



UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Cambios en los niveles de acetilación de la histona H4 durante el envejecimiento

Máster en Biomedicina y Oncología molecular
Trabajo Fin de Máster

María Teresa Villoria López

Oviedo, 13 de junio de 2014

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
NAD ⁺	Cofactor nicotinamida adenina dinucleótido
HATs	Acetiltransferasas de histonas
HDACs	Desacetilasas de histonas
DNMTs	ADN metiltransferasas
DSBs	Roturas de doble hélice
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PBS	Tampón fosfato salino
DTT	Ditiotreitol
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPCE	Electroforesis capilar de alta resolución
Sir2	Silent information regulator 2
Sas2	Something about silencing protein 2
Sirt(1-7)	Silent information regulator 2, homologs
H4K16	Lisina 16 de la histona H4
H4K16ac	Acetilación de la lisina 16 de la histona H4

Resumen

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida de funciones corporales acompañada por una degeneración general de células y tejidos, y se debe fundamentalmente a una disminución del potencial de las células madre adultas para mantener la homeostasis tisular. El genotipo determina la gran variación en la esperanza de vida entre diferentes especies, mientras que la variación entre individuos dentro de una misma especie está afectada, además, por la acumulación de errores moleculares a lo largo del tiempo. Esas alteraciones moleculares pueden ocurrir tanto a nivel genético como epigenético, y dependen del genotipo (factores intrínsecos), de la interacción con el medio (factores extrínsecos) y del azar.

Existen diferentes estudios que asocian la longevidad de los organismos con cambios en el estado de condensación de la cromatina, regulado por factores epigenéticos. Con la edad se producen cambios epigenéticos como el descenso en la metilación global del ADN y la hipermetilación en loci específicos, junto a alteraciones en las modificaciones post-traduccionales de las histonas, entre otros. Así, es posible que la regulación de la acetilación de histonas ocupe un lugar importante en las rutas de envejecimiento en eucariotas.

La mayoría de los estudios que relacionan la estructura de la cromatina con el desarrollo ontogénico han sido realizados en levaduras, y han permitido correlacionar el envejecimiento con una pérdida de la heterocromatina telomérica. En concreto, en *Saccharomyces cerevisiae* los niveles de acetilación de H4K16 aumentan con el tiempo, incremento que se acompaña de un descenso en los niveles de Sir2; esto se asocia con un menor silenciamiento en esos loci, que llevaría a la pérdida de función característica del envejecimiento. Sin embargo, la participación de la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 en el envejecimiento en humanos aún no está clara. En este trabajo analizamos los niveles de acetilación de la histona H4 en células sanguíneas procedentes de individuos de distintas edades para tratar de identificar cambios durante el envejecimiento.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	10
3. Material y métodos	11
3.1. Purificación de linfocitos y neutrófilos a partir de las muestras de sangre periférica.....	11
3.2. Extracción ácida de histonas.....	12
3.3. Separación de fracciones de histonas por HPLC.....	13
3.4. Análisis por HPCE	13
3.5. Estadística.....	14
4. Bibliografía.....	15

1. Introducción

La epigenética se define como el estudio de los cambios heredables a nivel genético que no implican un cambio en la secuencia de bases del ADN pero sí pueden afectar a la expresión génica (Ghavifekr Fakhr et al. 2013, Halley-Stott and Gurdon 2013). El epigenoma es muy dinámico, y puede variar entre diferentes tipos celulares y distintos estados de desarrollo dentro de un mismo organismo (Bernstein et al. 2007, Park et al. 2011). Además, hay numerosas evidencias de cambios en los patrones epigenéticos relacionados con diversas enfermedades genéticas y varios tipos de cáncer (Feinberg and Tycko 2004).

El empaquetamiento de los aproximadamente dos metros que mide la molécula de ADN genómico humano en un núcleo de apenas unas micras de tamaño requiere un alto grado de compactación que, por otra parte, permita que la información codificada en el ADN permanezca fácilmente accesible. Dicho empaquetamiento es mediado por la unión del ADN a proteínas, que da lugar a la estructura denominada cromatina. Los diferentes mecanismos epigenéticos funcionan de manera coordinada y regulan el grado de empaquetamiento de esta (Rodríguez-Paredes and Esteller 2011). En general, una mayor condensación de la cromatina está asociada a la represión génica, mientras que una menor condensación permitiría un mejor acceso de la maquinaria de transcripción y, por tanto, facilitaría la expresión de los genes (Kornberg and Lorch 1999, Li and Reinberg 2011).

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, formado por 147 pares de bases de ADN enrolladas 1,7 veces alrededor de un octámero de histonas. Este octámero de histonas está constituido por un heterotetrámero central de histonas H3 y H4 flanqueado por dos heterodímeros de histonas H2A y H2B. Estas proteínas son mayoritariamente globulares, exceptuando la región N-terminal o "cola", que sobresale de la estructura del nucleosoma y que posee un gran número de residuos susceptibles de modificaciones post-traduccionales, entre ellas acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación o sumoilación (Kornberg and Lorch 1999, Kouzarides 2007, Li and Reinberg 2011). La organización en nucleosomas da lugar a la fibra de 11nm, que constituye el primer nivel de organización de la cromatina; la interacción de la histona H1 con el ADN de unión entre los nucleosomas permite la formación de una fibra de

cromatina más condensada, de 30nm de diámetro, que compone el segundo nivel estructural de organización del ADN. La longitud del ADN de unión que separa los nucleosomas varía entre diferentes células y distintos loci; una secuencia de unión más larga da lugar a una estructura de cromatina más abierta (Grigoryev 2012, Li and Reinberg 2011).

Se han identificado enzimas implicadas en la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación, deiminación e isomerización de prolinas de distintos residuos de las regiones N-terminal de las histonas. La mayoría de las modificaciones son dinámicas, existiendo enzimas encargadas de añadir la modificación y enzimas con la función de retirarla; en el caso de la acetilación de histonas existen acetiltransferasas de histonas (HATs), que catalizan la incorporación de esta modificación a residuos de lisina y/o arginina, y desacetilasas de histonas (HDACs), que la retiran (Kouzarides 2007, Schoppee Bortz and Wamhoff 2011).

El conjunto de modificaciones post-traduccionales determina el grado de compactación de la cromatina, del que depende la accesibilidad para la transcripción, replicación y reparación de la molécula de ADN. En este sentido, es especialmente compleja la regulación de la expresión génica, debido a que los distintos residuos susceptibles de modificación de las colas de estas proteínas pueden aceptar una gran variedad de grupos funcionales, incluso varios de ellos a la vez. Cada una de estas modificaciones constituye una marca de activación o represión de la expresión, en función del tipo de histona y del aminoácido dentro de la misma sobre la que se encuentre (Ghavifekr Fakhr et al. 2013, Kouzarides 2007, Li and Reinberg 2011, Wood and Helfand 2013). Así, mientras la acetilación y fosforilación comúnmente se asocian a activación, y la sumoilación, deiminación e isomerización de prolinas se relacionan con represión, existen también modificaciones químicas, como la metilación y ubiquitinación, que pueden tener un efecto u otro bajo diferentes condiciones. Por ejemplo, la metilación de H3K36 tiene un efecto positivo si se encuentra en la región codificante, y un efecto negativo cuando aparece en el promotor (Kouzarides 2007). La combinación de todas las modificaciones químicas, los residuos sobre los que ocurren y las consecuencias funcionales sobre la regulación génica constituye el denominado código de las histonas, que participa en la regulación de numerosas funciones de la

cromatina como su grado de compactación, la estabilidad genómica o la regulación de la expresión génica (Turner 2002).

Junto a las modificaciones post-traduccionales de las histonas, una de las marcas epigenéticas mejor estudiadas es la metilación del ADN. Esta modificación covalente consiste en la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina al carbono 5 del anillo de una citosina. Dicha reacción es llevada a cabo por las ADN metiltransferasas: DNMT3a y DNMT3b llevan a cabo una metilación *de novo*, mientras que DNMT1 mantiene el patrón de metilación durante la replicación (Choi and Lee 2013, Ghavifekr Fakhr et al. 2013, Zaidi et al. 2013).

La metilación del ADN en mamíferos sucede en su mayoría en citosinas que preceden a guaninas (dinucleótidos CpG), que pueden encontrarse solos o, como ocurre más frecuentemente, agrupados en lo que se denominan islas CpG. La metilación de las islas CpG situadas en las regiones promotoras de los genes se asocia con un estado cerrado de la cromatina, que deriva en el silenciamiento génico. De este modo, esta modificación epigenética es un importante mecanismo de regulación de la actividad transcripcional (Choi and Lee 2013, Ghavifekr Fakhr et al. 2013).

Por otra parte, la metilación del ADN también puede ocurrir en sitios CpG localizados en regiones intergénicas y en el cuerpo de los genes, así como en secuencias de ADN repetitivo. En este caso, se cree que la metilación del ADN tiene como función mantener la estabilidad genómica. Además, la metilación del ADN desempeña un papel clave en procesos como inactivación del cromosoma X, impronta genética, desarrollo embrionario, silenciamiento de elementos repetitivos, diferenciación y mantenimiento de la pluripotencia (Choi and Lee 2013, Feinberg et al. 2002, Payer and Lee 2008).

Proteínas no histonas también pueden afectar a la configuración de la cromatina a través de su interacción con el ADN. Por ejemplo, los complejos dependientes de ATP que reorganizan la estructura de la cromatina pueden mover y recolocar los nucleosomas a lo largo de la molécula de ADN. Otros complejos de proteínas que se pueden considerar como reguladores epigenéticos son los grupos Polycomb y Trithorax, proteínas que se unen al ADN o histonas modificadas y catalizan cambios en estas proteínas o en la metilación del ADN; por ejemplo, el complejo Polycomb impide la metilación de histonas interactuando con las DNMTs.

Así, la epigenética, cuyos pilares fundamentales son las modificaciones post-traduccionales de las histonas y la metilación del ADN, juega un papel fundamental en la regulación de numerosos procesos celulares, determinando la forma en que el genoma se manifiesta en las distintas etapas del desarrollo, tipos de tejido o grado de una enfermedad (Bernstein et al. 2007). Los diferentes mecanismos epigenéticos interaccionan entre sí y se regulan mutuamente para controlar la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a los genes, regulando la actividad y función de los mismos. Fallos en el mantenimiento de las modificaciones epigenéticas puede resultar en desajustes de importantes vías de regulación y conducir a diferentes patologías como el cáncer.

Las alteraciones epigenéticas, que dan lugar a variaciones fenotípicas heredables causadas por cambios en la estructura de la cromatina independiente de modificaciones en la secuencia de ADN, pueden inducir cambios en la expresión génica que contribuyen a la iniciación y progresión tumoral. Es frecuente encontrar en muchos tipos de cáncer hipometilación global en regiones repetitivas, dando lugar a una inestabilidad genómica, y también en regiones promotoras de algunos oncogenes, como por ejemplo *PAX2* o *Let-7^a-3* (Brueckner et al. 2007, Wu et al. 2005), provocando su sobreexpresión. Además, durante el desarrollo tumoral se produce una hipermetilación específica de promotores de genes supresores de tumores, que resulta en su inactivación. Por tanto, las células tumorales utilizan la metilación del ADN para modificar la expresión de genes involucrados en rutas reguladoras y promover con ello la carcinogénesis (Choi and Lee 2013, Park et al. 2011, Zaidi et al. 2013). En cáncer también se encuentran frecuentemente patrones aberrantes de las modificaciones post-traduccionales de histonas; por ejemplo, las células tumorales a menudo sufren pérdidas de acetilación de las histonas H3 y H4, pérdida de la trimetilación de H3K4, y ganancia de metilación en H3K9 y de trimetilación en H3K27. La presencia de las formas hipoacetiladas e hipermetiladas de H3 y H4 se asocia con el silenciamiento de genes con funciones supresoras de tumores, como p21^{WAF1} (Esteller 2008). En relación a esto, ya existen varios fármacos inhibidores de la metilación del ADN y la desacetilación de histonas en ensayos clínicos, aunque su potencial terapéutico está limitado por su especificidad, selectividad y plasticidad, y su efectividad terapéutica depende de su combinación con otros fármacos (Zaidi et al. 2013).

Dentro de los mecanismos epigenéticos reguladores podemos mencionar también los microRNAs (miRNAs), que constituyen un tipo de ARNs pequeños no codificantes que realizan funciones epigenéticas en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, al promover la degradación del ARNm; algunos de ellos son supresores de tumores, de modo que su alteración promueve la expresión de oncogenes y, con ello, el desarrollo del tumor (Choi and Lee 2013).

La alteración de patrones epigenéticos característica del cáncer y otras enfermedades constituye también un rasgo del envejecimiento. Se entiende por envejecimiento la pérdida de funciones corporales acompañada por una degeneración general de células y tejidos, y se debe fundamentalmente a una disminución del potencial de las células madre adultas para mantener la homeostasis tisular. El genotipo determina la gran variación en la esperanza de vida entre diferentes especies, mientras que la variación entre individuos dentro de una misma especie está afectada, además, por la acumulación de errores moleculares a lo largo del tiempo. Esas alteraciones moleculares pueden ocurrir tanto a nivel genético como epigenético, y dependen del genotipo (factores intrínsecos), de la interacción con el medio (factores extrínsecos) y del azar (Burgess et al. 2012, Fraga 2009).

Dentro de dichas alteraciones moleculares, las marcas más importantes del proceso de envejecimiento son los daños en el ADN, defectos en la cromatina y cambios en los programas de expresión génica, todas ellas relacionadas entre sí: los daños en el ADN pueden promover una reorganización global de la cromatina, así como afectar a la integridad del transcriptoma alterando los patrones de expresión de los genes (Burgess et al. 2012).

Existen diferentes estudios que asocian cambios en el estado de condensación de la cromatina con la longevidad de los organismos (Oberdoerffer and Sinclair 2007). Los cambios epigenéticos mejor descritos que ocurren con la edad son el descenso en la metilación global del ADN y la hipermetilación en loci específicos, alteraciones que casualmente también ocurren en cáncer. Esto sugiere que la acumulación de alteraciones epigenéticas durante el envejecimiento podría contribuir a la transformación maligna de las células (Fraga 2009, Johnson et al. 2012).

Los cambios en la metilación del ADN que aparecen en envejecimiento van acompañados de cambios en otros mecanismos reguladores epigenéticos, que también

controlan la expresión génica y la estructura de la cromatina. Así, con el tiempo van apareciendo alteraciones en las modificaciones post-traduccionales de las histonas o en enzimas como ADN metiltransferasas, histona desacetilasas o histona metiltransferasas (Burgess et al. 2012, Han and Brunet 2012).

La mayoría de esos estudios que relacionan la estructura de la cromatina con envejecimiento han sido realizados en levaduras, evaluando la esperanza de vida replicativa o número de células hijas que puede generar cada célula madre antes de entrar en senescencia. Estos experimentos han permitido correlacionar el envejecimiento con una pérdida de la heterocromatina de los telómeros, pérdida que se supone tiene efectos deletéreos en la homeostasis celular, causando por ejemplo una expresión aberrante de genes que normalmente se encuentran reprimidos (Wood and Helfand 2013).

El envejecimiento en levaduras se ha analizado atendiendo a los cambios en la estructura y las modificaciones post-traduccionales de las histonas en función de la edad. En concreto, un estudio revela que los niveles de acetilación de H4K16 aumentan con el tiempo, incremento que se acompaña de un descenso en los niveles de Sir2. Esta desacetilasa retira la acetilación de la lisina 16 de la histona H4, mientras que la acetilasa Sas2 antagoniza ese efecto; de este modo, Sir2 y Sas2 generan un gradiente de H4K16ac que marca el límite de cromatina silenciada en los telómeros. En células jóvenes Sir2 mantiene una baja acetilación de H4K16 en los telómeros y regiones subteloméricas, colaborando con Sas2 para establecer un límite de silenciamiento, mientras que en células adultas la pérdida de Sir2 y acción de Sas2 da lugar a un incremento de H4K16ac en regiones subteloméricas. El aumento en la acetilación de H4K16 en ciertas regiones heterocromáticas se relaciona con un menor silenciamiento en esos loci, que llevaría a la pérdida de función característica del envejecimiento. Esto podría indicar que el envejecimiento resulta, al menos en parte, de la incapacidad para mantener una estructura adecuada de la cromatina con el tiempo (Dang et al. 2009).

La ruta descrita constituye uno de los mecanismos de regulación de la esperanza de vida replicativa en levaduras que lleva a cabo Sir2, miembro fundador de la familia de las sirtuinas. Estas proteínas forman un grupo de desacetilasas NAD⁺-dependientes o ADP-ribosilasas que promueven longevidad en diversos organismos, estableciendo la estructura de la heterocromatina silenciada en los telómeros, al prevenir la de-represión

génica y la recombinación aberrante de secuencias repetitivas. En mamíferos existen siete sirtuinas, tres de ellas (Sirt1, Sirt2 y Sirt3) capaces de desacetilar H4K16; una disminución de su actividad o sus niveles podría promocionar el envejecimiento celular a través del incremento de H4K16ac. Además, Sirt1, ortólogo en mamíferos de Sir2, desacetila proteínas reparadoras en sitios en los que hay daño en el ADN, promoviendo la reparación. Su traslado a los sitios con daño en el ADN implica una disminución de sus niveles en otras regiones del genoma, lo que deriva en una de-represión de los genes regulados por esta sirtuina. Esto constituye un cambio transcripcional característico del proceso de envejecimiento (Burgess et al. 2012, Dang et al. 2009).

La acetilación de la lisina 16 de la histona H4 también ha sido estudiada en otros procesos, por ejemplo en cáncer. Concretamente, la pérdida de acetilación de la lisina 16 y de trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 constituye una marca común de procesos tumorales. (Fraga et al. 2005).

En un estudio reciente se ha demostrado que la acetilación de H4K16 representa además un punto importante en autofagia, proceso catabólico conservado evolutivamente implicado tanto en aspectos fisiológicos como patológicos. La célula sufre una serie de cambios para adaptarse a alguna condición desfavorable; estos cambios pueden tener un resultado beneficioso y permitir la supervivencia de la célula, o bien pueden no ser suficientes y derivar en la muerte celular. Este estudio revela que la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 participa en esa decisión de supervivencia o muerte. Concretamente, la reducción de H4K16ac, derivada de una regulación a la baja de la acetiltransferasa hMOF, es necesaria para una progresión correcta del proceso de autofagia hacia la supervivencia de la célula, mientras que el incremento de los niveles de acetilación de H4K16 resulta en la muerte celular (Fullgrabe et al. 2013).

Esta modificación post-traduccional de la histona H4 también ha sido estudiada en relación a la maduración del oocito. Durante este proceso, H4K16 sufre una desacetilación, de la que es responsable fundamentalmente HDAC2. La falta de esta enzima y, en consecuencia, el aumento de H4K16ac, supone que los cromosomas no se condensan adecuadamente, no se alinean en la placa metafásica y la segregación no sea correcta, debido a que los cinetocoros no pueden interactuar con los microtúbulos. Por tanto, la desacetilación de H4K16 es fundamental para una segregación cromosómica apropiada. En los cambios que ocurren en la cromatina y la expresión

génica durante el desarrollo del oocito intervienen otras histonas desacetilasas, y otros residuos de lisina deben ser desacetilados (H4K8, H4K12, H3K14). Con la edad la desacetilación de histonas podría verse comprometida, dificultando la segregación cromosómica durante la maduración del oocito, lo que podría explicar el incremento de aneuploidías que aparece con el aumento de la edad materna. En resumen, los resultados del estudio apoyan que la desacetilación de histonas que tiene lugar durante la maduración del oocito es esencial para una segregación cromosómica correcta (Ma and Schultz 2013).

Por otra parte, la desacetilación de la histona H4 facilita la señalización de daño en el ADN. El reclutamiento de proteínas como 53BP1, MDC1 y BRCA1 en las roturas de doble hebra (DSBs) es necesaria para la reparación de daños en el ADN mediante unión de extremos no homólogos (nonhomologous end joining, NHEJ). La acumulación de 53BP1 en DSBs depende de la interacción específica de su dominio Tudor con la lisina 20 dimetilada de la histona H4. Existen evidencias de que la acetilación de H4K16 suprime la unión de 53BP1 a H4K20me2 en ausencia de daños en el ADN, y que DSBs inducen una desacetilación de H4K16 transitoria y localizada que facilita la acumulación focal de 53BP1 (Hsiao and Mizzen 2013).

La acetilación de H4K16 también ha sido estudiada en los mecanismos de compensación de dosis génica. En muchos organismos, los machos poseen un cromosoma X y un cromosoma Y (derivados de un par de autosomas por una degeneración progresiva del Y), mientras que las hembras poseen dos cromosomas X. Los mecanismos de compensación de dosis génica buscan restaurar una expresión balanceada entre sexos, así como entre los genes ligados al cromosoma X y los pares autosómicos. En *Drosophila*, *C. elegans*, e incluso en mamíferos, se produce una sobre regulación de los genes ligados al cromosoma X para compensar la expresión bialélica autosómica. En modelos murinos, esa sobre regulación resulta del incremento en la vida media de los transcritos de genes ligados al cromosoma X y en los niveles de ARN polimerasa II fosforilada en la serina 5 (PolIII-S5p) en los extremos 5' de estos genes frente a genes autosómicos; así mismo, la sobre regulación también es consecuencia del aumento de H4K16ac y la acetiltransferasa MOF en las regiones promotoras de genes ligados al cromosoma X. Todos estos acrecentamientos potencian la activación de la transcripción de esos genes (Deng et al. 2013, Payer and Lee 2008).

Por tanto, existen múltiples estudios de la marca H4K16 en cáncer, diferenciación y otros procesos celulares, mientras que su relevancia en envejecimiento aún está poco estudiada. Los experimentos principales son los realizados en levaduras, en los que se ha encontrado un incremento en la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 con el tiempo, aumento que se supone compromete el silenciamiento de la cromatina en los telómeros. Parece claro que la longevidad de los organismos podría estar asociada al estado de condensación de la cromatina, regulado por factores epigenéticos; por ello, es posible que la regulación de la acetilación de histonas ocupe un lugar importante en las rutas de envejecimiento en eucariotas.

Este trabajo pretende establecer la implicación de H4K16ac en el proceso de envejecimiento, analizando para ello dicha modificación post-traducciona l en células sanguíneas procedentes de individuos de distintos grupos de edad. El estudio, que se encuadra dentro de un proyecto global de la Unidad de Epigenética del Cáncer del IUOPA que trata de determinar la importancia de los patrones de acetilación de histonas en el envejecimiento, busca determinar la fracción de H4K16ac en neutrófilos procedentes de ancianos, adultos y niños. La hipótesis de partida es que la H4K16ac aumenta con el tiempo, y no es una característica intrínseca de este tipo celular. La posible diferencia en dicha modificación post-traducciona l en sujetos de distinta edad permitirá establecer qué participación ejerce H4K16ac en el envejecimiento de los individuos.

2. Objetivos

- Estudio de la acetilación de H4K16 en neutrófilos procedentes de individuos de distintos grupos de edad.
- Comparación de los patrones de acetilación de H4K16 entre dos linajes sanguíneos diferentes (mieloide y linfoide).

3. Materiales y métodos

El estudio fue realizado a partir de muestras de sangre periférica en EDTA de tres grupos de edad: niños (menores de 18 años), adultos (entre 18 y 65 años) y ancianos (mayores de 65). Dichas muestras fueron obtenidas de voluntarios sanos del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Todas ellas se recogieron con el consentimiento de los pacientes y del Comité de Ética del hospital, de acuerdo a la Declaración Universal de los Derechos Humanos, a las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos, WHO-CIOMS/1992 y a la Ley 41/2002 del 14 de Noviembre.

3.1. Purificación de linfocitos y neutrófilos a partir de las muestras de sangre periférica

Los linfocitos y neutrófilos fueron aislados de las muestras de sangre mediante separación en gradiente de Ficoll, compuesto con una densidad intermedia entre las células mononucleares sanguíneas y las células polimorfonucleares y eritrocitos, que permite la segregación de ambos componentes en diferentes fases, facilitando su aislamiento. De este modo, cada muestra de sangre fue depositada gota a gota sobre Ficoll (Hystopaque 1077) a temperatura ambiente, utilizando 1 mL de esta solución por mL de sangre original. A continuación, se centrifugó durante 30 minutos a 400 $\times g$ sin freno ni acelerador, centrifugación que permitió la dispersión de los componentes sanguíneos en distintas fases en función de su densidad, quedando el plasma en la parte superior, posteriormente el anillo de células mononucleares, seguido del Ficoll y, finalmente, las células polimorfonucleares y los eritrocitos quedan en la fase inferior.

El anillo de células mononucleares fue lavado añadiendo 6 mL de PBS y centrifugando durante 10 minutos a 250 $\times g$ con freno y acelerador suaves. Tras la repetición del lavado, se resuspendió el pellet en PBS (400 μL de PBS por cada mL de sangre original), obteniéndose por centrifugación los pellets de linfocitos purificados. De la suspensión en PBS se separó previamente el volumen adecuado para la determinación de la pureza por citometría de flujo; solo se tuvieron en cuenta las muestras con una pureza de linfocitos superior al 60% para continuar con el procedimiento.

Con el objetivo de lisar los eritrocitos y purificar las células polimorfonucleares, la fase inferior de la separación en gradiente fue tratada con *buffer* RBC (BioLegend) 1X en agua Braun (10 mL de *buffer* 1X por cada mL de sangre original). Las suspensiones de células y *buffer* se incubaron a 4°C durante 10 minutos, protegidas de la luz. A continuación, se centrifugaron 5 minutos a 350 *xg* y se descartó el sobrenadante. A cada muestra se añadieron 2 mL de *buffer* 1X, incubando en las mismas condiciones. Tras la incubación, el *buffer* de lisis fue inactivado con 6 mL de PBS. Se centrifugó de nuevo 5 minutos a 350 *xg*, se retiró el sobrenadante y las células polimorfonucleares se lavaron añadiendo 6 mL de PBS y centrifugando en las mismas condiciones. Después de la repetición del lavado, se resuspendió el *pellet* en PBS (400 μ L de PBS por cada mL de sangre original), obteniéndose por centrifugación los *pellets* de neutrófilos purificados. De la suspensión en PBS se separó previamente el volumen adecuado para la determinación de la pureza por citometría de flujo; únicamente se contemplaron las muestras con una pureza de las células superior al 60% para el siguiente paso.

3.2. Extracción ácida de histonas

En las muestras de linfocitos y neutrófilos con una pureza adecuada se llevó a cabo una extracción ácida de histonas. Para ello, se resuspendió cada *pellet* de células en 50 μ L de ácido sulfúrico 0,4 M. Después se añadieron 200 μ L de ácido sulfúrico 0,2 M con un 1% de β -mercaptoetanol y las muestras así preparadas se pusieron a rotar a 4°C durante 1 h. A continuación, fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4°C y 12.000 rpm, y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El *pellet* se resuspendió en 125 μ L de ácido sulfúrico 0,2 M con un 1% de β -mercaptoetanol, repitiendo la rotación a 4°C durante 1 h y la centrifugación en las mismas condiciones que anteriormente. El sobrenadante de cada muestra se mezcló con el anterior y se separó el contenido de cada tubo en dos partes. A cada duplicado se le añadieron 8 volúmenes de acetona fría, y los tubos se incubaron durante 30 minutos con inversión ocasional. Durante todo este proceso de extracción, las muestras fueron mantenidas en hielo. Tras la incubación, los tubos fueron centrifugados en las mismas condiciones anteriores, descartando posteriormente el sobrenadante. Los sedimentos se secaron al aire, permitiendo la evaporación de la acetona residual, y se reconstituyeron en un *buffer* Tris pH=6.8 50

μM con DTT $5 \mu\text{M}$. Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, los sobrenadantes fueron transferidos a tubos limpios, uniendo las dos alícuotas que habían sido separadas previamente para cada muestra, y almacenándolos para su conservación a -80°C .

3.3. Separación de fracciones de histonas por HPLC

Las histonas individuales se purificaron mediante HPLC en fase reversa (*Agilent Technologies ChemStation*) en base a su diferente movilidad electroforética. Para ello se empleó una columna Jupiter C18 (*Phenomenex, Inc.*) eluida con un gradiente de acetonitrilo (20%-80%) en ácido trifluoroacético 0,3%. Se monitorizó la absorbancia del eluido a 210 nm y se obtuvieron fracciones enriquecidas en cada histona individual, por orden de elución: H2B, H2A.2 (variante menos hidrofóbica) + H4, H2A.1 (variante más hidrofóbica) y finalmente H3. La histona de interés para el estudio, H4, coeluye con la variante H2A.1 en la fracción correspondiente.

La naturaleza volátil del soluto agua/acetonitrilo/trifluoroacético permitió la recuperación de las histonas aisladas en cada fracción mediante su liofilización en un equipo *LyoQuest (Telstar)*. Las histonas se disolvieron finalmente en $10 \mu\text{L}$ de DTT $0,01 \text{ M}$ para evitar su oxidación.

3.4. Análisis por electroforesis capilar de alta resolución (HPCE)

Se analizaron las modificaciones post-traduccionales de la histona H4 mediante HPCE en un sistema de electroforesis *P/ACE MQD (Beckman Coulter)* utilizando el Software *Beckman Coulter 32 Karat*. Esta técnica permite la separación de los derivados modificados de las histonas basándose en su diferente capacidad de migración en presencia de un campo eléctrico y su detección mediante la medida de la absorbancia a 214 nm. Se obtiene así un electroferograma en el que el primer pico de absorbancia registrado corresponde a la migración de las histonas H4 no acetiladas, el segundo a las monoacetiladas (H4K16ac) y el tercero a las diacetiladas (H4K16ac y H4K12ac). El

porcentaje de acetilación de H4 en cada caso fue calculado en base al área bajo la curva correspondiente a cada modificación respecto al área total.

3.5. Estadística

Los datos de acetilación recogidos fueron analizados realizando un ajuste de modelos lineales del sexo y grupo de edad en el entorno estadístico de R.

4. Bibliografia

- Bernstein, B. E., A. Meissner, and E. S. Lander. 2007. The mammalian epigenome. *Cell* 128: 669-81.
- Brueckner, B., C. Stresemann, R. Kuner, C. Mund, T. Musch, M. Meister, H. Sultmann, and F. Lyko. 2007. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res* 67: 1419-23.
- Burgess, R. C., T. Misteli, and P. Oberdoerffer. 2012. DNA damage, chromatin, and transcription: the trinity of aging. *Curr Opin Cell Biol* 24: 724-30.
- Choi, J. D., and J. S. Lee. 2013. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform* 11: 164-173.
- Contrepois, K., J. Y. Thuret, R. Courbeyrette, F. Fenaille, and C. Mann. 2012. Deacetylation of H4-K16Ac and heterochromatin assembly in senescence. *Epigenetics Chromatin* 5: 15.
- Cosentino, C., and R. Mostoslavsky. 2013. Metabolism, longevity and epigenetics. *Cell Mol Life Sci* 70: 1525-41.
- Dang, W., K. K. Steffen, R. Perry, J. A. Dorsey, F. B. Johnson, A. Shilatifard, M. Kaeberlein, B. K. Kennedy, and S. L. Berger. 2009. Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* 459: 802-7.
- Deng, X., J. B. Berletch, W. Ma, D. K. Nguyen, J. B. Hiatt, W. S. Noble, J. Shendure, and C. M. Disteché. 2013. Mammalian X upregulation is associated with enhanced transcription initiation, RNA half-life, and MOF-mediated H4K16 acetylation. *Dev Cell* 25: 55-68.
- Esteller, M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358: 1148-59.
- Feinberg, A. P., M. Oshimura, and J. C. Barrett. 2002. Epigenetic mechanisms in human disease. *Cancer Res* 62: 6784-7.
- Feinberg, A. P., and B. Tycko. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4: 143-53.
- Fraga, M. F. 2009. Genetic and epigenetic regulation of aging. *Curr Opin Immunol* 21: 446-53.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N. G. Iyer, A. Perez-Rosado, E. Calvo, J. A. Lopez, A. Cano, M. J. Calasanz, D. Colomer, M. A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein, and M. Esteller. 2005. Loss of acetylation at

- Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37: 391-400.
- Fullgrabe, J., M. A. Lynch-Day, N. Heldring, W. Li, R. B. Struijk, Q. Ma, O. Hermanson, M. G. Rosenfeld, D. J. Klionsky, and B. Joseph. 2013. The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. *Nature* 500: 468-71.
- Ghavifekr Fakhr, M., M. Farshdousti Hagh, D. Shanebandi, and B. Baradaran. 2013. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. *Genet Res Int* 2013: 317569.
- Glant, T. T., K. Mikecz, and T. A. Rauch. 2014. Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *BMC Med* 12: 35.
- Grigoryev, S. A. 2012. Nucleosome spacing and chromatin higher-order folding. *Nucleus* 3: 493-9.
- Halley-Stott, R. P., and J. B. Gurdon. 2013. Epigenetic memory in the context of nuclear reprogramming and cancer. *Brief Funct Genomics* 12: 164-73.
- Han, S., and A. Brunet. 2012. Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol* 22: 42-9.
- Hsiao, K. Y., and C. A. Mizzen. 2013. Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *J Mol Cell Biol* 5: 157-65.
- Huen, K., P. Yousefi, A. Bradman, L. Yan, K. G. Harley, K. Kogut, B. Eskenazi, and N. Holland. 2014. Effects of age, sex, and persistent organic pollutants on DNA methylation in children. *Environ Mol Mutagen* 55: 209-22.
- Johnson, A. A., K. Akman, S. R. Calimport, D. Wuttke, A. Stolzing, and J. P. de Magalhaes. 2012. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res* 15: 483-94.
- Kornberg, R. D., and Y. Lorch. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98: 285-94.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705.
- Li, G., and D. Reinberg. 2011. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 21: 175-86.
- Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194-217.

- Ma, P., and R. M. Schultz. 2013. Histone deacetylase 2 (HDAC2) regulates chromosome segregation and kinetochore function via H4K16 deacetylation during oocyte maturation in mouse. *PLoS Genet* 9: e1003377.
- Mahajan, V. S., I. B. Leskov, and J. Z. Chen. 2005. Homeostasis of T cell diversity. *Cell Mol Immunol* 2: 1-10.
- Marks, P., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller, and W. K. Kelly. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 1: 194-202.
- Merksamer, P. I., Y. Liu, W. He, M. D. Hirschey, D. Chen, and E. Verdin. 2013. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging (Albany NY)* 5: 144-50.
- Newgard, C. B., and N. E. Sharpless. 2013. Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 123: 946-50.
- Oberdoerffer, P., and D. A. Sinclair. 2007. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 692-702.
- Park, Y. J., R. Claus, D. Weichenhan, and C. Plass. 2011. Genome-wide epigenetic modifications in cancer. *Prog Drug Res* 67: 25-49.
- Payer, B., and J. T. Lee. 2008. X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annu Rev Genet* 42: 733-72.
- Rodriguez-Paredes, M., and M. Esteller. 2011. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 17: 330-9.
- Schoppee Bortz, P. D., and B. R. Wamhoff. 2011. Chromatin immunoprecipitation (ChIP): revisiting the efficacy of sample preparation, sonication, quantification of sheared DNA, and analysis via PCR. *PLoS One* 6: e26015.
- Singer, H., M. Walier, N. Nusgen, C. Meesters, F. Schreiner, J. Woelfle, R. Fimmers, T. Wienker, V. M. Kalscheuer, T. Becker, R. Schwaab, J. Oldenburg, and O. El-Maarri. 2012. Methylation of L1Hs promoters is lower on the inactive X, has a tendency of being higher on autosomes in smaller genomes and shows inter-individual variability at some loci. *Hum Mol Genet* 21: 219-35.
- Turner, B. M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-91.
- Wood, J. G., and S. L. Helfand. 2013. Chromatin structure and transposable elements in organismal aging. *Front Genet* 4: 274.

- Wu, H., Y. Chen, J. Liang, B. Shi, G. Wu, Y. Zhang, D. Wang, R. Li, X. Yi, H. Zhang, L. Sun, and Y. Shang. 2005. Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature* 438: 981-7.
- Zaidi, S. K., A. J. Van Wijnen, J. B. Lian, J. L. Stein, and G. S. Stein. 2013. Targeting deregulated epigenetic control in cancer. *J Cell Physiol* 228: 2103-8.