

Títol del treball:

**DESMETILACIÓ GENÒMICA COM A BIOMARCADOR DE
PREDISPOSICIÓ A CÀNCERS MÚLTIPLES**

Estudiant: Maria Navarro Jiménez

Grau en Química

Correu electrònic: brothersnavarro@gmail.com

Tutor: Dr. Oriol Vidal Fàbrega

Cotutor*: Dr. Sergio Alonso/Dra. Beatriz González

Empresa/institució: Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP)

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Dr. Oriol Vidal Fàbrega

Nom del cotutor*: Dr. Sergio Alonso/Dra. Beatriz González

Empresa / institució: Institut de Recerca Germans Trias i Pujol
(IGTP)

Correu(s) electrònic(s):

salonsou@igtp.cat

bgonzalez@igtp.cat

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 24/05/2018

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent cancers in human populations, particularly in the western countries. Both genetic and epigenetic alterations are german to CRC development and progression. In a previous collaborative work conducted in Japanese population, it was reported that global genomic methylation of the normal colonic mucosa (NCM) of CRC patients was predictive of the risk to develop multiple colonic cancers, both synchronous and metachronous. In that work, global methylation was measured on the LINE-1 repetitive elements, which constitute about 17%-20% of the human genome and are frequently employed as surrogate marker of global methylation levels. These sequences are majoritarily methylated in virtually all somatic adult healthy tissues, including the colonic epithelial cells. However, cancer cells have been known for a long time to exhibit global genomic hypomethylation which affects also LINE-1 elements. LINE-1 methylation was analyzed by MethyLight, a QPCR-based method capable of quantify the relative proportion of hypomethylated molecules. While the hypomethylation in cancer cells was known, the strong association of genomic demethylation in NCM with multiple cancer risk was novel, and suggested the existence of an epigenetic field for cancerization, i.e. a region of normal colonic mucosa that harbours epigenetic alterations preceding and promoting tumour development. That analysis, however, could not test the extension of that epigenetic field because only one normal sample was analyzed in every patient and, in most cases, the distance between the normal biopsy to the tumor location was unreported. Moreover, both the normal and the tumor samples consist of different cell types (cancer cells, epithelial cells, muscle layer) with different epigenomic profiles.

This work was aimed to explore the extent of DNA hypomethylation using FFPE samples from multiple-CRC patients from the Hospital Germans Trias i Pujol in Catalonia, and frozen samples from single-CRC from the CHTN in USA. FFPE samples were microdissected to facilitate a more precise determination of their cellular content. In addition, in this work two normal samples taken from different locations of the colon, plus non-cancer cells directly adjacent to the tumor samples have been analyzed. We employed a real-time methylation-specific PCR (MS-QPCR) technique based on that used in the previously published work. The technique has been slightly modified to reduce the cost of the analysis, by substituting the specific fluorescent probes by SYBR-Green for the quantification of the amplified products, and including a melting-curve analysis to determine the differences between amplicons. Our results demonstrate the suitability of the experimental approach to analyze global genomic hypomethylation in FFPE samples. Tumor cells exhibited significant lower levels of methylation than their non-tumoral matching samples, in agreement with previous observations. We also observed a high degree of coordination of the demethylation level in normal samples from the same individual, suggesting that the demethylation is homogeneous along the colon. This coordination might facilitate the estimation of the global genomic demethylation level in the whole colonic tract from a single biopsy.

RESUM

El càncer color rectal (CRC) és un dels càncers més freqüents en poblacions humanes, particularment en els països occidentals. Tant les alteracions genètiques com les epigenètiques estan relacionades amb el desenvolupament i progressió del CRC. En un treball previ col·laboratiu realitzat a població japonesa, es va informar que la metilació genòmica global de la mucosa colònica normal (NCM) de pacients amb CRC, era predictiva del risc de desenvolupar càncers múltiples colònics, tan sincrònics com metacrònics. En aquest treball, es va mesurar la metilació global dels elements repetitius LINE-1, els quals constitueixen aproximadament el 17%-20% del genoma humà i són freqüentment utilitzats com a marcadors substituïts dels nivells de metilació global. Aquestes seqüències es troben majoritàriament metilades en pràcticament tots els teixits somàtics sans adults, incloses les cèl·lules epitelials del còlon. Tanmateix, les cèl·lules canceroses han estat conegudes durant molt de temps per exposar hipometilació genòmica global que també afecta als elements LINE-1. La metilació de LINE-1 va ser analitzada per MethyLight, un mètode basat en QPCR capaç de quantificar la proporció relativa de molècules hipometilades. Mentre que la hipometilació en cèl·lules canceroses ja era coneguda, la forta associació de la desmetilació genòmica en NCM amb el risc de desenvolupar càncer múltiple, era un nou concepte, i va suggerir l'existència d'un camp epigenètic per a la cancerització, és a dir, una regió de mucosa colònica normal que albergava alteracions epigenètiques que precedien i promouien el desenvolupament del tumor. Tanmateix, aquest anàlisi no va poder provar l'extensió d'aquest camp epigenètic, ja que només es va analitzar una mostra normal de cada pacient i, en la majoria dels casos, la distància entre la biòpsia normal i la ubicació del tumor no era coneguda. A més, tant les mostres normals com les tumorals estaven constituïdes de diferents tipus de cèl·lules (cèl·lules canceroses, cèl·lules epitelials, capa muscular) amb diferents perfils epigenètics.

Aquest treball va tenir com a objectiu explorar l'abast de la hipometilació del DNA utilitzant mostres FFPE de pacients amb múltiples CRC de l'Hospital Germans Trias i Pujol de Catalunya, i mostres congelades d'un sol CRC del CHTN dels EUA. Les mostres de FFPE es van microdisseccionar per facilitar la determinació més precisa del seu contingut cel·lular. A més, es van analitzar dues mostres normals preses a diferents ubicacions del còlon, i cèl·lules no canceroses directament adjacents a les mostres del tumor. Es va emprar una tècnica de PCR en temps real (MS-QPCR) específica de metilació basada en la utilitzada en el treball anteriorment publicat. La tècnica es va modificar lleugerament per reduir el cost de l'anàlisi, substituïnt les sondes fluorescents específiques, per SYBR-Green, per a la quantificació dels productes amplificats, i incloent un anàlisi de la corba de fusió per a determinar les diferències entre els amplicons. Els nostres resultats, demostren la idoneïtat de l'enfocament experimental per analitzar la hipometilació genòmica global en mostres FFPE. Les cèl·lules tumorals presentaven nivells de metilació significativament més baixos que les seves corresponents mostres no tumorals, d'acord amb observacions prèvies. A més, es va observar una alta coordinació en el nivell de desmetilació en les mostres normals dels mateixos individus, suggerint que la desmetilació és homogènia al llarg del còlon. Aquesta coordinació pot facilitar l'estimació del nivell de desmetilació global al llarg de tot el còlon en una única biòpsia.

RESUMEN

El càncer color rectal (CRC) es uno de los cánceres más frecuentes en poblaciones humanas, particularmente en los países occidentales. Tanto las alteraciones genéticas como las epigenéticas están relacionadas con el desarrollo y progresión del CRC. En un trabajo previo colaborativo realizado en población japonesa, se informó de que la metilación genómica global de la mucosa colónica normal (NCM) de pacientes con CRC, era predictiva del riesgo de desarrollar cánceres múltiples colónicos, tanto sincrónicos como metacrónicos. En este trabajo, se midió la metilación global de los elementos repetitivos LINE-1, los cuales constituyen aproximadamente el 17%-20% del genoma humano y son frecuentemente utilizados como marcadores sustitutos de los niveles de metilación global. Estas secuencias se encuentran mayoritariamente metiladas en prácticamente todos los tejidos somáticos sanos adultos, incluidas las células epiteliales del colon. Sin embargo, las células cancerosas han sido conocidas durante mucho tiempo por exponer hipometilación genómica global que también afecta a los elementos LINE-1. La metilación LINE-1 fue analizada por MethyLight, un método basado en QPCR capaz de cuantificar la proporción relativa de moléculas hipometiladas. Mientras que la hipometilación en células cancerosas era ya conocida, la fuerte asociación de la desmetilación genómica en NCM con el riesgo de desarrollar cáncer múltiple era un nuevo concepto, y sugirió la existencia de un campo epigenético para la cancerización, es decir, una región de mucosa colónica normal que albergaba alteraciones epigenéticas que precedían y promovían el desarrollo del tumor. Sin embargo, este análisis no pudo probar la extensión de este campo epigenético ya que solo se analizó una muestra normal de cada paciente y, en la mayoría de los casos, la distancia entre la biopsia normal y la ubicación del tumor no era conocida. Además, tanto las muestras normales como las tumorales estaban constituidas de diferentes tipos de células (células cancerosas, células epiteliales, capa muscular) con diferentes perfiles epigenéticos.

Este trabajo tuvo como objetivo explorar el alcance de la hipometilación del DNA utilizando muestras FFPE de pacientes con múltiples CRC del Hospital Germans Trias i Pujol de Cataluña, y muestras congeladas de un solo CRC del CHTN de EEUU. Las muestras de FFPE se microdisseccionaron para facilitar la determinación más precisa de su contenido celular. Además, se analizaron dos muestras normales tomadas en diferentes ubicaciones del colon, y células no cancerosas directamente adyacentes a las muestras del tumor. Se empleó una técnica de PCR en tiempo real (MS-QPCR) específica de metilación basada en la utilizada en el trabajo anteriormente publicado. La técnica se modificó ligeramente para reducir el coste del análisis, sustituyendo las sondas fluorescentes específicas, por SYBR-Green, para la cuantificación de los productos amplificados, e incluyendo un análisis de la curva de fusión para determinar las diferencias entre los amplicones. Nuestros resultados demuestran la idoneidad del enfoque experimental para analizar la hipometilación genómica global en muestras FFPE. Las células tumorales presentaban niveles de metilación significativamente más bajos que sus correspondientes muestras no tumorales, de acuerdo con observaciones previas. Además, se observó una alta coordinación en el nivel de desmetilación en las muestras normales de los mismos individuos, sugiriendo que la desmetilación es homogénea a lo largo del colon. Esta coordinación puede facilitar la estimación del nivel de desmetilación global a lo largo del colon en una única biopsia.

ÍNDEX

	Pàgina
<u>1. INTRODUCCIÓ</u>	6
<u>2. OBJECTIUS</u>	10
<u>3. MATERIALS I MÈTODES</u>	11
<u>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ</u>	19
<u>5. CONCLUSIONS</u>	26
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	27

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Visió general del càncer colo rectal (CRC)

El càncer colo rectal (CRC), que engloba tant el càncer de còlon com el de recte, és una malaltia caracteritzada per una proliferació anormal de cèl·lules en el còlon, recte i apèndix. El desenvolupament del càncer colo rectal, és un procés seqüencial que s'inicia generalment per mutacions en uns pocs gens implicats en el control de la divisió cel·lular que desencadena l'aparició d'un pòlip adenomatos, que principalment acostuma a ser benigne, i que posteriorment adquireix mutacions genètiques en altres oncogens i supressors tumorals que els hi confereixen característiques malignes (Kinzler and Vogelstein, 1996). Els tumors primaris poden generar metàstasis, les quals són expansions tumorals discontinues respecte al tumor primari, amb capacitat de migrar i colonitzar altres òrgans.

Considerant homes i dones conjuntament, el CRC és la patologia tumoral amb major incidència en països occidentals: Austràlia/Nova Zelanda, Europa i Amèrica del Nord; i més de la meitat dels casos es produeixen en els països més desenvolupats (Ferlay *et al.*, 2013; Ferlay *et al.*, 2015). La distribució de la incidència ha canviat en els últims anys; l'augment inesperat en alguns països, es deu principalment a un increment de l'obesitat, de les dietes no saludables i del tabaquisme (Le Marchand *et al.*, 1997).

Al voltant d'un 10-30% dels pacients que presenten aquesta malaltia, tenen una història clínica de CRC en la família, no obstant això, la majoria dels CRCs (65-85%) es consideren que apareixen de forma esporàdica (Jeter *et al.*, 2006; Samadder *et al.*, 2015). Es creu que els CRCs esporàdics tenen tant factors de risc genètics, com no genètics (mediambientals). En la clàssica via de desenvolupament del CRC, un adenoma adquireix, gradualment, mutacions en diversos tipus de gens (*APC*, *TP53*, *KRAS/BRAF*, *SMAD4*), progressant des d'un estadi d'adenoma prematur cap a un adenoma avançat, abans de convertir-se en CRC (Kinzler and Vogelstein, 1996).

1.2. Les característiques distintives del càncer

Els trets distintius del càncer comprenen diverses capacitats biològiques adquirides durant el desenvolupament de tumors humans. Aquests trets distintius constitueixen un principi organitzador per racionalitzar i comprendre les complexitats d'aquesta malaltia neoplàsica, i inclouen: un manteniment de la senyalització proliferativa cel·lular, una evasió dels supressors de creixement, resistència a la mort cel·lular, immortalitat replicativa, inducció a l'angiogènesi (creixement capil·lar en el tumor, proveint-lo dels nutrients necessaris per al seu creixement) i una activació de la invasió i la metàstasi (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). Subjacent a moltes d'aquestes característiques, es troba la inestabilitat genòmica (Sieber *et al.*, 2003).

1.3. Epigenètica del càncer

Com s'ha esmentat, una de les principals característiques del càncer, és la desregulació de l'expressió gènica, bé per causes genètiques, com per alteracions epigenètiques (Jones and Laird, 1999). L'epigenètica fa referència a la informació hereditària que passa de cèl·lula a cèl·lula i que va més enllà de la seqüència genètica; l'actual definició és: “*Estudi dels canvis hereditaris en*

l'expressió gènica que es produeixen independentment dels canvis en la seqüència primària de DNA".

Els avanços en el camp de l'epigenètica han demostrat que les cèl·lules canceroses humanes presenten anomalies epigenètiques globals, a més de nombroses alteracions genètiques (Feinberg and Tycko, 2004). Aquestes anomalies genètiques i epigenètiques, interactuen en totes les etapes del desenvolupament del càncer, treballant juntes per promoure la progressió d'aquest. L'origen genètic del càncer és àmpliament acceptat; no obstant això, nombrosos estudis suggereixen que les alteracions epigenètiques contribueixen de manera fonamental en pràcticament tots els càncers humans, i fins i tot en algunes formes de càncer poden ser els principals iniciadors o promotors (Issa, 2000; Singh *et al.*, 2016). Aquestes troballes han donat lloc a un gran interès per estudiar i entendre el paper de l'epigenètica en la iniciació i propagació d'aquesta malaltia, juntament amb el fet que aquestes aberracions epigenètiques, a diferència de les mutacions genètiques, són potencialment reversibles i poden ser restaurades al seu estat normal per mitjà de teràpia epigenètica (Yoo and Jones, 2006).

La majoria d'aquestes modificacions epigenètiques s'estableixen durant la diferenciació cel·lular i es mantenen de forma estable a través de múltiples cicles de divisió cel·lular, permetent a les cèl·lules tenir identitats diferents, però contint la mateixa informació genètica. Entre els mecanismes epigenètics millor estudiats, es troba la metilació del DNA i les modificacions d'histones. Ambdós mecanismes controlen l'estructura de la cromatina i es troben freqüentment alterats en càncer (Esteller and Herman, 2002).

La cromatina està formada per unitats repetitives de nucleosomes que consisteixen, en aproximadament, 146 parells de bases de DNA embolicades al voltant d'un octàmer format per quatre proteïnes d'histones del nucli (H3, H4, H2A i H2B). Tant la metilació del DNA com les modificacions covalents d'histones treballen conjuntament per regular el funcionament del genoma, alterant la dinàmica estructural de la cromatina, regulant principalment la seva accessibilitat i la seva compactació (Alberts *et al.*, 2014).

1.4. Introducció a la metilació del DNA

La metilació del DNA és, possiblement, la modificació epigenètica més àmpliament estudiada en mamífers. Es produeix principalment per la modificació covalent dels residus de citosina, en dinucleòtids citosina-guanina (CpG), encara que existeixen altres patrons de metilació minoritaris. La gran majoria d'aquests dinucleòtids en el genoma humà, es troben metilats (aproximadament més del 90%); no obstant això, existeixen seqüències riques en CpG, anomenades "*illes CpG*", les quals normalment no es troben metilades en cèl·lules sanes. Les "*illes CpG*" generalment presenten una llargada d'unes 200-2000 bps, tenen un contingut de GC major al 50%, i participen en la regulació de l'expressió genètica. Aproximadament el 60-70% dels gens humans tenen una illa CpG en la seva regió promotora, que modula la seva capacitat transcripcional en diferents teixits. Els dinucleòtids CpG metilats acostumen a trobar-se en grans seqüències repetitives (LINE-1, SINE/seqüències Alu, etc.) (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). La metilació del DNA té un paper fonamental en molts esdeveniments biològics, com ara, l'expressió gènica, el desenvolupament embrionari, la proliferació cel·lular, la diferenciació i l'estabilitat del cromosoma. El DNA metilat es troba en un estat de cromatina més densament empaquetat i menys accessible per als factors de transcripció (Alberts *et al.*, 2014).

En moltes plantes i animals, la metilació del DNA consisteix, com hem dit abans, en l'addició catalítica d'un grup metil en la cinquena posició en l'anell de citosina, a través d'enzims anomenats DNA-metiltransferases (DNMTs) (Robertson *et al.*, 1999).

El perfil de metilació genòmic exerceix un paper central en la impressió de gens, el desenvolupament embrionari, el silenciament gènic o la inactivació del cromosoma X en femelles, i la regulació del cicle cel·lular. S'ha demostrat que la metilació aberrant o inusual del DNA sovint està relacionada amb la pèrdua d'homeòstasi (tendència a mantenir l'equilibri i l'estabilitat interna) del DNA i la inestabilitat genòmica, que condueixen al desenvolupament de malalties humanes, com el càncer (Esteller and Herman, 2002; Feinberg and Tycko, 2004).

La importància de la metilació va impulsar el desenvolupament de mètodes analítics amb una gran sensibilitat i fiabilitat per explorar estratègies diagnòstiques i terapèutiques innovadores (Fraga and Esteller, 2002; Alonso *et al.*, 2015). A més, la capacitat de detectar i quantificar la metilació d'una forma eficient i precisa s'ha tornat essencial per a l'estudi del càncer, l'expressió genètica, les malalties genètiques, així com per a molts altres aspectes importants de la biologia. Fins a la data, s'han desenvolupat diversos mètodes per detectar/quantificar la metilació del DNA. Això no obstant, la tècnica més comuna utilitzada en l'actualitat segueix sent el mètode de conversió per bisulfit (*bisulfite conversion method*). Aquesta tècnica implica tractar el DNA amb bisulfit, que converteix citosines no metilades en uracil (Shapiro *et al.*, 1973). Les citosines metilades romanen sense canvis durant el tractament. Un cop s'ha produït la conversió, el perfil de metilació del DNA pot determinar-se mitjançant amplificació per PCR seguida d'una seqüenciació d'aquest (Frommer *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1994), xips de DNA (Bibikova *et al.*, 2006) o *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS) (Lister and Ecker, 2009). A més de diversos mèrits del mètode de seqüenciació genòmica amb bisulfit, com ara, ser altament qualitativa i quantitativa, es diu que serveix com a principi fonamental per a molts mètodes derivats per interpretar millor el misteri de la metilació del DNA.

1.5. Hipometilació del DNA: una característica omnipresent de la carcinogènesi

Un dels primers canvis epigenètics descrits o observats en càncer humà van ser les pèrdues de la metilació del DNA, és a dir, residus de m⁵C substituïts per residus C no metilats (Feinberg and Vogelstein, 1983; revisat per Ehrlich, 2009). A més, estudis recents, han confirmat que aquesta pèrdua de metilació acompanya, gairebé de forma constant, a la hipermetilació del genoma, en seqüències diferents (Yamashita *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2006). Els canvis de metilació en dinucleòtids CpG, poden tenir un elevat grau de dependència en *cis*, no només en les posicions veïnes, sinó també en un context regional (Frigola *et al.*, 2006).

S'ha observat que la hipometilació del DNA apareix en adenomes, carcinomes i metàstasis. La hipometilació de les seqüències altament repetitives del DNA, que comprèn aproximadament la meitat del genoma, és en gran part, responsable de la hipometilació global, que s'observa tan freqüentment en càncer. En condicions normals, aproximadament, el 3-4% de les citosines del DNA humà es troben metilades (això representa, aproximadament, el 90-95% de les citosines en llocs CpG); per contrapartida, pot haver-hi una disminució de fins al 30% en citosines metilades, de cèl·lules malignes, quan són comparades amb cèl·lules normals (Ehrlich, 2009).

Les deficiències globals en el contingut de m⁵C, es troben en gairebé tot tipus de càncer però no en tots els espècimens. De la mateixa manera que hi ha diferències específiques segons el

tipus de càncer i els patrons d'alteracions en la metilació genòmica, també ocorre que algunes seqüències de DNA exhibeixen diferent susceptibilitat a la hipometilació, i la naturalesa d'aquestes seqüències també depenen del tipus de càncer. En càncer colo rectal, la hipometilació és més pronunciada amb el grau de malignitat i s'observa una correlació entre l'envelliment de l'individu i el grau d'hipometilació (Suzuki *et al.*, 2006).

1.6. Seqüències repetitives LINE-1

Els elements nuclears llargs intercalats o LINEs (Long Interspersed Nuclear Element) són un grup de retrotransposons no-LTR (Long Terminal Repeat) que es troben àmpliament difosos en el genoma de molts eucariotes. Formen una família de transposons, on cada seqüència LINE té aproximadament 6.000 bps. L'única seqüència abundant i activa en humans és LINE-1 (L1), la qual està composta d'elements transposables en el DNA d'alguns organismes (Beck *et al.*, 2011).

Les seqüències LINE-1 comprenen, aproximadament, el 17% del genoma humà i tenen una longitud d'unes 6.000 bps. Tot i que la majoria són inactives, algunes d'elles posseeixen la capacitat de mobilitzar-se. Encara que molts aspectes del seu mecanisme de retrotransposició segueixen sent poc compresos, probablement, s'integren al DNA genòmic mitjançant un procés anomenat transcripció inversa, que implica la transcripció i el processament d'un intermedi de RNA, l'exportació d'aquest mRNA, la traducció i modificacions postranscripcionals, retorn al nucli i transcripció inversa a DNA que s'integra en el genoma (Beck *et al.*, 2011).

En cèl·lules somàtiques normals, les seqüències LINE-1 es troben majoritàriament metilades, restringint les activitats dels retrotransposons i evitant així la inestabilitat genòmica. Aquestes seqüències LINE-1 són moderadament riques en dinucleòtids CpG; la majoria d'aquests es troben metilats i localitzats en la regió 5', comportant-se com a promotors interns. Malgrat això, la freqüent hipometilació d'aquestes seqüències, en diversos tipus de càncers humans, es considera que representa, en gran mesura, la hipometilació global del genoma (Ogino *et al.*, 2008).

Diversos estudis han mostrat una relació d'esdeveniments genòmics importants entre la carcinogènesi colorectal (CRC) i la metilació de LINE-1, entre els quals destaca l'estudi sobre el qual està basat aquest treball, publicat el 2012, i amb la col·laboració del grup en el qual he realitzat aquest projecte (Kamiyama *et al.*, 2012). En aquest treball es van avaluar pacients procedents del Japó amb càncer de còlon que presentaven càncers sincrònics (dos càncers independents detectats en el moment de la cirurgia), i d'altres que desenvolupaven neoplàsies metacròniques (dos càncers independents detectats a períodes diferents de temps). Es va comparar, el nivell de desmetilació relativa (RDL) de seqüències LINE-1 en teixits de càncer i en mucosa colònica no cancerosa (NCM) de pacients amb un únic o amb múltiples càncers de còlon. Per tal de portar-ho a terme es va emprar una tècnica de PCR quantitativa sensible a la metilació anomenada MethyLight (Weisenberger *et al.*, 2005). Van observar que hi havia més desmetilació (major RDL) en la NCM dels pacients amb càncer sincrònic i també en aquells que presentaven múltiples càncers, que aquells que en presentaven un d'únic. No només això, sinó que els pacients que tenien un càncer únic i elevats nivells de desmetilació en la NCM presentaven una major incidència de desenvolupament de tumors metacrònics. La qual cosa indica que la hipometilació de LINE-1 en la NCM pot ser utilitzada com a biomarcador predictiu epigenètic per a risc de CRC múltiple. Aquesta observació també suggereix l'existència d'un **camp epigenètic per a la carcinogènesi**, és a dir, alteracions epigenètiques pretumorals en la mucosa que afavoreixen el

desenvolupament i progressió de tumors. Les mostres analitzades en aquell treball, tanmateix, no van permetre estudiar la prevalença i extensió d'aquest camp epigenètic. En aquell estudi es va analitzar únicament una mostra normal per pacient, i la distància de la mostra al tumor associat no era coneguda en la majoria dels casos, amb la qual cosa no es va poder determinar l'extensió del camp epigenètic. A més, les mostres procedien de biòpsies congelades que no s'havien microdisseccionat, i per tant, no es va poder determinar quin tipus cel·lular estava patint la desmetilació. La utilització de mostres fixades en formalina i preservades en parafina facilitaria la microdissecció per a poder analitzar-ho.

2. OBJECTIVES

For this experimental work, it was proposed as a principal objective the analysis of methylation of the repetitive sequences LINE-1 in FFPE samples and frozen samples of primary colorectal tumors and in the associated colonic mucosa as a biomarker of propensity for multiple cancers.

This is a continuation of an already initiated project, in which the levels of genomic methylation in tumor and mucosa samples from colorectal cancer patients (both with single tumors and with multiple synchronous tumors) had been analyzed by a QPCR-based technique named MethyLight, and a derivate of it named LINE-1 MS-QPCR.

The preliminary data from our group, as well as data that they have already published using a cohort of Japanese patients, indicated that demethylation of LINE-1 sequences, as markers of genomic methylation, was associated with a greater predisposition to multiple cancers. In this study we wanted to corroborate these observations using a cohort of patients from Catalonia. In addition, we wanted to investigate the extent of this demethylation along the colonic mucosa, to determine its usefulness as a risk marker in the clinical ambit. In this context, it was essential to establish that the QPCR-based technique is also functional in DNA purified from FFPE samples, by large the most common type of specimens in clinical settings.

The specific aims were:

1. Test the LINE-1 MS-QPCR on DNA from CRC samples, purified from FFPE and frozen specimens.
2. Analyze differences between NCM and cancers from CRC patients.
3. Analyze differences between two independent NCM samples obtained from the same patients.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Mostres de pacients i línies cel·lulars

Les mostres de teixits de 5 pacients amb CRC sincrònics, fixades en formalina embegudes en parafina (FFPE), es van obtenir de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Les mostres de teixits congelats de 8 pacients amb CRC únics es van obtenir de Human Cooperative Tissue Network (CHTN, <https://www.chtn.org/>). Totes aquestes mostres compten amb el consentiment informat dels pacients i el projecte ha sigut aprovat per el Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. La informació clinicopatològica es mostra en les taules 1 i 2. Les línies cel·lulars de càncer de còlon, DLD-1 i HCT-116, utilitzades com a control en tots els experiments realitzats amb la tècnica LINE-1 MS-QPCR, es van obtenir de American Type Culture Collection (<https://www.lgcstandards-atcc.org/>). La primera d'elles, DLD-1, presenta nivells relativament baixos de metilació genòmica, mentre que la segona, HCT-116, té nivells molt alts de metilació.

Taula 1. Dades clinicopatològiques de pacients amb 2 CRC (HUGTP, Catalunya).

CASOS	Gènere	Edat	T1 Localització	T2 Localització
2	Dona	47	Recte	Transversal
32	Dona	77	Esplènic	Sigmoide
44	Home	60	Sigmoide	Sigmoide
60	Dona	84	Ascendent	Descendent
80	Dona	84	Rectosigmoid	Rectosigmoid

Taula 2. Dades clinicopatològiques de pacients amb CRC únic (CHTN, EEUU).

CASOS	Gènere	Edat	T1 Localització
524	Dona	68	Proximal
686	Dona	87	Proximal
699	Dona	61	Proximal
719	Home	77	Proximal
664	Dona	88	Distal
442	Dona	86	Proximal
528	Dona	80	Distal
62	Home	62	Proximal

3.2. Microdissecció de mostres FFPE de pacients amb CRC

Les mostres de teixits de pacients fixades en formalina embegudes en parafina (FFPE) es van observar en el microscopi per poder identificar correctament les diferents morfologies de cada teixit posteriorment estudiat (epiteli del còlon (E), teixit tumoral (T) i capa muscular (M)). Basant-nos en aquestes diferents morfologies, es van seleccionar diverses àrees per extreure de forma independent el DNA.

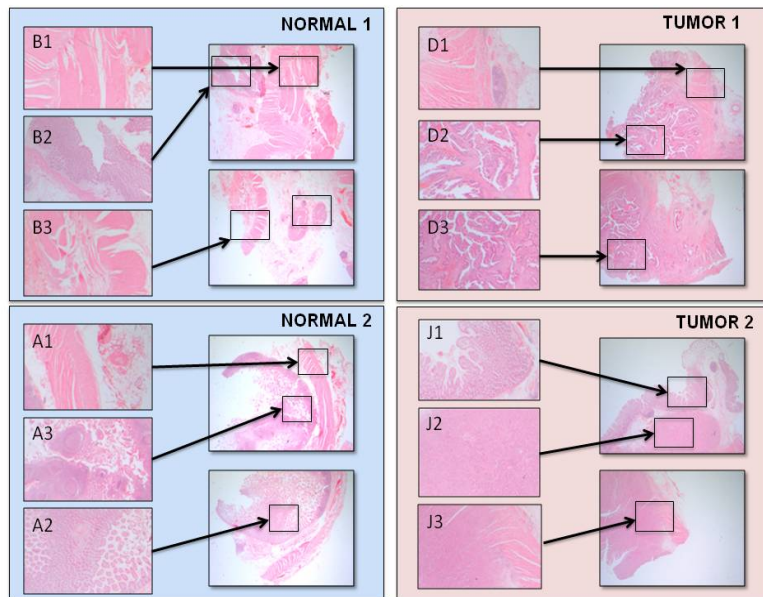


Figura 1. Imatges del microscopi de 4 microseccions fetes d'un cas de CRC representatiu. B1, B3 corresponen a la part muscular del teixit normal 1 i A1 a la del normal 2. A3, A2 corresponen a la part epitelial del teixit normal 2 i B2 a la del normal 1. Pel que respecta al tumor, D1 presenta una estructura muscular dins del tumor 1 i D2 i D3 teixit tumoral, al igual que J1, J2, J3, els quals són teixits tumorals del tumor 2.

Com a exemple, en la Figura 1 es mostren les imatges extretes a partir microscopi del Cas 2, el qual es va analitzar, on es poden observar 2 teixits normals i els 2 tumors respectius o associats, i les diverses morfologies que es van extreure: epiteli, muscular i teixit tumoral.

3.3. Extracció i purificació del DNA de mostres FFPE

L'extracció de DNA es va realitzar utilitzant el mètode Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (ThermoFisher), seguint el protocol subministrat pel fabricant. Es tracta d'un mètode per a l'eficient purificació automatitzada del DNA genòmic a partir de seccions de teixits FFPE. Pot processar fins a 16 mostres en 30 minuts després d'una digestió amb Proteïna K durant tota la nit. L'instrument permet purificar el DNA mitjançant partícules paramagnètiques revestides amb sílice (PMPs), les quals proporcionen una fase mòbil sòlida, que optimitzen la captura, el rentat i l'elució del material objectiu. El protocol detallat es troba disponible on-line (<https://www.promega.es/resources/protocols/technical-manuals/101/maxwell-16-ffpe-plus-lev-dna-purification-kit/>). Per a facilitar la lectura d'aquest treball es presenta tot seguit un resum del protocol:

Protocol Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification

- A.** Preparació Solució Stock de Proteïna K per al preprocessament de la mostra
- I. Afegir 500 µL de Nuclease-Free Water a cada tub de Proteïna K liofilitzada, i barrejar suaument fins a dissoldre. La concentració final de la Proteïna K haurà de ser de 20 mg/mL.

- II. Dispensar la solució de Proteïnasa K en petites alíquotes. La Proteïnasa K es pot congelar i descongelar fins a cinc vegades sense pèrdua important d'activitat. Abans d'utilitzar-la, però, s'ha de descongelar i guardar-la en gel.

B. Protocol Preprocessament de la mostra – Teixits FFPE

- I. Rascar 1-10 x 5 µm d'una secció fina de cada mostra de teixit FFPE en un microtub (cada mostra en el seu corresponent microtub).
- II. Centrifugar les mostres breument per recol·lectar la mostra al fons del tub. Afegir en cada tub de mostra 20 µL de Proteïnasa K i 180 µL de Incubation Buffer.
- III. Incubar els tubs de mostres a 70 °C durant tota la nit.
- IV. Afegir dos volums de Lysis Buffer a cada mostra (per exemple: s'hi s'ha afegit en el pas II, 200 µL de Incubation Buffer/Proteïnasa K en el substrat sòlid, s'afegiran 400 µL de Lysis Buffer).
- V. Donar un lleuger vòrtex a l'anterior mescla.
- VI. Tancar la tapa de cada microtub i desar-los fins que es dugui a terme l'extracció automàtica de DNA mitjançant l'instrument Maxwell® 16 LEV.

Nota: No refrigerar o congelar les mostres. Deixar-les a temperatura ambient tota la nit si és necessari.

C. Preparació de les mostres pels cartutxos del Maxwell® 16 LEV

- I. Canviar els guants abans de manipular els cartutxos, LEV Plungers i els Tubs d'Elució. Col·locar cada cartutx en la plataforma, amb el costat de l'etiqueta lluny dels Tubs d'Elució.

Nota: Si es processen menys de 16 mostres, s'ha d'intentar centrar els cartutxos en la plataforma.

- II. Col·locar els LEV Plungers en el pou o posició #8 de cada cartutx. La posició #8 és la més propera al Tub d'Elució.
- III. Afegir 50 µL de Nuclease-Free Water al fons de cada Tub d'Elució.
- IV. Transferir la mostra al pou o posició #1 del cartutx. La posició #1 és la que es troba més allunyada del Tub d'Elució.

Afegir la plataforma amb els reactius ja preparada en l'instrument i procedir a fer la purificació amb les indicacions pertinents proporcionades pel propi instrument (període de temps aproximat: 30 minuts).

3.4. Tractament amb bisulfit per a l'anàlisi de la metilació del DNA

Per a l'anàlisi de la metilació del DNA es va realitzar un tractament amb bisulfit de les mostres de DNA genòmic utilitzant el EZ DNA Methylation Kit™ (Zymo Research). Aquest kit proporciona un procediment simplificat que fa més eficient la conversió per bisulfit del DNA. Es basa en una reacció de tres passos que es duu a terme entre una citosina i el bisulfit sòdic, on la citosina es

converteix en uracil. En el primer pas, el DNA es desnatura mitjançant tractament alcalí i incubació a 95 °C per a obtenir DNA monocatenari. En el segon pas, les citosines se sulfonen mitjançant l'addició del bisulfit sòdic, que s'incorpora a l'anell pirimidínic de les citosines. En aquest pas, les citosines no metilades, pateixen una desaminació, es catalitza la dessulfonació que va acompanyada de la desaminació del C4 de l'anell de citosina. En el tercer i últim pas, es produeix l'eliminació del grup sulfit, mitjançant incubació a pH alcalí. La innovadora tecnologia de dessulfonació en columna del EZ DNA Methylation KitTM, elimina possibles precipitacions que podrien arribar a afectar al resultat final. El kit està dissenyat per reduir la degradació de la mostra i minimitzar la pèrdua de DNA durant el tractament, tot garantint la seva conversió completa. El protocol detallat es troba disponible on-line (<https://www.zymoresearch.de/ez-dna-methylation-kit>). Per a facilitar la lectura d'aquest treball es presenta tot seguit un resum del protocol:

Protocol EZ DNA Methylation KitTM

Especificacions

- ⇒ Mostra de DNA inicial afegida: mostres que continguin entre 500 pg - 2 µg de DNA. Per obtenir resultats òptims, la quantitat de DNA d'entrada ha de ser de 200 a 500 ng. En el nostre cas vam afegir 200 ng.
- ⇒ Eficiència de conversió: >99% dels residus de C no metilats es converteixen a U; >99% de protecció de les citosines metilades.
- ⇒ Recuperació de DNA: >80%

Preparació de reactius

- **Preparació del CT Conversion Reagent:** El CT Conversion Reagent subministrat dins del kit és una barreja sòlida i s'ha de preparar abans del primer ús seguint els següents passos:
 1. Afegir 750 µL d'aigua i 210 µL de M-Dilution Buffer en un tub de CT Conversion Reagent
 2. Barrejar a temperatura ambient donant un vòrtex o sacsejant durant 10 minuts.
- **Emmagatzematge:** El reactiu és sensible a la llum, de manera que cal minimitzar la seva exposició a la llum. Per obtenir els millors resultats, s'ha d'utilitzar immediatament després de la seva preparació. Si no s'utilitza en aquest interval de temps, la solució es pot emmagatzemar durant tota una nit a temperatura ambient, una setmana a 4 °C o fins a un mes a -20 °C.
- **Preparació del M-Wash Buffer:** Afegir 24 mL d'etanol 100% a 6 mL de M-Wash Buffer concentrat (D5001), o 96 mL d'etanol 100% a 24 mL de M-Wash Buffer concentrat (D5002) abans del seu ús.

- A.** Afegir 5 µL de M-Dilution Buffer a la mostra de DNA, ajustar o enrasar fins a 50 µL amb aigua i, finalment, barrejar la mostra.

Exemple: Per 14 µL de mostra de DNA, afegir 5 µL de M-Dilution Buffer i 21 µL d'aigua.

- B.** Incubar la mostra, durant 15 minuts, a 37 °C.

- C. Després de l'anterior incubació, afegir 100 µL del CT Conversion Reagent preparat, a cada mostra i barrejar.
- D. Incubar la mostra a 50 °C, en total fosc, durant unes 12-16 hores.
- E. Incubar la mostra a 0-4 °C (per exemple, en gel) durant 10 minuts. Les mostres es poden mantenir a 4 °C durant un màxim de 20 hores.
- F. Afegir 400 µL de M-Binding Buffer a la columna Zymo-Spin™ i col·locar la columna en un tub de recollida proporcionat.
- G. Carregar la mostra (del pas 5) en la columna Zymo-Spin™, la qual conté el M-Binding Buffer. Tancar la tapa i barrejar invertint la columna diversos cops.
- H. Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons.
- I. Afegir 100 µL de M-Wash Buffer a la columna. Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons.
- J. Afegir 200 µL de M-Desulphonation Buffer a la columna i deixar reposar a temperatura ambient (20-30 °C) durant 15-20 minuts. Després de la incubació, centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons.
- K. Afegir 200 µL de M-Wash Buffer a la columna. Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons. Afegir uns altres 200 µL de M-Wash Buffer i centrifugar durant 30 segons més.
- L. Col·locar la columna en un tub de microcentrífuga de 1,5 mL. Afegir 10 µL de M-Elution Buffer directament a la matriu de la columna. Centrifugar durant 30 segons a màxima velocitat per eluir el DNA.

Per a augmentar el volum de mostra disponible, posteriorment al tractament amb bisulfit, es van dur a terme dilucions 1:8 en aigua estèril de totes les mostres obtingudes, ja que es va observar una bona reproductibilitat en tot el rang d'estudi.

3.5. Anàlisi de la metilació de les seqüències LINE-1 mitjançant PCR específica de metilació (LINE-1 MS-QPCR)

En aquest treball es va aplicar la tècnica LINE-1 MS-QPCR, una versió simplificada de la tècnica MethyLight (Weisenberger *et al.*, 2005) que es va utilitzar en la publicació original, en la qual es va descriure, per primera vegada, que el nivell de metilació de les seqüències LINE-1 era un marcador predictiu del risc de desenvolupar tumors metacrònics (Kamiyama *et al.*, 2012). Totes dues tècniques es basen en l'amplificació, per separat, de seqüències LINE-1 originalment metilades i seqüències LINE-1 originalment desmetilades. Per a això es dissenyen dos parells de *Primers* que reconeixen les diferències en els llocs CpG, resultants del tractament amb bisulfit, en funció del seu estat original de metilació. La principal diferència és que mentre que la tècnica MethyLight utilitza sondes fluorescents per quantificar en temps real l'amplificació dels productes de PCR, la tècnica LINE-1 MS-QPCR utilitza SYBR-Green. Paradoxalment, la utilització de sondes molt específiques en la tècnica MethyLight planteja dos inconvenients. El primer és que el preu per reacció augmenta considerablement. El segon es deriva precisament de la seva elevada especificitat. Així, si el producte d'amplificació presenta algun tipus de polimorfisme (habituals en seqüències repetitives), o el seu nivell de metilació no es correspon completament amb l'esperat

(és a dir, completament metilat o completament desmetilat), el producte d'amplificació no és reconegut per la sonda i per tant no és quantificat. La menor especificitat del SYBR-Green resulta ser, en aquest cas un avantatge, ja que permet quantificar seqüències que es desviïn lleugerament de la seqüència esperada. En experiments previs, es va comprovar que l'especificitat imposada pel disseny dels *Primers* era suficient per amplificar diferencialment les seqüències LINE-1 originalment metilades de les originalment desmetilades (Gemma Mur, Tesi de Màster, 2012).

A més, en la tècnica MethyLight s'utilitza una tercera reacció que amplifica les seqüències repetitives Alu independentment del seu nivell de metilació. Aquesta reacció s'utilitza per normalitzar els valors d'amplificació de les seqüències LINE-1 metilades i desmetilades. Així, el valor generat per MethyLight, denominat nivell de desmetilació, expressa el nivell de seqüències LINE-1 desmetilades respecte del total de seqüències Alu. D'altra banda, el valor de LINE-1 generat a la MS-QPCR, denominat ràtio de desmetilació, expressa el nivell de seqüències LINE-1 desmetilades enfront del de seqüències LINE-1 metilades.

En ambdós casos, totes les amplificacions de les mostres a analitzar es realitzen en paral·lel amb una mostra control que serveix per normalitzar i permet comparar diferents experiments. En aquest treball hem utilitzat el DNA genòmic de la línia cel·lular DLD-1 com normalitzador, principalment perquè és una línia ben caracteritzada, disponible en molts laboratoris i fàcilment cultivable in vitro. Així, tant el nivell de desmetilació obtingut mitjançant MethyLight com el ràtio de desmetilació obtingut mitjançant LINE-1 MS-QPCR es normalitzen enfront d'aquesta mostra control, passant a denominar nivell relatiu de desmetilació (RDL) o ràtio de desmetilació relatiu (RDR), respectivament.

La reacció es va realitzar en un ciclador tèrmic (LightCycler 480 II thermocycler), amb capacitat d'il·luminar cada mostra amb un feix de llum a una longitud d'ona específica, i de detectar la fluorescència emesa pel fluoròfor excitat. Aquesta fluorescència es mesura amb un detector durant una fase de temperatura curta, amb una durada de només uns pocs segons en cada cicle. El colorant només exhibeix fluorescència quan està lligat al DNA bicatenari (és a dir, al producte d'amplificació de la PCR). Les concentracions de reactius, temperatures i períodes de durada de cada cicle es detallen en el següent protocol.

Protocol de LINE-1 MS-QPCR

Per estimar el ràtio de molècules LINE-1 no metilades vs metilades (ràtio de desmetilació), es van realitzar PCR quantitatives específiques de metilació (MS-QPCR) amb dos conjunts de *Primers* LINE-1, per amplificar per separat les seqüències LINE-1 metilades i les no metilades, després del tractament amb bisulfit del DNA genòmic.

Cal remarcar, si escau, que els *Primers* i les condicions utilitzades en aquest treball van ser dissenyats i provats prèviament en el laboratori per una anterior estudiant de Màster i els seus supervisors investigadors.

Taula 3. Seqüències dels Primers utilitzats en la qPCR.

Unmethylated Forward (PB215)	5'-GGCGTAGGTTAGTGGGTGCGC-3'
Unmethylated Reverse (PB216)	5'-AAACCCGATTTTCCAAATAGGTCCG-3'
Methylated Forward (PB217)	5'-GGTGTAGGTTAGTGGGTGTGT-3'
Methylated Reverse (PB218)	5'-AAACCCAATTTTCCAAATACATCCA-3'

Es van preparar dues mescleres de reacció; una de les quals contenia els *Primers* per a les seqüències metilades de LINE-1 (PB217 i PB218), i una altra, els *Primers* per a les seqüències no metilades (PB215 i PB216). En la següent taula adjunta es mostren les quantitats utilitzades per a cada reactiu; els reactius utilitzats de la MS-QPCR són els mateixos per ambdues reaccions. Per a preparar la Master Mix final, es van multiplicar aquests valors per el número de mostres a analitzar, sumant un 5% que es considera dintre del rang habitual d'error de pipeteig.

Taula 4. Concentracions de reactius per a MS-qPCR.

	Co	Cf	Per reaction
H2O			3.10 µL
MasterMix	2 X	1 X	5.00 µL
Template			1.50 µL
Primer Forward	10.0 µM	0.2 µM	0.20 µL
Primer Reverse	10.0 µM	0.2 µM	0.20 µL

Vol reaction
10 µL

La SYBR® Green MasterMix (Qiagen) està dissenyada per a la quantificació mitjançant MS-QPCR utilitzant *Primers* que flanquegen la regió d'interès. La MasterMix conté Buffer, dNTPs, DNA polimerasa termoestable i el fluoròfor SYBR® Green.

Es van afegir 8,5 µL de Master Mix final en cada pou pertinent del 396-well PCR plate; i posteriorment 1,5 µL de DNA template (mostres de DNA de pacients tractades amb bisulfit).

L'amplificació de les mostres de DNA es va realitzar en el termociclador LightCycler 480 II (Roche), en un volum final de 10 µL, utilitzant el protocol o les condicions generals descrites en la Taula 5. Un cop dut a terme el protocol de la MS-QPCR per a cada mostra en particular, es va realitzar un control de qualitat.

Taula 5. Condicions del protocol de la MS-qPCR en el LightCycler.

Programa	Temperatura (°C)	Nombre de cicles	Temps (hh:mm:ss)
Activació	95	1	00:10:01
Amplificació	95	40	00:00:10
	61		00:00:10
	72		00:00:15
Fusió/Desnaturalització	95	1	00:00:05
	60		00:01:00
	97		-
Cooling down	37	1	00:05:00

Es van analitzar els seus respectius pics de fusió (Melting Peaks) i corbes d'amplificació (Amplification Curves). Per als productes metilats es van observar temperatures de fusió d'uns 79-81 °C i, per als productes no metilats, d'uns 77-78 °C.

En l'exemple adjunt a continuació (Figura 2) es mostren els pics de fusió i les corbes d'amplificació de les línies cel·lulars emprades com a controls positius (DLD-1 i HCT-116), per observar la tendència dels resultats de cada cas fet, i la diferència entre les seqüències metilades i les desmetilades. L'aigua es va utilitzar en tots els anàlisis com a control negatiu o com a blanc, per visualitzar possibles contaminacions i possibles falsos positius. Es pot observar com els amplicons de les seqüències LINE-1 metilades mostren una major temperatura de fusió que les desmetilades; aquesta diferència ve donada per la desigualtat en el contingut o proporció en GC entre ambdues seqüències, deguda a la transformació de les citosines no metilades en timines després del tractament amb bisulfit i amplificació mitjançant qPCR; a raó que els parells de bases G-C presenten 3 ponts d'hidrogen i que els parells A-T en presenten 2.

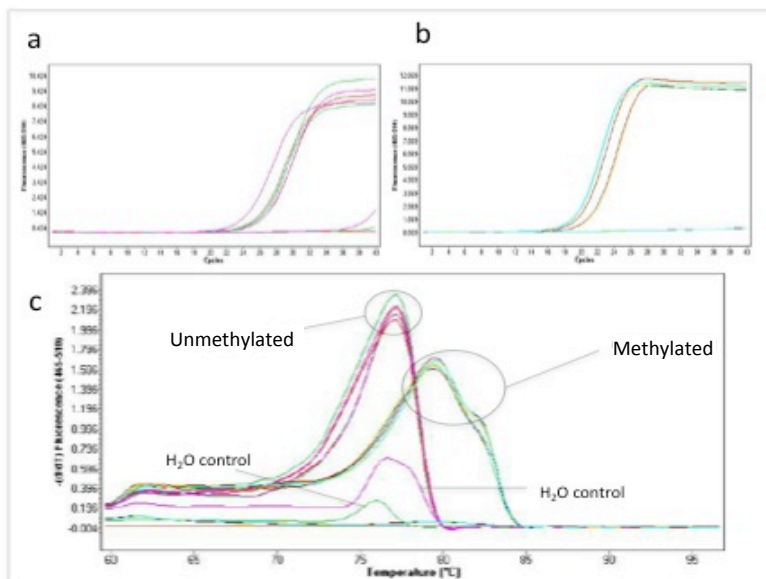


Figura 2. Corbes d'amplificació per les reaccions desmetilades (a) i metilades (b) de les seqüències LINE-1 de DLD-1 i HCT-116. Pics de fusió on s'observen diferents temperatures de fusió per a les seqüències metilades i desmetilades (c).

Posteriorment, les dades es van processar i analitzar, utilitzant el software LightCycler. Aquest software utilitza el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, calculant automàticament el RDR i el seu error estàndard a partir dels replicats interns. Es van comprovar les corbes d'amplificació i de fusió, i es va realitzar

una quantificació relativa avançada per determinar el ràtio de desmetilació (molècules desmetilades de LINE-1 vs molècules metilades de LINE-1). Els valors de ràtio de desmetilació, es van normalitzar al valor del ràtio de desmetilació de DLD-1, línia cel·lular de càncer de còlon utilitzada com a control, en cada MS-QPCR feta, juntament amb HCT-116; generant la relació de desmetilació relativa (RDR). La primera d'elles, DLD-1, presenta nivells relativament baixos de metilació genòmica, mentre que la segona, HCT-116, té nivells molt alts de metilació, és a dir, la proporció de seqüències LINE-1 completament desmetilades és més de 4 vegades major en DLD-1 que en HCT-116.

El valor RDR esmentat, representa la relació entre amplicons desmetilats i amplicons metilats en les mostres de DNA, en comparació amb aquesta proporció en DLD-1 (Equació 1).

$$RDR = \frac{U_s / M_s}{U_{ref} / M_{ref}}$$

Equació 1. Ràtio de Desmetilació és la relació entre les seqüències LINE-1 desmetilades (U) i les metilades (M) en una mostra en particular. El Ràtio Relatiu de Desmetilació (RDR) és el ràtio desmetilació entre una mostra (s) i la referència.

3.6. Electroforesis en gels d'agarosa

La longitud dels productes d'amplificació obtinguts mitjançant la tècnica LINE-1 MS-QPCR es va comprovar mitjançant electroforesis en gels d'agarosa al 2% en TBE 1x (Tris/Borate/EDTA). Per a la tinció dels gels es va afegir SYBR Safe a un volum final d'1,5 µL d'una solució 20.00x en 30 mL de solució d'agarosa, abans de la seva gelificació. Per a l'aplicació de les mostres en els pous del gel, s'afegeixen en cada pou una mescla de: 3 µL d'aigua, 2 µL de colorant de càrrega 6x (Loading Buffer) i 5 µL de la qPCR (afegir en el primer i últim pou uns 3 µL de marcador de pesos moleculars amb bandes cada 100 bp). Les electroforesis es van dur a terme en cubetes d'electroforesis i-MUPID durant 20 minuts a 100V. Els productes d'amplificació es van observar amb il·luminació *trans* UV en l'instrument mitjançant el programa Gel Doc (Biorad).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En tots els casos analitzats, i en els quals tot seguit entrarem en detall, es van calcular els seus ràtios de desmetilació relatius (RDR) en els teixits normals i tumorals, referenciats a DLD-1, és a dir, es va utilitzar com a referència aquesta línia cel·lular, amb un valor de 1,00. El valor de l'altre control positiu, HCT-116, normalment presenta uns valors entre 0,3-0,4, per a una bona representació i concordança de les dades. En l'Equació 1 es mostra com es va realitzar el càlcul dels valors de RDR. A part, tots els experiments amb MS-QPCR es van repetir per duplicat en cada placa, tenint en compte que cada cas analitzat es va fer per triplicar per confirmar que els resultats obtinguts eren representatius.

4.1. Resultats mostres FFPE / mostres congelades de pacients amb CRC

Per comprovar el nivell de desmetilació de LINE-1, es van analitzar un total de 5 casos diferents provinents de mostres parafinades de pacients catalans on tots ells presentaven 2 tumors sincrònics CRC. Aquest tipus de mostres van permetre l'anàlisi de diferents àrees dels teixits a

diverses distàncies dels tumors, per poder comparar millor el ràtio de desmetilació.

En la Figura 3a i 3b, es mostra com a exemple, els resultats obtinguts per a l'amplificació de seqüències LINE-1 metilades i desmetilades del cas 80. En la Figura 3c es mostren les corbes de desnaturalització d'aquest mateix cas, i en el qual s'observa que els productes d'amplificació de les seqüències LINE-1 originalment metilades tenen una temperatura de desnaturalització més alta que les originalment desmetilades.

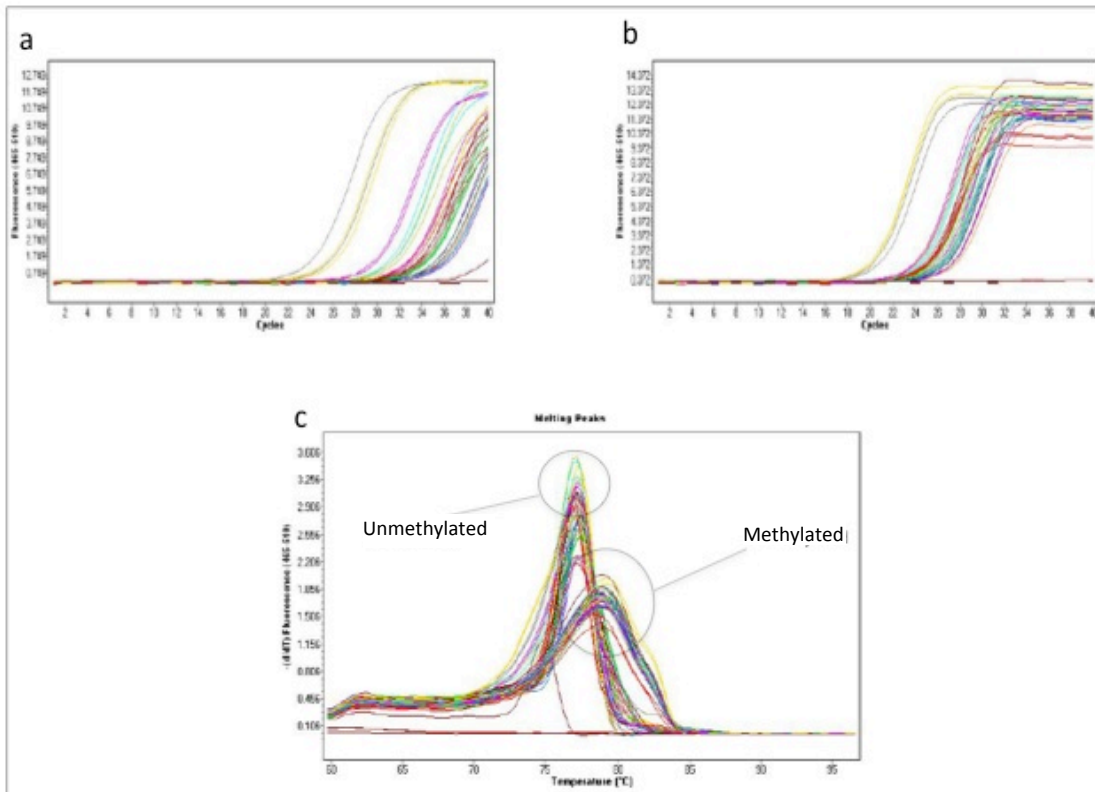


Figura 3. Corbes d'amplificació per les reaccions desmetilades (a) i metilades (b) de les seqüències LINE-1 del cas 80. Pics de fusió on s'observen diferents temperatures de fusió per a les seqüències metilades i desmetilades (c).

Després de la reacció d'amplificació i l'anàlisi de desnaturalització, la longitud dels productes d'amplificació es va verificar mitjançant electroforesis en gel d'agarosa (veure Materials i Mètodes 3.6.). En la Figura 4 es mostra el resultat d'un gel d'agarosa del cas 32, en el qual es veuen els productes d'una de les MS-QPCR i com tenen la longitud esperada de les seqüències amplificades (141 parells de bases).

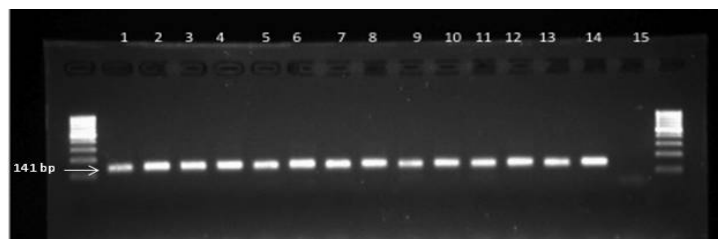


Figura 4. Resultat d'un gel d'agarosa dels productes amplificats d'una de les qPCR del Cas 32. S'observa en cada lateral del gel el Ladder 1000 bp. En els pous 1 i 2, mostra de DLD-1 desmetilada i metilada, respectivament. En els pous 3 i 4, mostra de HCT-116 desmetilada i metilada, respectivament. Pous 5, 7, 9, 11 i 13 seqüències desmetilades de mostres del Cas 32. Pous 6, 8, 10, 12 i 14 seqüències metilades de mostres del Cas 32. Pou 15, aigua, control negatiu (lliure de contaminació, no s'observa cap banda).

En les figures 5 i 6, es mostra el RDR calculat mitjançant MS-QPCR en mostres tumorals i no tumorals de pacients amb 2 CRC sincrònics de la col·lecció de mostres FFPE obtinguda del HUGTP.

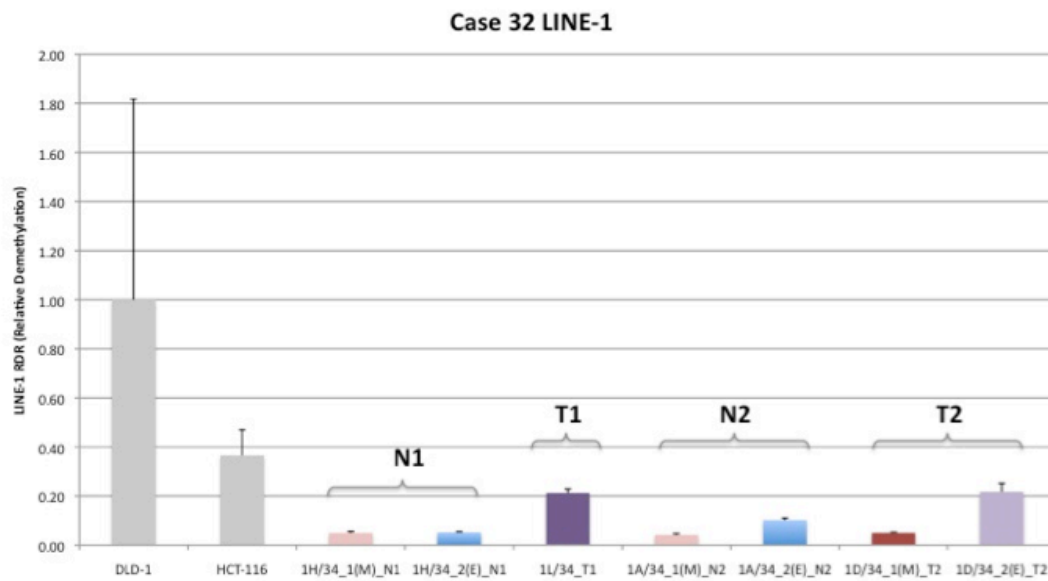
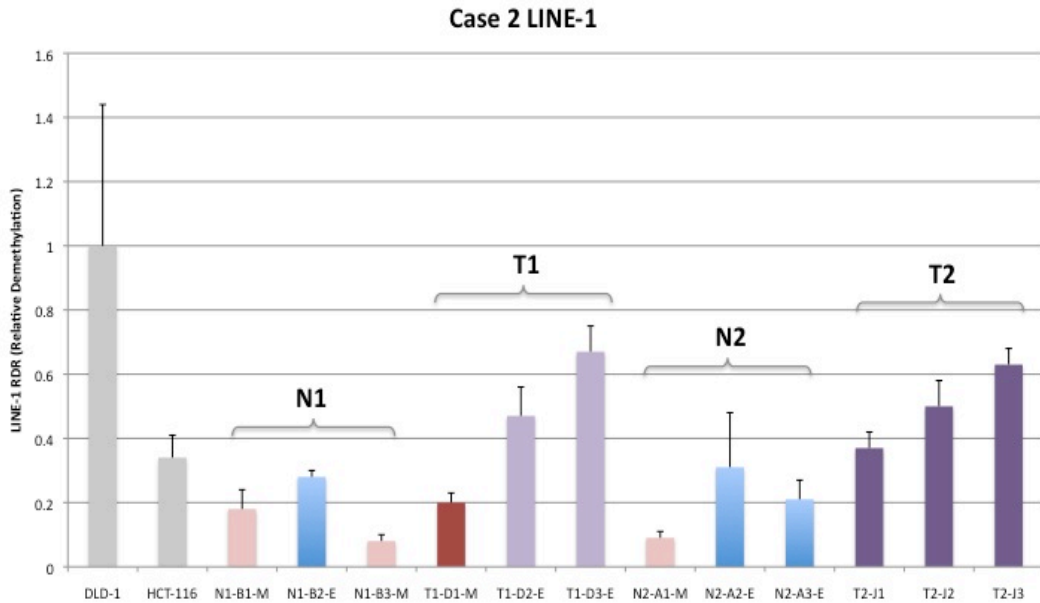
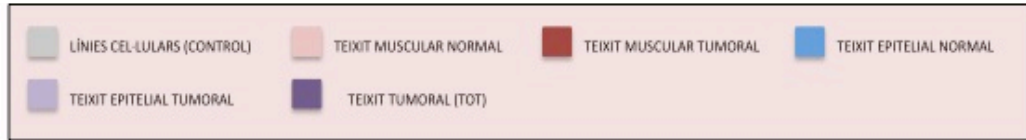


Figura 5. Resultats de casos de pacients amb 2 tumors sincrònics (CRC) en mostres FFPE. Totes les mostres van ser normalitzades a DLD-1. N és normal, T és tumor, M és capa muscular i E epiteli. Es veuen representats els casos 2 (panell superior) i 32 (panell inferior). Les barres d'errors representen l'error estàndard produït en els replicats.

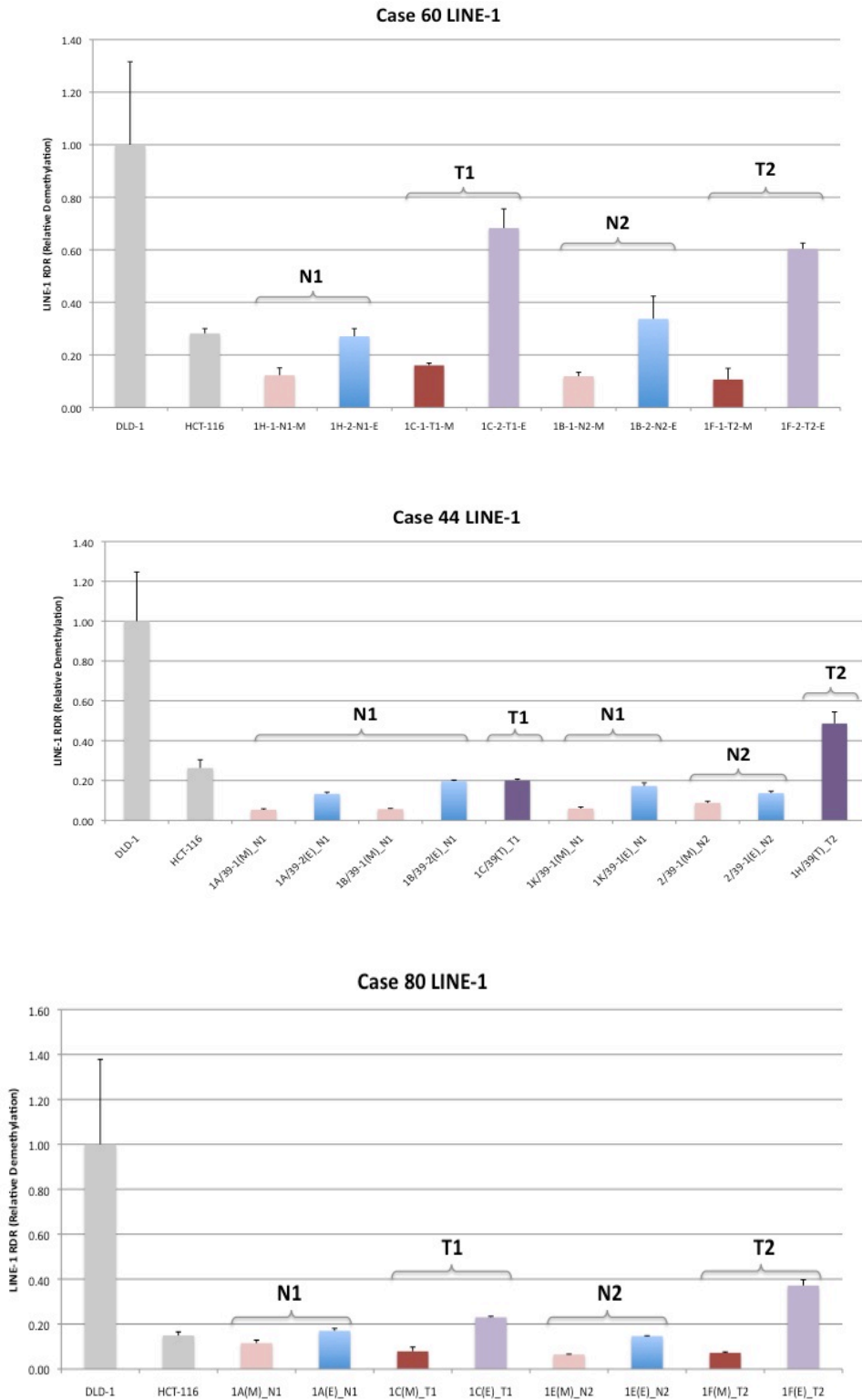


Figura 6. Resultats de casos de pacients amb 2 tumors sincrònics (CRC) en mostres FFPE. Totes les mostres van ser normalitzades a DLD-1. N és normal, T és tumor, M és capa muscular i E epiteli. Es veuen representats els casos 44 (panell superior), 60 (panell central) i 80 (panell inferior). Les barres d'errors representen l'error estàndard produït en els replicats.

Els ràtios de desmetilació de LINE-1 dels teixits normals i tumorals també es van normalitzar o referenciar a DLD-1 (valor de 1), donant els nivells de RDR. Per la qual cosa, valors de RDR majors a 1 en una mostra, indicaven major desmetilació que DLD-1, i per contra, valors de RDR menors a 1, indicaven menor desmetilació que DLD-1.

En concordança amb observacions prèvies, els valors de RDR dels tumors presentaven ràtios o nivells més alts de desmetilació que els normals (Kamiyama *et al.*, 2012). En tots els casos, el teixit normal muscular presentava nivells de desmetilació més baixos que el seu respectiu teixit normal epitelial. Aquesta diferència molt probablement reflecteix que les cèl·lules epitelials tenen una major taxa de desmetilació deguda a la seva major velocitat de divisió. S'ha descrit des de fa ja gairebé 3 dècades, que la desmetilació genòmica correlaciona amb la velocitat de divisió cel·lular en els diferents teixits (Hoal-van Helden and van Helden, 1989). Per una altra banda, també es pot observar que el teixit tumoral, quan és agafat com a un complet, o bé, com a epiteli del tumor, sempre presentava un nivell de desmetilació més elevat que els seus respectius epitelis normals associats. Només en el cas 60 i en el 2 es pot arribar a veure com el teixit muscular del tumor 1 presenta més desmetilació que el teixit muscular normal associat. Aquesta observació podria ser deguda a una inflamació del teixit a causa de la presència del tumor.

Uns altres tipus de mostres que es van analitzar mitjançant MS-QPCR van ser parells de teixits normal/tumor de casos congelats de pacients americans amb un únic CRC. Es van fer un total de 8 parells i dels quals es mostren els resultats de tots ells en la gràfica adjunta a continuació (Figura 7).

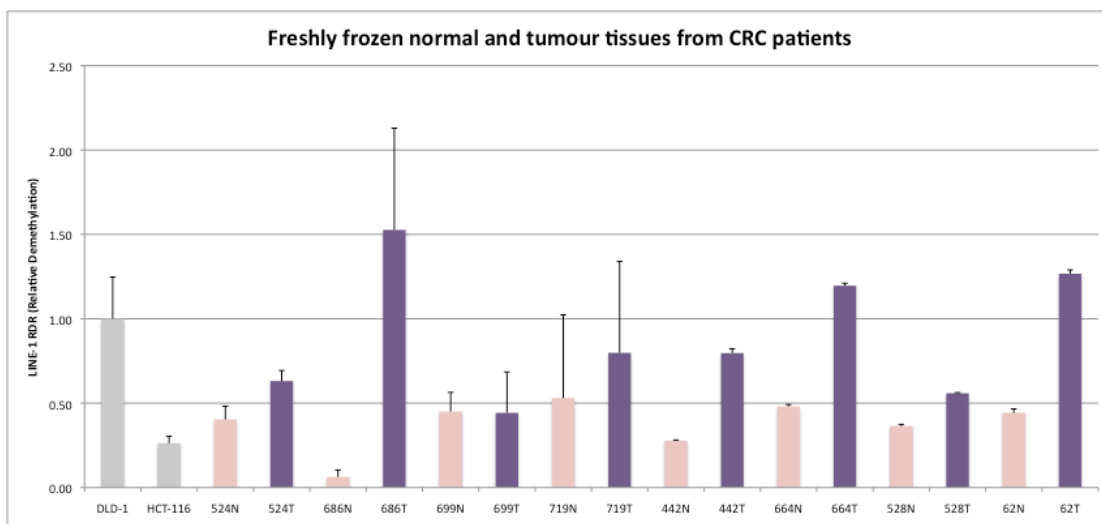


Figura 7. Resultats de casos de pacients amb un CRC en mostres congelades. Es veuen representats un total de 8 casos (524 N/T, 686 N/T, 699 N/T, 719 N/T, 442 N/T, 664 N/T, 528 N/T, 62 N/T). En rosa els valors dels teixits normals i en lila els valors dels teixits tumorals.

En la Figura 8, es mostra l'anàlisi comparatiu de totes les mostres analitzades. En les mostres del CHTN, els teixits normals es troben en un rang d'entre un 20-50% del nivell de DLD-1. Alguns tumors en superen el seu valor, és a dir, es troben més desmetilats. Aquests valors són clarament més alts que els observats en les mostres FFPE. Amb les dades disposades, no vam poder determinar si aquesta diferència es deu al diferent origen (Catalunya vs EEUU), diferents mètodes de preservació (FFPE vs teixit congelat) o diferents mètodes d'extracció del DNA (Maxwell vs

extracció fenòlica). Els tumors presentaven una major desmetilació que els teixits normals, tant en les mostres de CHTN (t-test, $P=2.8 \times 10^{-3}$) com en les mostres de HUGTP (ANOVA, $P=3.9 \times 10^{-9}$).

A més, es va observar una notable correlació en el RDR de les mostres epitelials de teixits normals obtingudes del mateix pacient indicant que els nivells de desmetilació de les seqüències LINE-1 és relativament estable en distintes localitzacions del còlon de cada individu. Aquesta observació és interessant, ja que podria facilitar l'estimació dels nivells de desmetilació genòmica en tot el còlon a partir d'una única biòpsia.

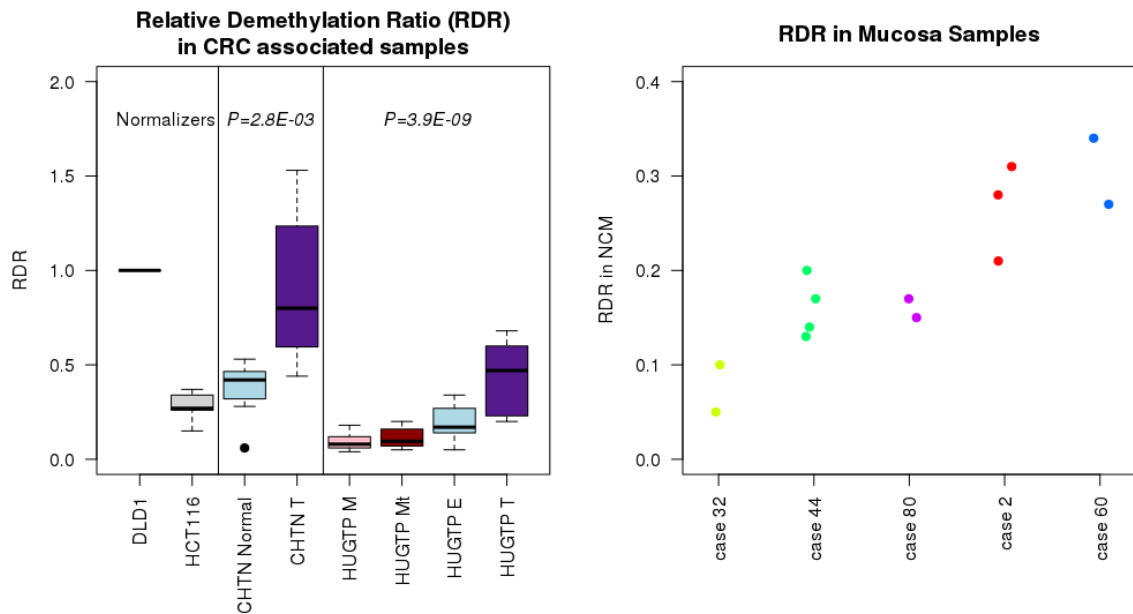


Figura 8. (Esquerra) Nivells de RDR en els diversos grups mostres analitzades en l'estudi. DLD-1 i HCT-116 són els controls. DLD-1 s'ha utilitzat per a normalitzar tots els altres valors. En blau les mostres de teixit normal o de mucosa (E) microdisseccionada de teixits normals. En rosa la capa muscular microdisseccionada de teixits normals. En vermell la capa muscular adjaent als teixits tumorals. En lila els teixits tumorals. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant t-test (per a mostres del CHTN) o ANOVA (per a mostres del HUGTP). (Dreta) Valors de RDR de mucosa (E) microdisseccionada de diversos pacients amb CRC múltiple. Cada punt representa l'anàlisi d'una mostra independent. S'observa una associació en els nivells de desmetilació de les seqüències LINE-1 en funció del pacient. Els casos estan ordenats de menor a major nivell de desmetilació.

4.2. Criteris ètics i de sostenibilitat

Com en qualsevol laboratori, hi ha unes tècniques o consideracions bàsiques que cal tenir en compte per tal de fer un ús correcte de tot el material, equips i instruments; a part de la seguretat mediambiental i del mateix personal del lloc de treball.

Protecció dels donants o pacients

A l'estar treballant amb mostres clíniques o mostres humanes, és important que es disposi d'alguna informació que ajudi a determinar el risc que comporta manipular aquest tipus de mostra: (1) dades mèdiques sobre el pacient, (2) dades epidemiològiques, (3) Informació sobre l'origen geogràfic del pacient o donant. A part, ha d'haver-hi un consentiment informat, una confidencialitat de les dades dels donats i una protecció i seguretat dels investigadors. Les mostres humanes requereixen l'aprovació d'un comitè ètic i el consentiment informat per part dels donants.

Protecció dels treballadors

Cada laboratori ha d'aportar un manual de seguretat o de treball en el qual s'identifiquin els riscos coneguts i potencials, i que s'especifiquin les pràctiques i els procediments encaminats a eliminar o reduir al mínim aquests riscos. A continuació s'exposen els conceptes més importants:

- Els símbols i signes internacionals de perill biològic, químic, corrosiu o explosiu hauran de col·locar-se en les portes o contenidors dels locals on es manipulin microorganismes o compostos de risc elevat
- Només podrà entrar en les zones de treball del laboratori el personal autoritzat
- S'utilitzarà en tot moment bates o uniformes especials per al treball en el laboratori, a més de guants protectors apropiats per tots els procediments
- Els líquids contaminats hauran de descontaminar-se (per medis químics o físics) abans d'eliminar-los per la pica
- Utilitzant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR), és important que aquesta operació estigui aïllada d'altres àrees de treball, per evitar la contaminació de les mostres i dels ambients de treball.

Un altre concepte en els laboratoris és la manipulació de deixalles. La seva manipulació i eliminació són operacions estretament regulades. En el treball quotidià, són pocs els materials contaminats que és necessari retirar o destruir. La major part de la cristalleria, els instruments i la roba de laboratori tornen a utilitzar-se o es reciclen. El principi bàsic és que tot el material ha de ser descontaminat, esterilitzat en autoclau. En el laboratori només s'ha de conservar les quantitats de substàncies químiques que siguin necessàries per a l'ús diari. Les quantitats importants han d'estar guardades en locals o edificis destinats especialment a aquesta finalitat.

Les cambres de seguretat biològica estan dissenyades per protegir el treballador, l'atmosfera del laboratori i els materials de treball de l'exposició a les esquitxades i els aerosols infecciosos

que poden generar-se. Quan s'utilitzen correctament, han demostrat ser altament eficaces per reduir les infeccions adquirides en el laboratori i la contaminació creuada.

Per últim, fer una petita menció específica al reactiu SYBR Safe utilitzat en la tinció de gels d'agarosa. Aquest reactiu s'utilitza com a substitut del bromur d'etidi com a substància que s'intercala entre les bases del DNA (agent intercalant amb capacitat mutagènica), amb l'avantatge que el SYBR Safe compleix exactament la mateixa funció que aquest i presenta menys toxicitat ja que no és tan permeable a través de les membranes biològiques.

5. CONCLUSIONS

In this work we analyzed methylation of the repetitive sequences LINE-1 in FFPE samples of primary colorectal tumors and in the associated colonic mucosa. We used a technique similar to LINE-1 MethyLight but with certain modifications, that we named LINE-1 MS-QPCR. This technique provides an estimation of the level of global methylation content, expressed as the demethylation ratio of LINE-1 sequences relative to that of the CRC cell line DLD-1 (relative demethylation ratio or RDR). The *Primers* that were previously designed in another work for this alternative technique showed great specificity for both methylated and unmethylated sequences. Therefore, they allow the quantification of these sequences by MS-QPCR with SYBR-Green. The main challenge of this project was to use FFPE samples rather than the frozen tissues previously used in the published work. The use of FFPE samples will facilitate the further exploration of the field for cancerization hypothesis by micro-dissecting well characterized normal epithelium regions at different distances from the associated tumours.

1. We have generated results on FFPE samples from five Catalan patients with 2 synchronous CRCs, demonstrating that LINE-1 MS-QPCR is applicable to this type of samples. We also generated results from frozen cases of eight American patients with a single CRC. The RDR values from these samples are noticeable higher than from FFPE samples. At this point, we cannot discern whether these differences are due to different population of origin, different preservation method or different extraction protocol.
2. The results confirmed that LINE-1 hypomethylation was higher in tumours than in normal tissue samples of colon cancer patients, both in frozen samples from Americans and in FFPE samples from Catalans. This observation is in agreement with previous published results.
3. We found a high correlation of the LINE-1 demethylation levels from independent NCM samples taken from different locations from the same individuals. This observation suggests that LINE-1 methylation level is relatively constant along the colonic tract, and might facilitate the estimation of global demethylation levels in the colon from a single colonic biopsy.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Alonso S, Alibés A, Perucho M (2015). Tècniques de diagnòstic molecular aplicades a l'estudi del càncer *Treballs de la Societat Catalana de Biologia* **66**: 53-61.
- Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran JV (2011). LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **12**: 187-215.
- Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B *et al* (2006). High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res* **16**: 383-393.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* **22**: 2990-2997.
- Ehrlich M (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* **1**: 239-259.
- Esteller M, Herman JG (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* **196**: 1-7.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**: 89-92.
- Feinberg AP, Tycko B (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**: 143-153.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H *et al* (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* **49**: 1374-1403.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M *et al* (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**: E359-386.
- Fraga MF, Esteller M (2002). DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* **33**: 632, 634, 636-649.
- Frigola J, Song J, Storzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ (2006). Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* **38**: 540-549.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW *et al* (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1827-1831.
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**: 261-282.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Hoal-van Helden EG, van Helden PD (1989). Age-related methylation changes in DNA may reflect the proliferative potential of organs. *Mutat Res* **219**: 263-266.
- Issa JP (2000). The epigenetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* **910**: 140-153; discussion 153-145.
- Jeter JM, Kohlmann W, Gruber SB (2006). Genetics of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* **20**: 269-276; discussion 285-266, 288-269.
- Jones PA, Laird PW (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* **21**: 163-167.
- Kamiyama H, Suzuki K, Maeda T, Koizumi K, Miyaki Y, Okada S *et al* (2012). DNA demethylation in normal colon tissue predicts predisposition to multiple cancers. *Oncogene* **31**: 5029-5037.

- Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-170.
- Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Hankin JH, Lyu LC (1997). Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* **57**: 4787-4794.
- Lister R, Ecker JR (2009). Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* **19**: 959-966.
- Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES *et al* (2008). A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* **100**: 1734-1738.
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* **27**: 2291-2298.
- Samadder NJ, Jasperson K, Burt RW (2015). Hereditary and common familial colorectal cancer: evidence for colorectal screening. *Dig Dis Sci* **60**: 734-747.
- Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE (1973). Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem* **248**: 4060-4064.
- Sieber OM, Heinemann K, Tomlinson IP (2003). Genomic instability--the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* **3**: 701-708.
- Singh U, Malik MA, Goswami S, Shukla S, Kaur J (2016). Epigenetic regulation of human retinoblastoma. *Tumour Biol* **37**: 14427-14441.
- Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, Perucho M (2006). Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* **9**: 199-207.
- Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E *et al* (2005). Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* **33**: 6823-6836.
- Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M (2003). Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell* **4**: 121-131.
- Yoo CB, Jones PA (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 37-50.