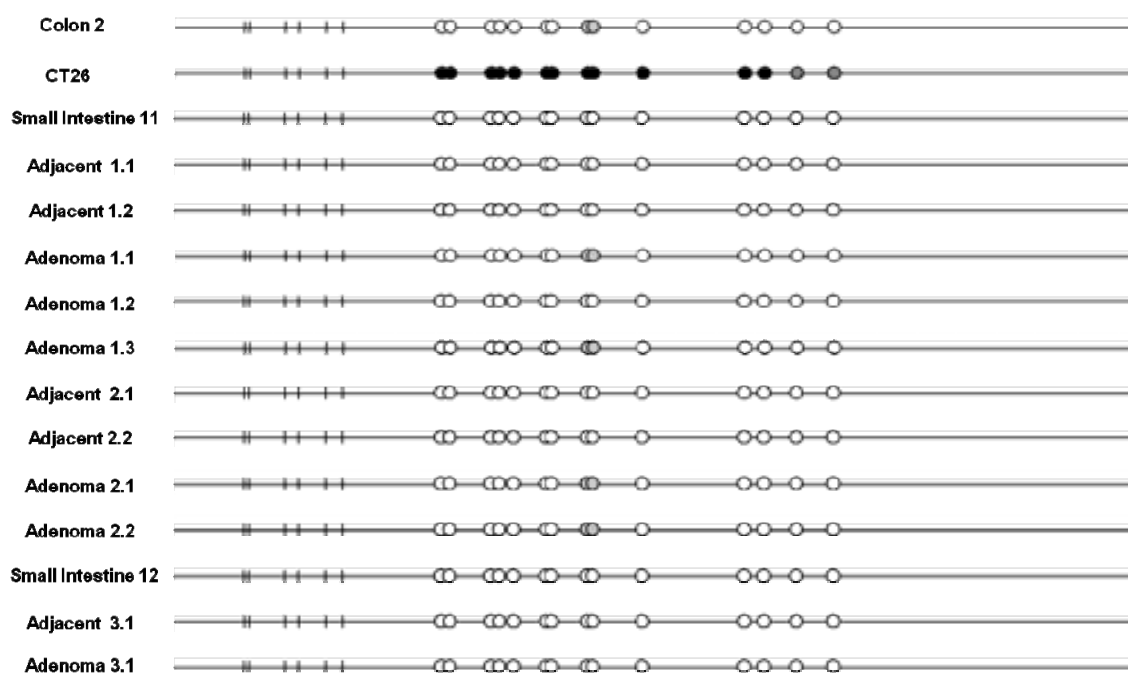


SFXN1 - Promoter CpG 65



(Continuació Figura A4)

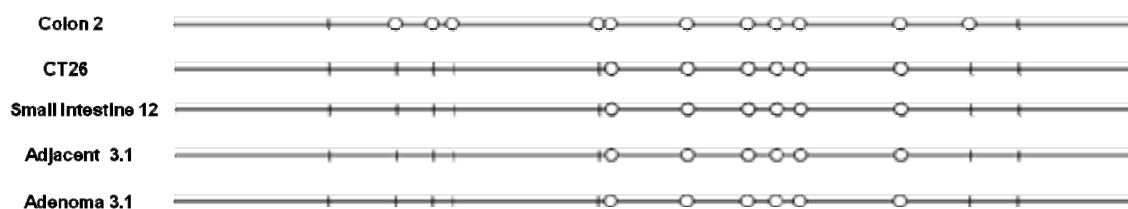
HRH2- Promoter CpG 29



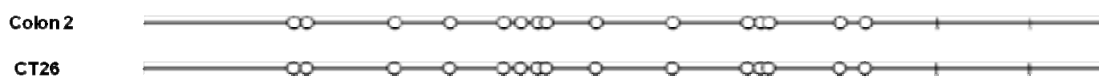
CPLX2 var1 - Promoter CpG 87 and shore



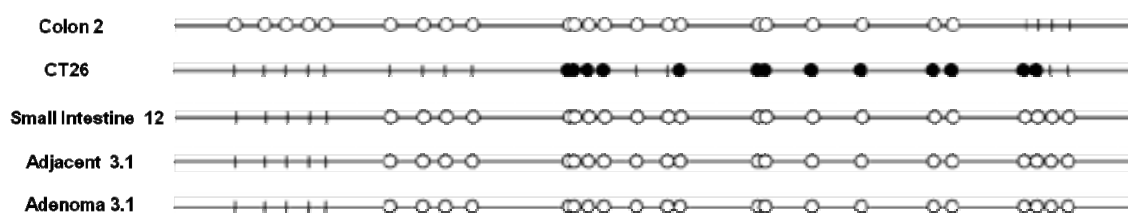
CPLX2 var1 - Promoter CpG87



CPLX2 var2 - Promoter CpG 47 and shore

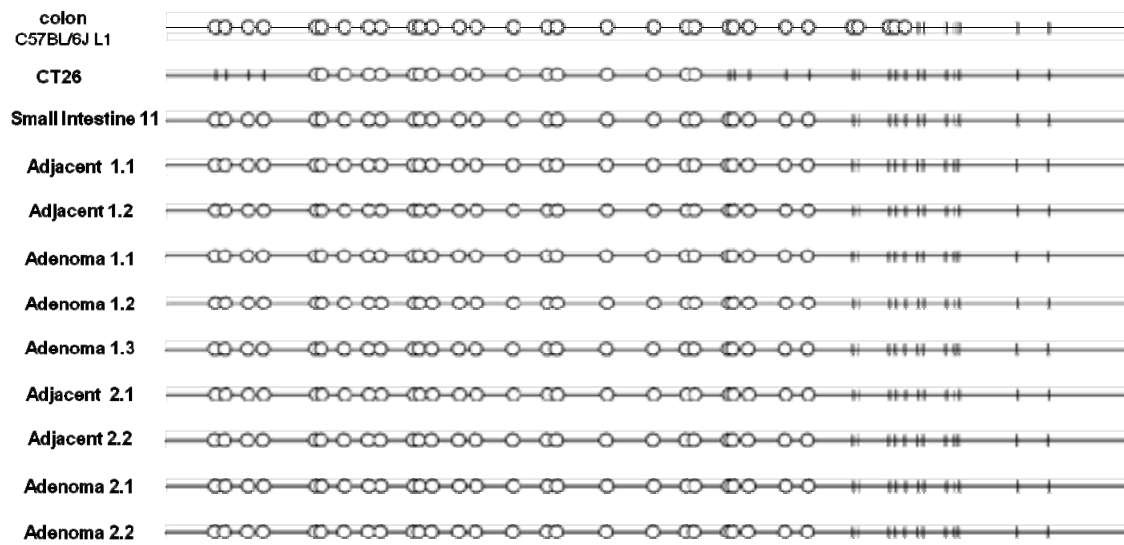


CPLX2 var2 - Promoter CpG47

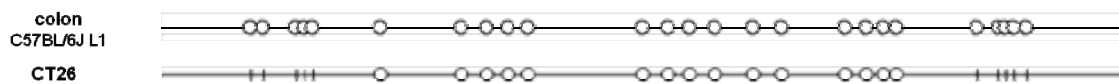


(Continuació Figura A4)

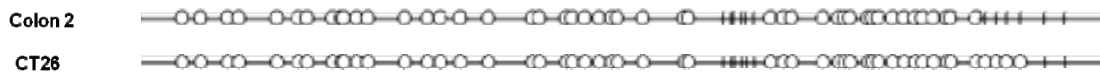
RNF44 - Promoter CpG 98



THOC3 - Promoter CpG 54



CLTB- Promoter CpG 52



SNCB- Promoter CpG 42

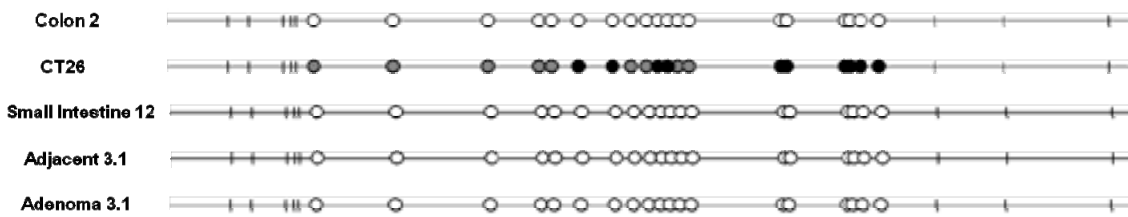
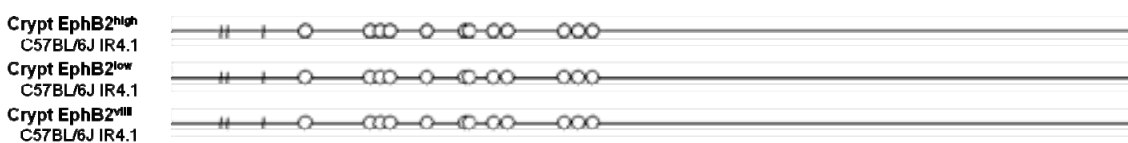


Figura A5. Metilació LRG5 en la diferenciació.

LGR5 - Promoter CpG 44



3.2 Dades d'expressió d'RNA.

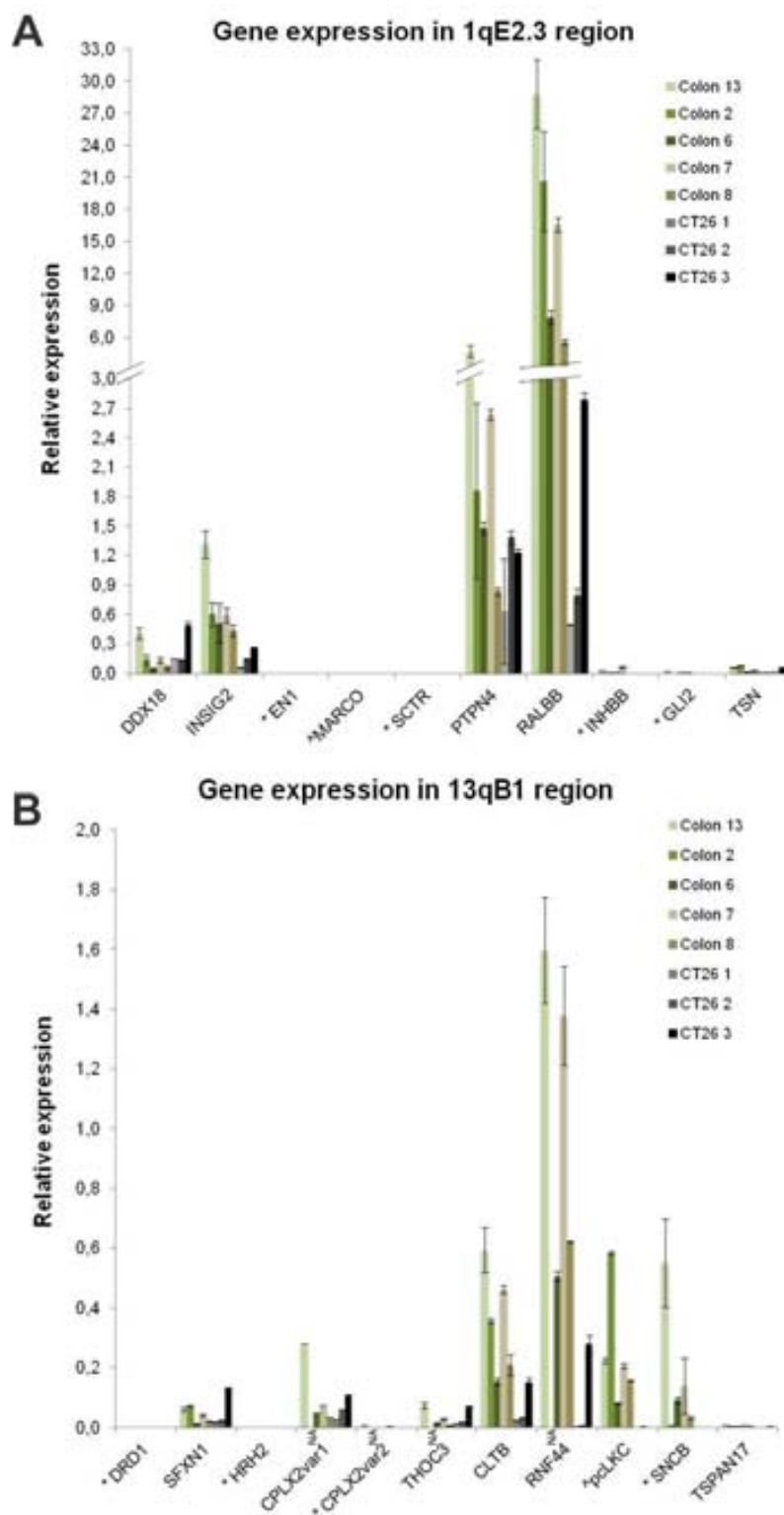


Figura A6. Valors d'expressió gènica en la regió 1qE2.3 (A) i 13qB1(B) en còlon de ratolí sa i CT26. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^. NA= no analitzat.

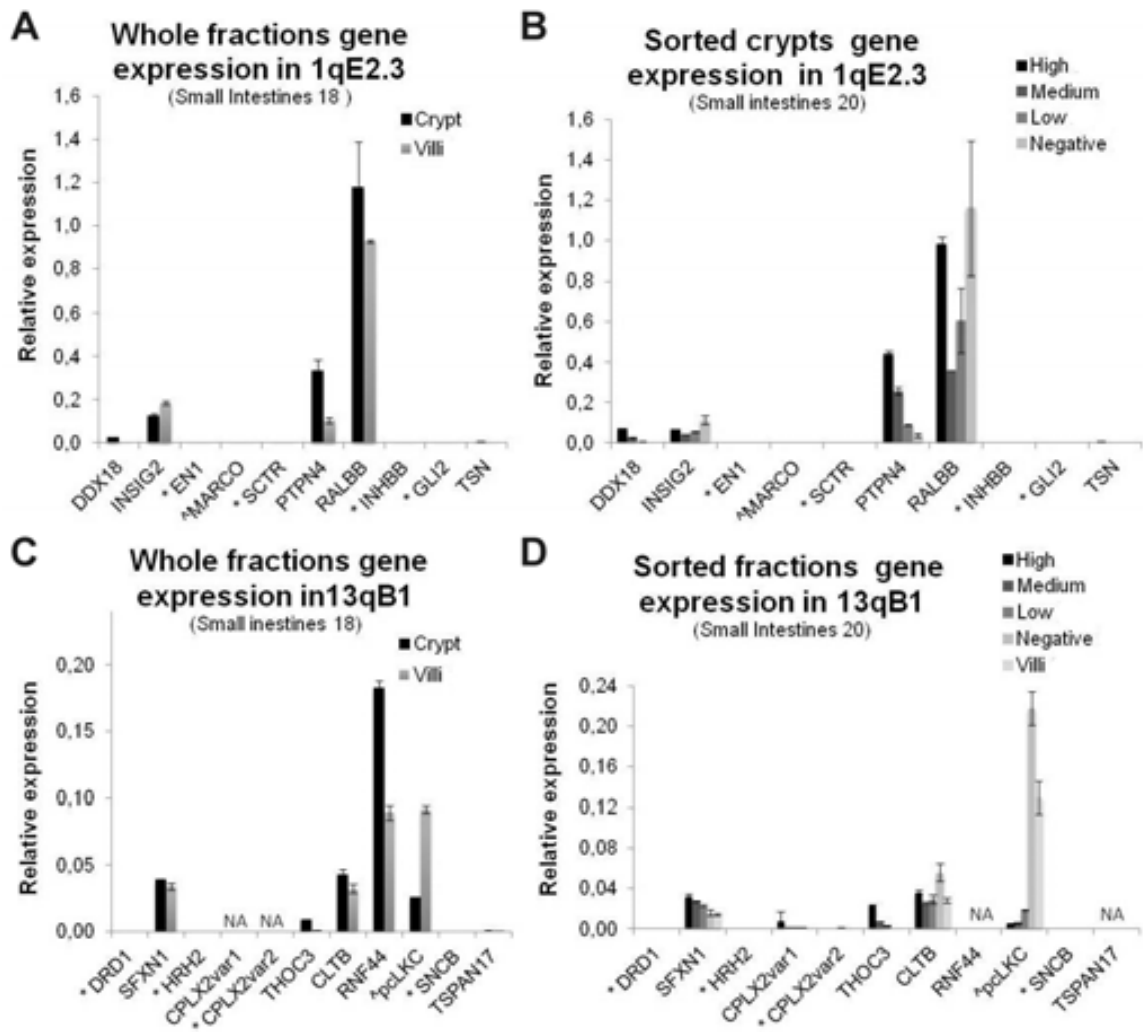


Figura A7. Valors d'expressió gènica en la regió 1qE2.3 (A,B) i 13qB1(C,D) durant la diferenciació de l'intestí prim. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^. NA=no analitzat. High= cèl·lula progenitora de la cripta; Medium i Low = cèl·lules en procés de diferenciació dins la cripta; Negative = cèl·lula diferenciada.

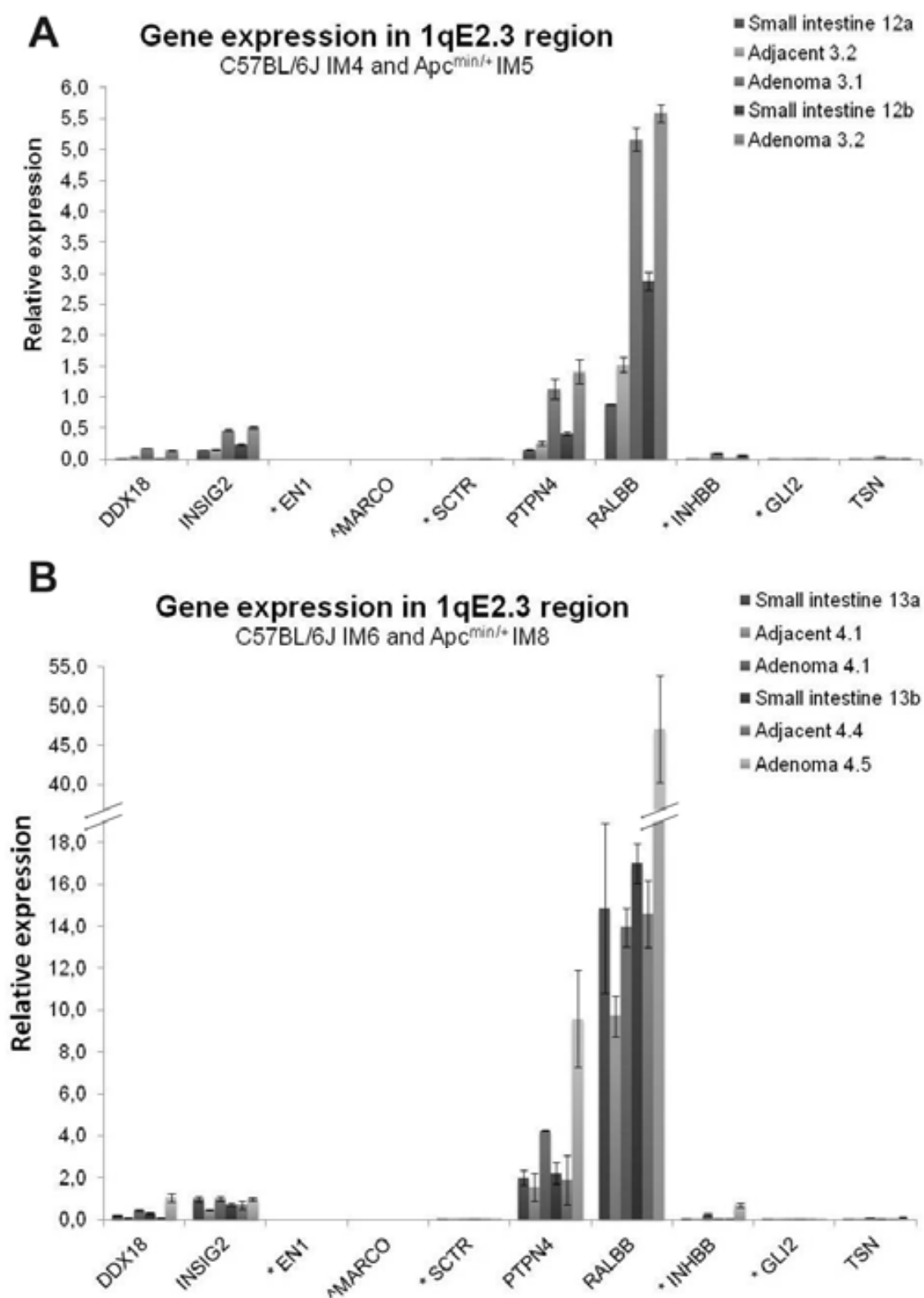


Figura A8. Valors d'expressió gènica en la regió 1qE2.3 en teixit de ratolins sans i *Apc*^{min/+}. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpGi amb ^. IM= IMIM (identificador del ratolí).

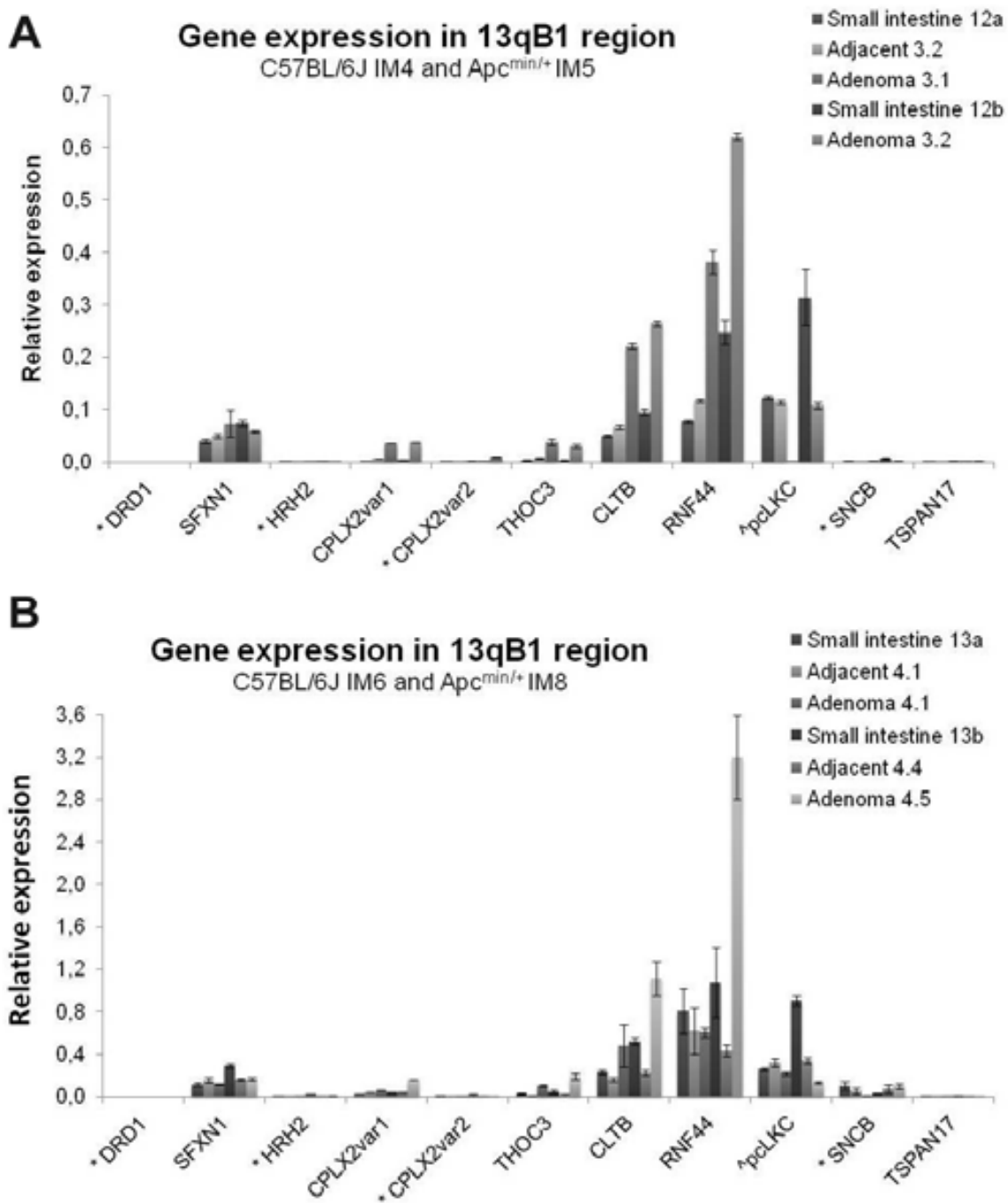


Figura A9. Valors d'expressió gènica en la regió 13qB1 en teixit de ratolins sans i *Apc^{min/+}*. Els gens classificats com poc actius estan marcats amb * i els que no tenen CpG amb ^.
IM= IMIM (identificador del ratolí).

3.3 Immunoprecipitació de cromatina: consideracions tècniques.

Per tal d'estudiar les marques d'histones i la presència d'altres proteïnes associades a regions específiques de la cromatina es van dur a terme assajos d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) treballant amb diverses quantitats i tipus de mostres. Donada la complexitat del estudis realitzats (heterogeneïtat de models, mostres, i procediments), així com limitacions tècniques (variabilitat en l'extracció de cromatina, eficiència dels anticossos, etc) es necessàri fer algunes consideracions que cal tenir en compte alhora d'analitzar i interpretar els resultats ChIP.

Primer de tot, en aquest estudi les marques d'histones estan representades normalitzant respecte la histona H3 total. Altres estudis normalitzen només respecte a l'input, però donada l'heterogeneïtat dels gens estudiats i de les regions analitzades, s'ha considerat oportú utilitzar H3 per normalitzar. Segon, els valors obtinguts treballant amb poca quantitat de cèl·lules i el *Low Cell ChIP Kit* eren superiors als detectats amb el *kit* i quantitat de cromatina estàndard, tal i com es pot observar en la Figura A.10 en la regió promotora del gen *Sctr* (també en Apèndix 3.4). En ambdues situacions, la mateixa quantitat d'anticòs va ser utilitzat, però el *Low Cell ChIP Kit* treballava amb *beads* magnètiques, mentre que en la immunoprecipitació estàndard s'utilitzaven *beads* d'agarosa.

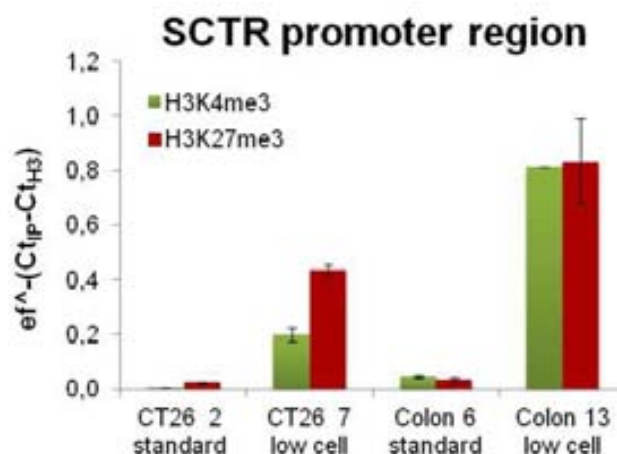


Figura A10. Comparació dels valors obtinguts amb el *ChIP Kit* estàndard i el *Low Cell ChIP Kit* en CT26 i còlon de ratolí per H3K4me3 i H3K27me3 en la regió promotora del gen *Sctr*.

Tercer, la viabilitat de dur a terme ChIP partint de teixit congelat es va testar. La fixació amb formaldehid de la mostra es va realitzar a partir de: còlon fresc; còlon incubat 30 minuts a temperatura ambient; còlon congelat; i còlon conservat en OCT. Resultats obtinguts en aquestes condicions es representen en la Figura A11.A-B, on es pot observar que la detecció d'H3 total es superior en la cromatina fixada abans de congelar. El mateix va succeir en la detecció d'H3K4me3, tot i que es van determinar els valors en totes les condicions descrites.

Finalment, la immunoprecipitació de la cromatina es va realitzar a partir d'adenomes i teixit adjacent del mateix animals fixats després de ser congelats o conservats en OCT. Valors similars

es van obtenir per diferents modificacions d'histones en ambdues condicions (Fig. 2C, valors en altres regions promotores estan representats en Apèndix 3.4).

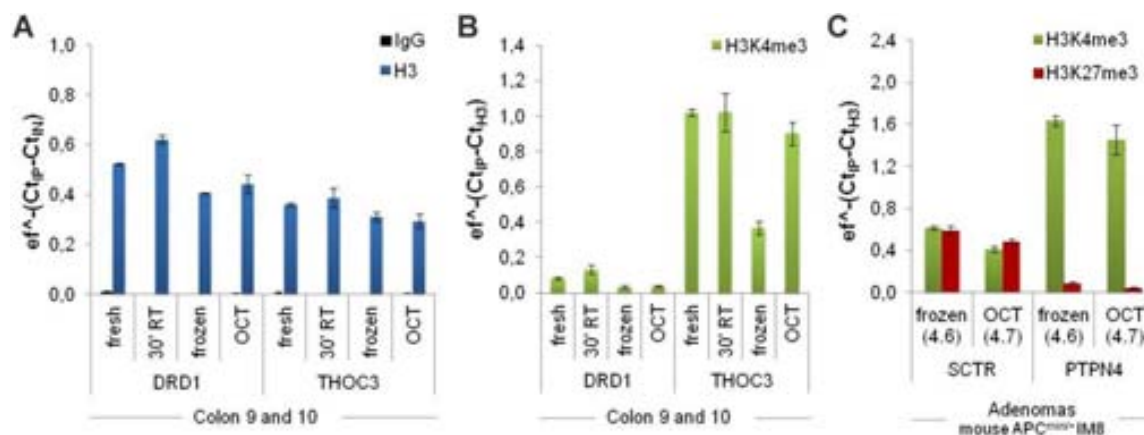
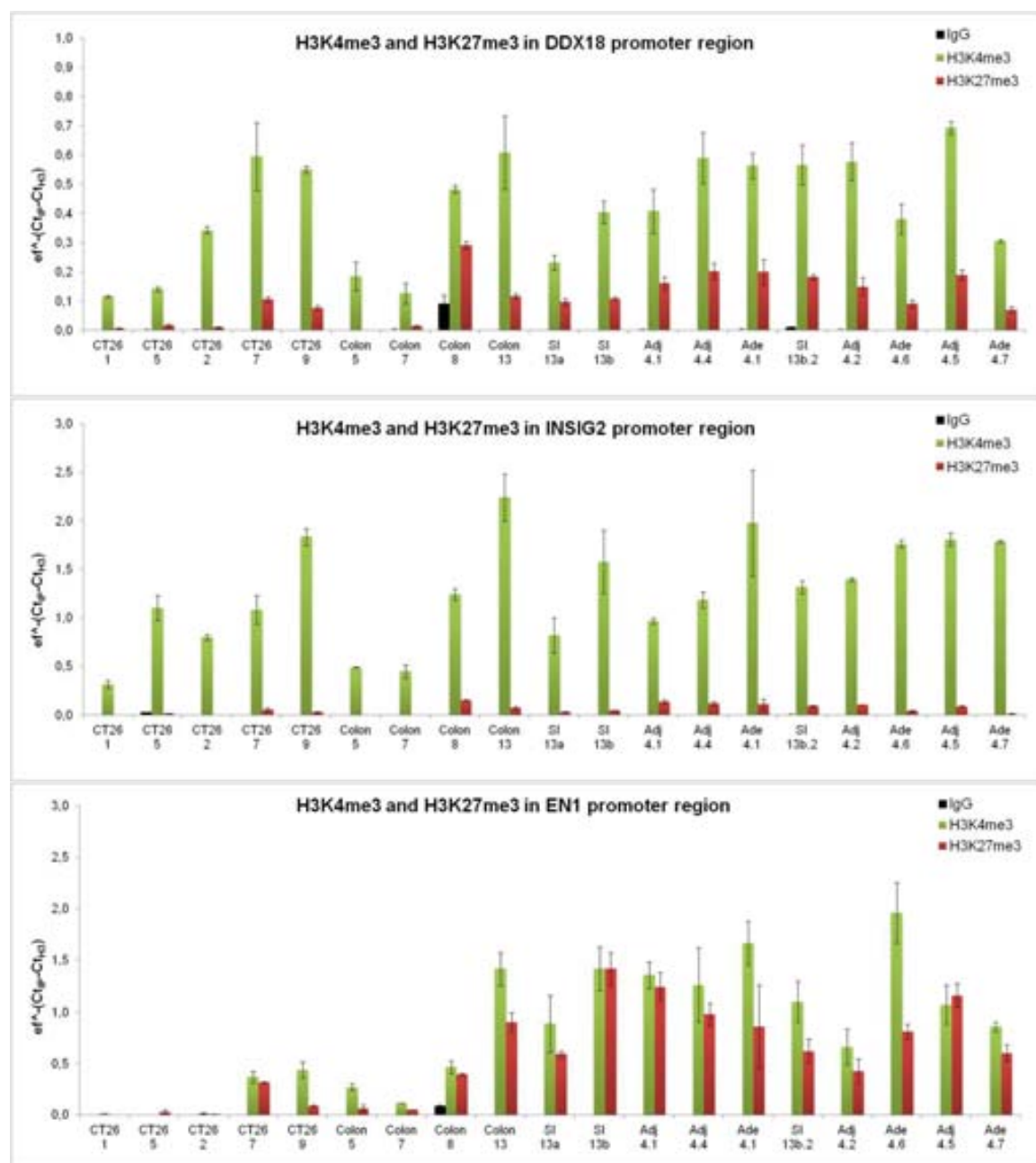


Figura A11. Representació dels valors obtinguts treballant amb teixits frescos o conservats de forma diferent abans de la fixació amb formaldehid. Valors per H3 total (A) i H3K4me3 (B) en la mateixa mostra de còlon conservada en diverses condicions. (C) Els valors per H3K4me3 i H3K27me3 en diferents adenomes del mateix animal directament congelats o conservats en OCT. IM= IMIM (identificador del ratolí).

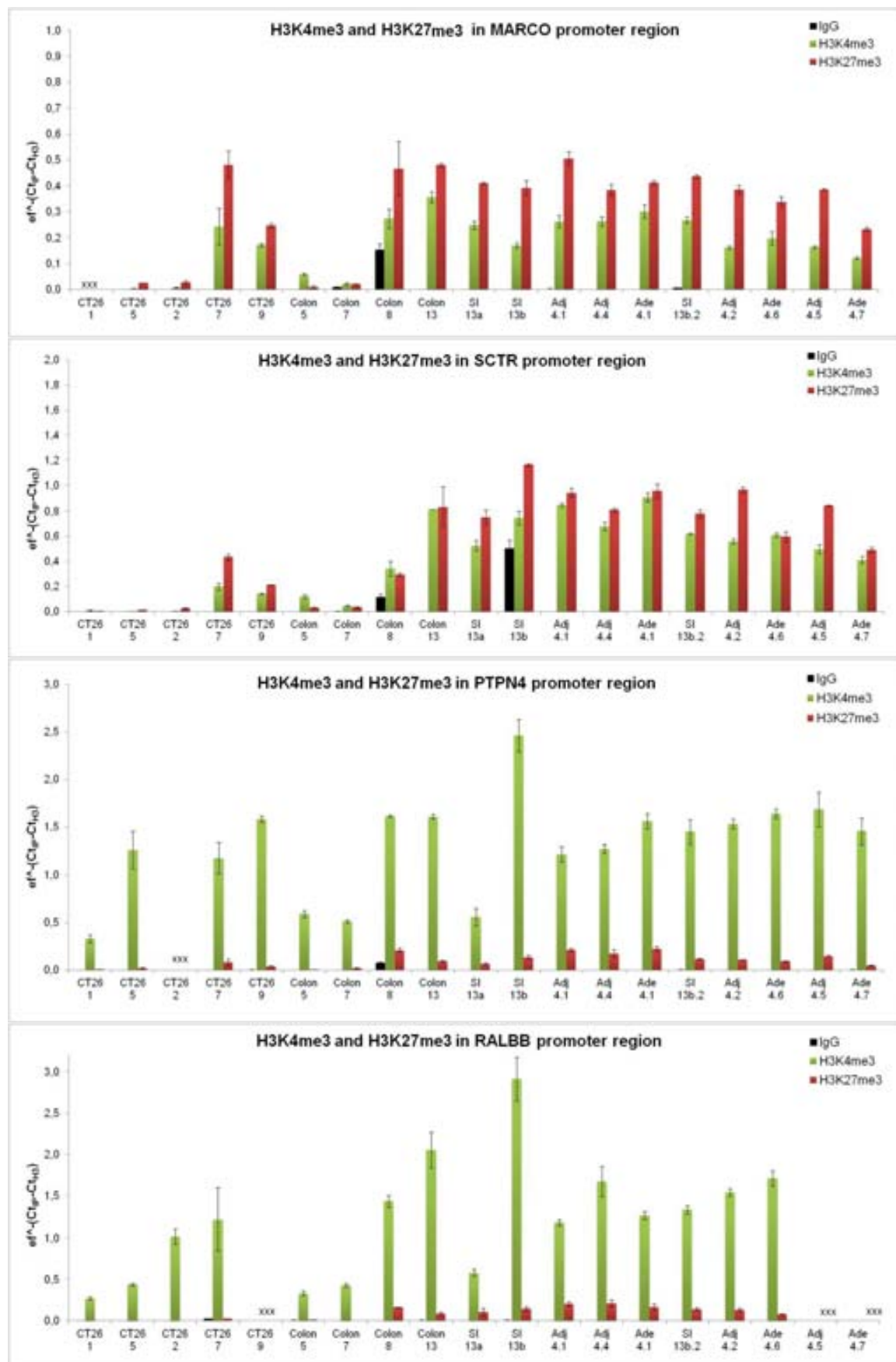
Així doncs, encara que es pot realitzar ChIP partint de teixits conservats de forma diferent, i de diferents quantitats de cromatina, alhora d'analitzar els resultats cal comparar mostres processades de igual forma.

3.4 Valors d'H3K4me3 i H3K27me3 en mostres de ratolí.

Figura A12. Valors de CHIP en la regió 1qE2.3. SI= intestí prim; Adj= adjacent; Ade= adenoma; a= zona distal de l'intestí prim; b= zona proximal de l'intestí prim.



(Continuació Figura A.12)



(Continuació Figura A.12)

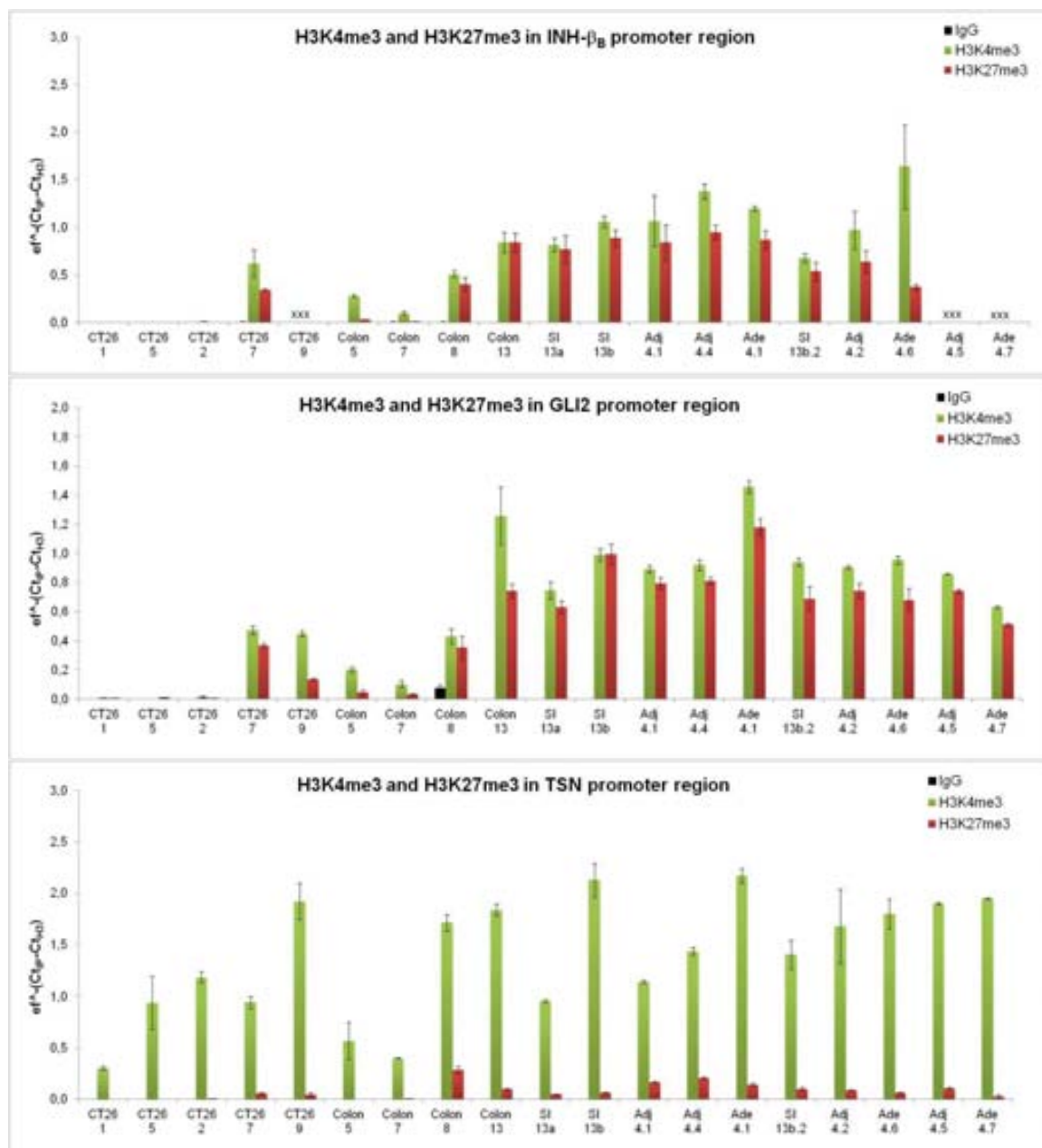
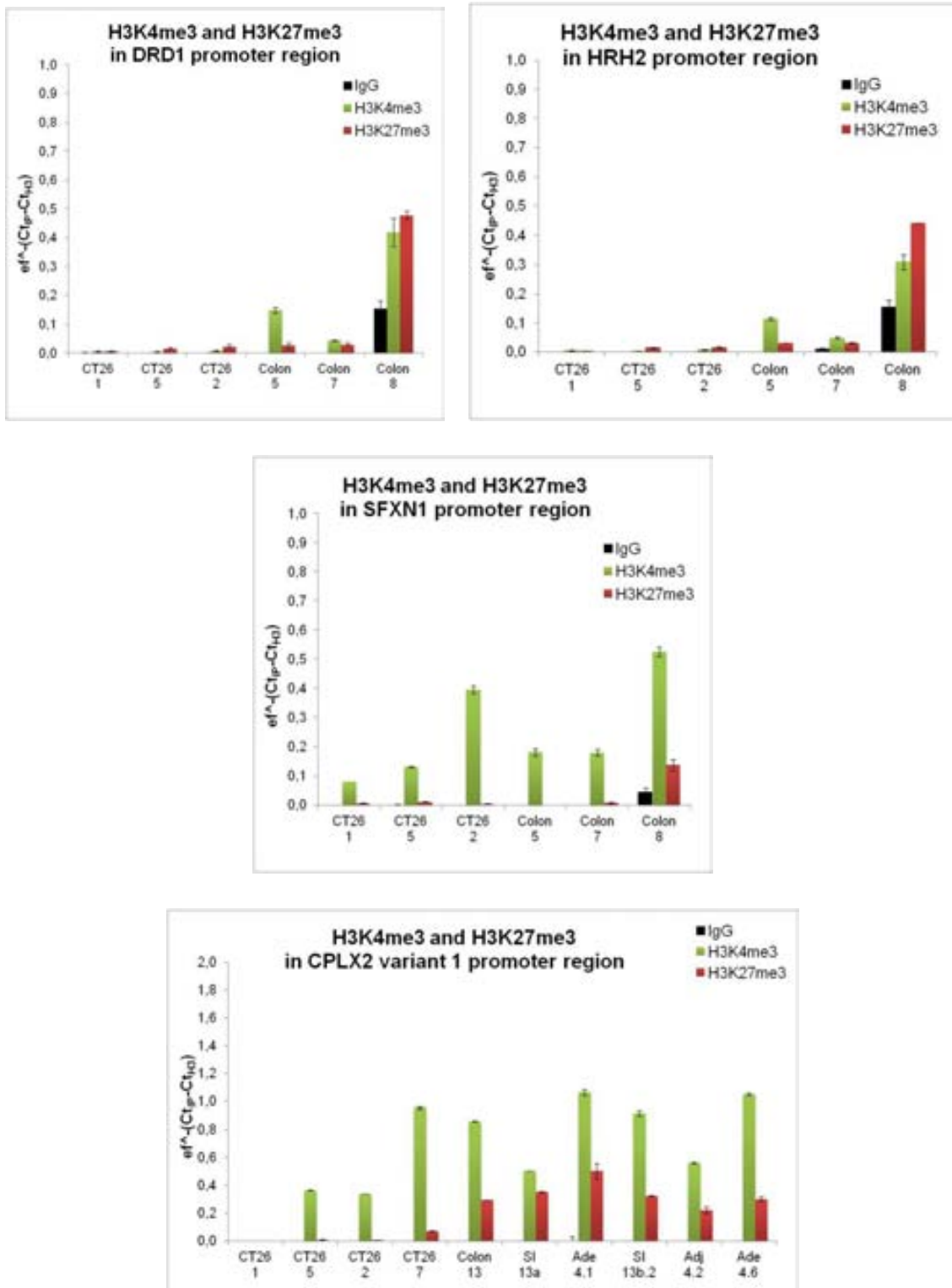
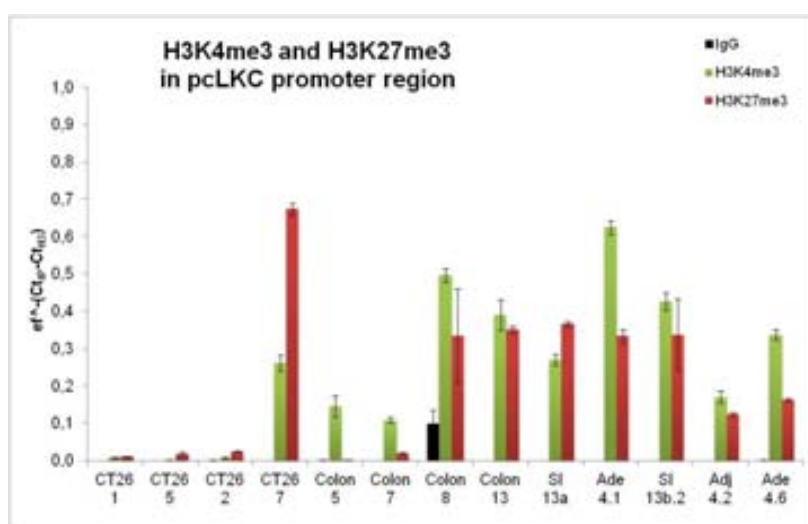
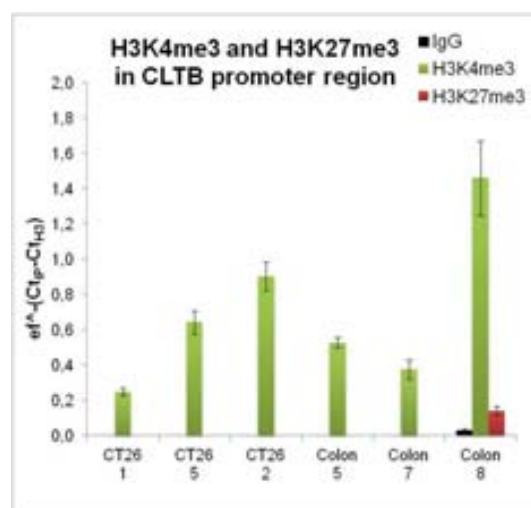
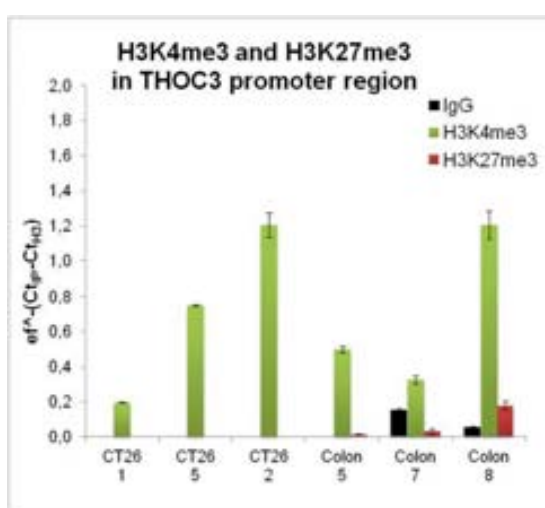
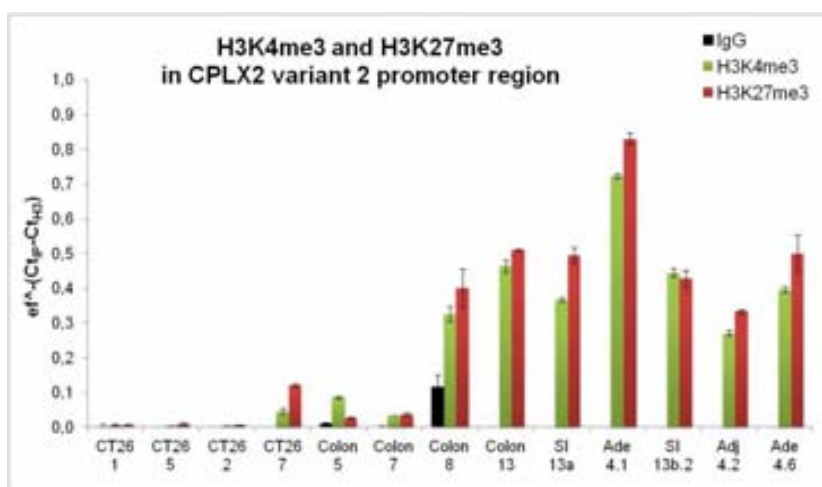


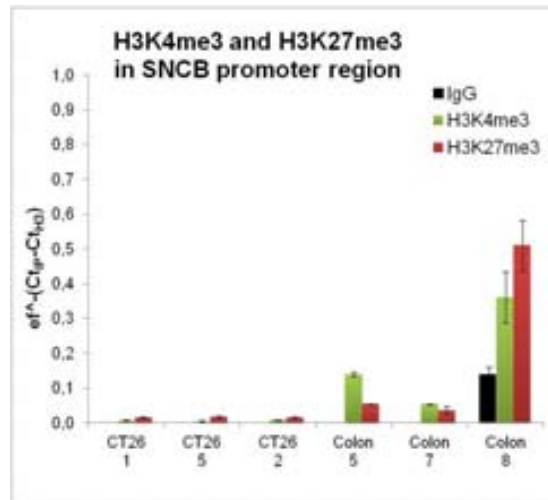
Figura A13. Valors de CHIP en la regió 13qB1. SI= intestí prim; Adj= adjacent; Ade= adenoma; a= zona distal de l'intestí prim; b= zona proximal de l'intestí prim.



(Continuació Figura A.13)



(Continuació Figura A.13)



4. Activina B (Inh-β_B) en càncer intestinal.

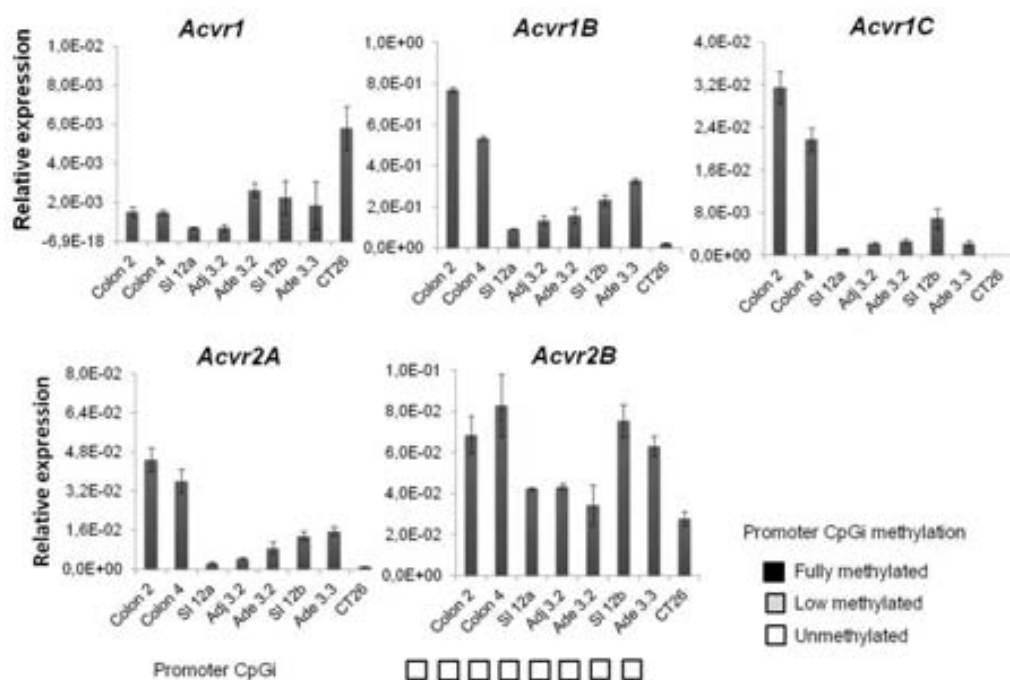


Figura A14. Valors d'expressió i metilació del DNA dels gens murins que codifiquen pels receptors implicats en la senyalització de les Activines i Inhibines. SI= intestí prim; adj= adjacent; ade= adenoma.

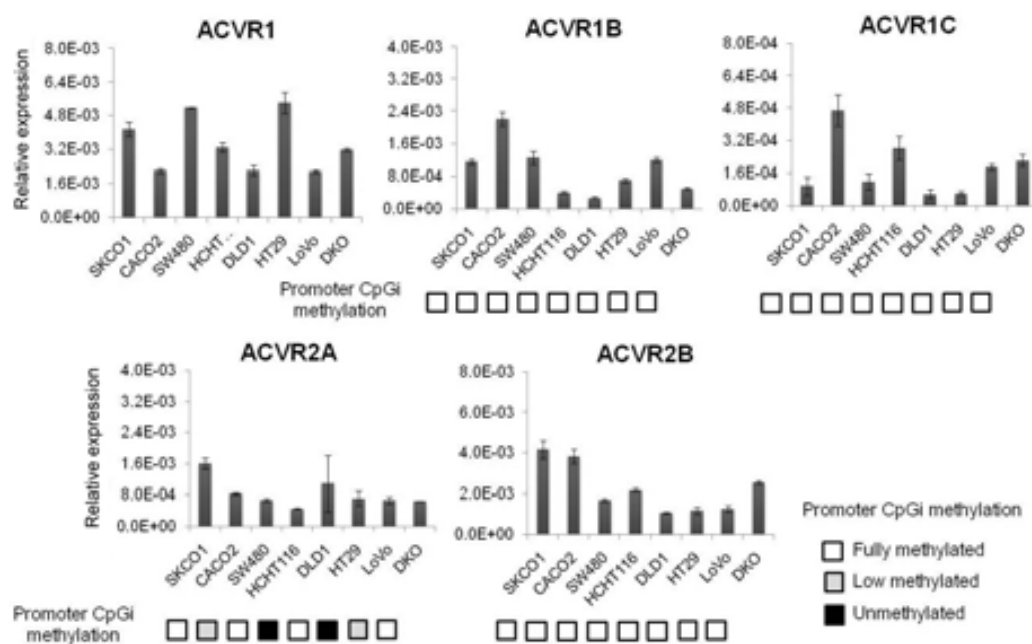


Figura A15. Valors d'expressió i metilació del DNA dels gens que codifiquen pels receptors implicats en la senyalització de les Activines i Inhibines en diferents línies cel·lulars humanes.

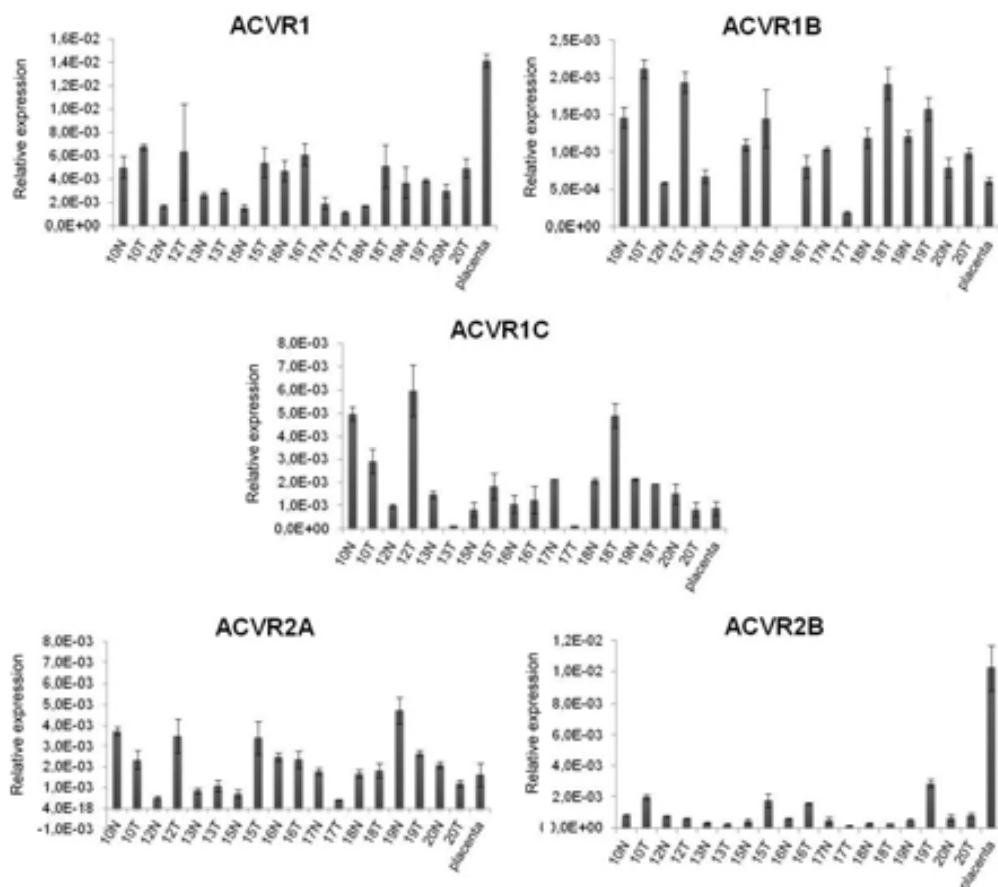


Figura A16. Valors d'expressió dels gens que codifiquen pels receptors implicats en la senyalització de les Activines i Inhibines en parelles normal-tumor de pacients amb CRC i placenta com a teixit control.