

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BE, BP, CTP-AIRE, DEBEQ, FI, FI-ICIP, INEFC i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:

- 1.- Dades bàsiques i resums
- 2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria

BP

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BDH	Beques i ajuts postdoctorals del Programa DGR-Henkel KGaA
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
DEBEQ (Modalitat A3)	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
FI-ICIP	Beques i ajuts per a l'etapa de formació i de recerca de personal investigador novell en els àmbits d'interès de l'Institut Català Internacional per la Pau
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.

Estudi del paper de la JMJD3 en la progressió tumoral induïda per TGFβ

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom Cognoms
Anna Cascante Cirera

Correu electrònic
annacascante@gmail.com

Dades del centre d'origen

Fundació Privada Institut d'Investigació Oncològica Vall d'Hebron- VHIO

Número d'expedient

2009BP-B 00199

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.

regulació epigenètica

demetylació d'histones

JMJD3

transició epitelio-mesenquila (EMT)

TGFβ

Data de presentació de la justificació

30/09/2011





Nom i cognoms i signatura
del/de la investigador/a

ANNA CASCANTE CIRERA

Vist i plau del/de la responsable de la
sol·licitud

JOAN SEOANE



Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

La demetilasa d'histones JMJD3 (Jumonji domain containing protein 3), és un enzim capaç de demetilar específicament la lisina 27 a la histona 3 (H3K27), eliminant així una marca epigenètica relacionada amb la repressió transcripcional (Xiang et al 2007, Hong et al 2007). Recentment s'ha descrit que està implicada en el manteniment de la pluripotència de les cèl·lules mare embrionàries (ESCs) (Lu et al 2010). A més, també s'ha demostrat el seu paper en la regulació de processos fisiològics d'inflamació (De Santa et al Cell 2007), de reprogramació epigenètica (Shaw et al 2009, De Santa et al 2009) i de diferenciació (Sen et al 2008, Jepsen et al 2007), així com en la progressió del càncer de colon (Pereira et al 2011).

En aquesta línia, resultats previs del grup han demostrat que l'expressió de JMJD3 està regulada per TGF β , en línies cel.lulars derivades de glioma (Bruna et al 2007).

Tenint en compte aquests antecedents, l'objectiu principal d'aquest projecte ha estat estudiar el paper de la JMJD3 en la regulació epigenètica de la progressió tumoral induïda per TGF β .

Els nostres resultats demostren que l'expressió de JMJD3 en cèl.lules A549, derivades d'un adenocarcinoma de pulmó, es veu fortament induïda després d'un tractament amb TGF β . Aquest augment es produeix ràpidament i es manté almenys 48 hores, temps en el que té lloc la transició epiteli-mesenquimal (EMT). Per tal d'estudiar el paper de la JMJD3 en aquest procés de transdiferenciació, vam generar línies cel.lulars estables mitjançant la infecció amb vectors lentivirals que expressaven shRNAs específics contra la seva seqüència. El knockdown de JMJD3 va bloquejar significativament l'expressió de marcadors mesenquimals, tant a nivell de RNA com de proteïna en presència de TGF β . Aquests resultats suggereixen que la demetilasa d'histones JMJD3 té un paper clau en la regulació de la EMT induïda per TGF β .

Resum en anglès (màxim 300 paraules)

JMJD3 (Jumonji domain containing protein 3) is a histone demethylase. It specifically removes the trimethyl group from lysine 27 in the histone 3 (H3K27), an epigenetic mark related to transcriptional inhibition (Xiang et al 2007, Hong et al 2007). Recently it has been shown to be involved in maintaining hESC pluripotency (Lu et al 2010). Furthermore, it is implicated in the regulation of physiological processes such as inflammation (De Santa et al Cell 2007), epigenetic reprogramming during wound healing (Shaw et al 2009, De Santa et al 2009) and differentiation (Sen et al 2008, Jepsen et al 2007), and also in tumor progression (Pereira et al 2011).

Previous data from our lab showed that JMJD3 expression is regulated by TGF β in cell lines derived from human glioma (Bruna et al 2007).

Considering all this, the main objective of this project was to study the role of JMJD3 in the epigenetic regulation of tumor progression induced by TGF β .

Our results show that JMJD3 expression in A549 cells, which are derived from human lung adenocarcinoma, is highly induced upon TGF β treatment. This increase occurs rapidly and is maintained at least 48 hours, while the epithelium-mesenchymal transition (EMT) takes place. In order to study the role of JMJD3 in this transdifferentiation process, we generated stable cell lines by infection with lentiviral vectors that contained shRNAs specifically directed against its sequence.



Resum en anglès (màxim 300 paraules) – continuació -.

Knockdown of JMJD3 significantly blocked the expression of mesenchymal markers, at the RNA and protein level. These results suggest that JMJD3 has a key role in the regulation of the TGF β -induced EMT.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Resultats

1. El tractament amb TGF β induceix un augment en l'expressió de JMJD3.

A 2007, estudis realitzats al grup del Dr. Seoane van posar de manifest que l'expressió de JMJD3 estava regulada pel tractament amb TGF β en la línia cel.lular U373, derivada d'un gliobastoma humà (Bruna et al 2007). Tenint en compte aquest fet, vam decidir investigar si aquesta regulació també es produïa en altres línies tumorals. En concret, vam triar les cèl.lules A549, derivades d'un adenocarcinoma humà de pulmó, per la seva capacitat de resposta a aquest tractament.

Amb aquest propòsit, i mitjançant la tècnica de PCR quantitativa (qPCR), vam analitzar els nivells d'expressió del gen *JMJD3* en cèl.lules A549. Com es pot observar a la figura 1A, el tractament amb TGF β induïa un potent increment en la seva expressió després de 4 hores. Aquest augment desapareixia en presència d'un inhibidor de la via, demostrant així la seva especificitat (Fig 1A), i també quan es bloquejava l'expressió de Smad4 mitjançant la transfecció amb siRNA (Fig 1B), posant de manifest que es tractava d'un efecte directe.

Paral·lelament vam analitzar l'expressió de la metil-transferasa Ezh2, encarregada



d'afegir els grups metil a la H3K27, i per tant de contrarrestar els efectes de la JMJD3. Com s'observa a la Figura 1C, en aquest cas el tractament amb TGF β no regula la seva expressió.

2. L'increment en l'expressió de JMJD3 produït per TGF β és sostingut durant el procés de transició epitelio-mesenquimal (EMT).

Després de comprovar que el tractament amb TGF β induïa l'expressió de JMJD3 en les cèl·lules A549 a temps curts (4 hores), vam decidir estudiar si aquest augment es mantenía en el temps o era un efecte puntual. Amb aquest propòsit vam extreure RNA de cèl·lules A549 tractades amb TGF β a diferents temps, (en concret: 1 hora, 2 hores, 4 hores, 8 hores, 16 hores, 24 hores, 32 hores i 48 hores) i vam analitzar l'expressió de JMJD3 mitjançant qPCR. Com mostra la figura 2A, l'increment es produïa molt ràpidament, després d'una hora de tractament, i es mantenía durant almenys 48 hores, temps en el que té lloc la EMT, com es demostra amb la disminució dels nivells protèics del marcador epitelial cadherina E (Figs 2A i 2B).

Paral·lelament vam analitzar l'expressió de la demetilasa d'histones Utx, membre de la mateixa subfamília de *Jumonj-domain containing proteins* que la JMJD3, i per tant, també capaç de treure els grups metil a la H3K27. Com s'observa a la figura 2C, en aquest cas el tractament amb TGF β no regula la seva expressió (Fig 2C).

3. El knockdown de JMJD3 bloqueja la transició epitelio-mesenquimal.

Per tal d'estudiar el paper de la JMJD3 en el procés de EMT, vam generar una línia cel·lular estable, en la que la seva expressió estava fortament disminuïda mitjançant la infecció de cèl·lules A549 amb vectors lentivirals que expressaven shRNAs específics contra la seva seqüència (a partir d'ara shJMJD3). Paral·lelament, es va generar una altra línia cel·lular que expressava un shRNA que no inhibia l'expressió de JMJD3 (a partir d'ara shControl).

Un cop generades, les línies shJMJD3 i shControl, juntament amb les A549 salvatges, es van cultivar el presència i en absència de TGF β durant 2 dies, recollint RNA a les 6 hores, a les 24 hores i a les 48 hores. A més a més, també es va recollir proteïna al final del tractament. Després de comprovar per qPCR l'eficàcia de la inhibició del shRNA contra JMJD3 fins i tot en presència de TGF β (Fig 3A), va analitzar mitjançant la mateixa tècnica els nivells d'expressió de dos gens



mesenquimals com són la fibronectina i la vimentina. Com es pot veure a les figures 3B i 3C, el *knockdown* de JMJD3 produïa una important disminució en l'expressió d'aquests dos gens marcadors de EMT, en condicions basals i en presència de TGF β (Fig 3B i 3C). A més, Aquesta reducció, no només tenia lloc a nivell de RNA, sinó que també es produïa a nivell de proteïna (Fig 3D).

Aquests resultats suggereixen que la demetilasa d'histones JMJD3 té un paper clau en la regulació de la EMT induïda per TGF β .



Figura 1

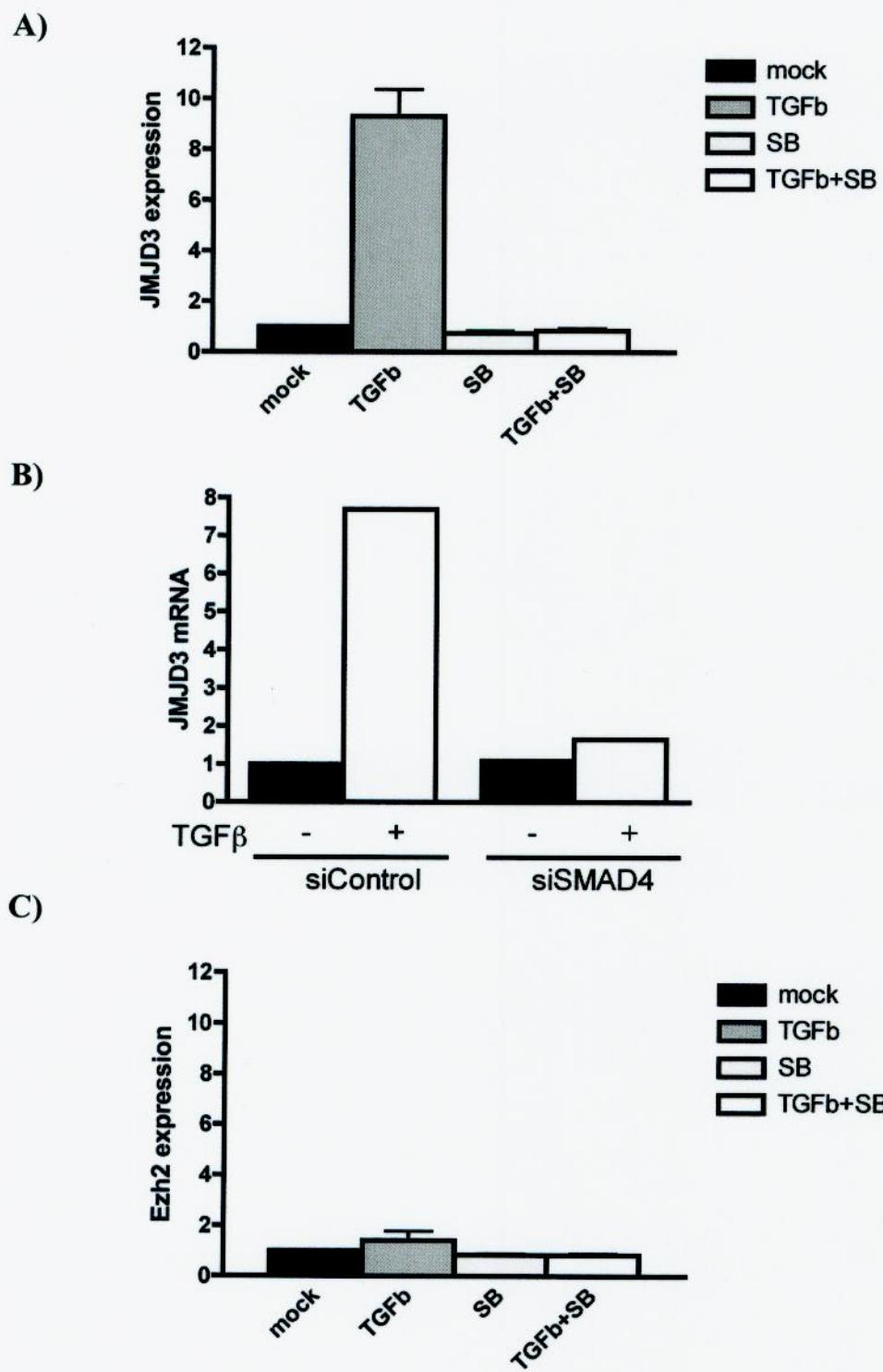
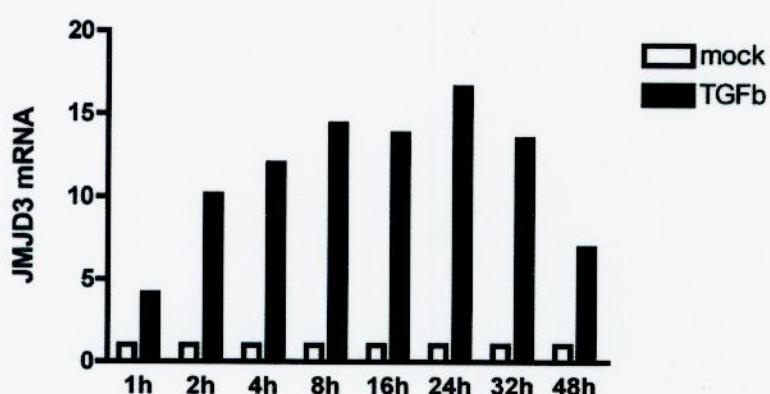
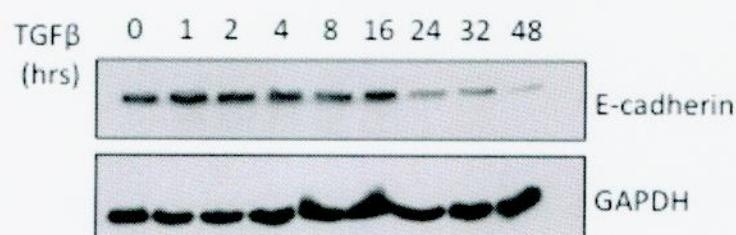


Figura 2

A)



B)



C)

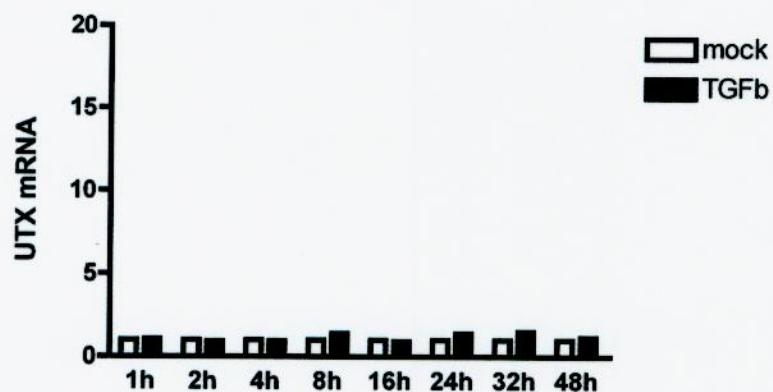
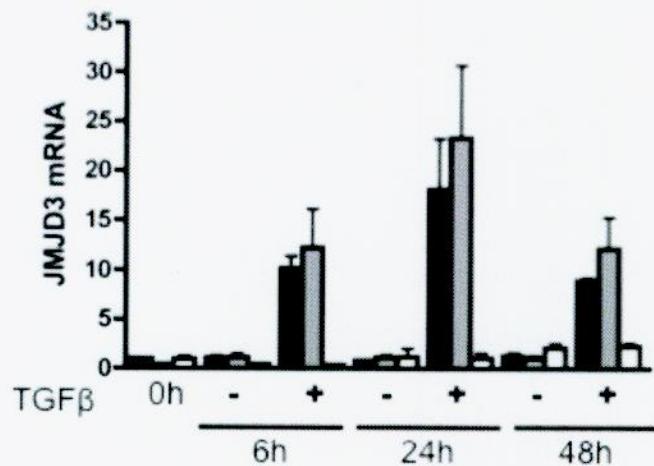
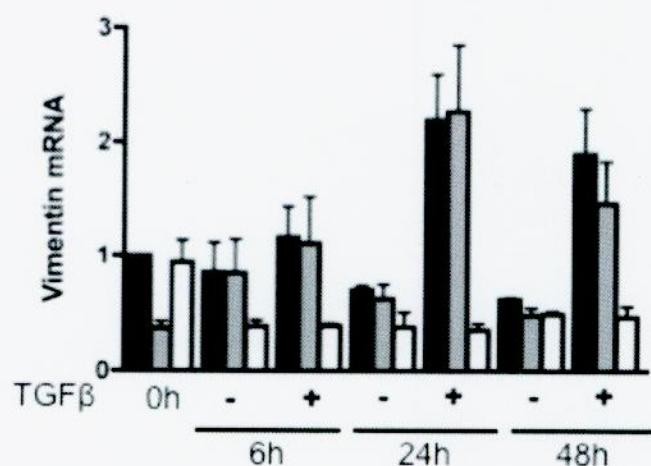


Figura 3

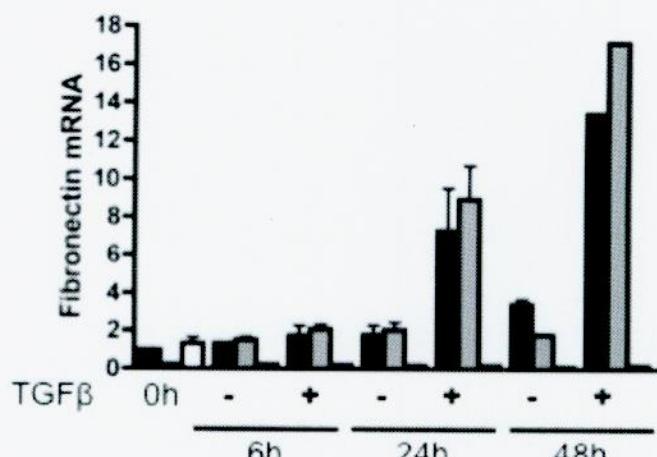
A)



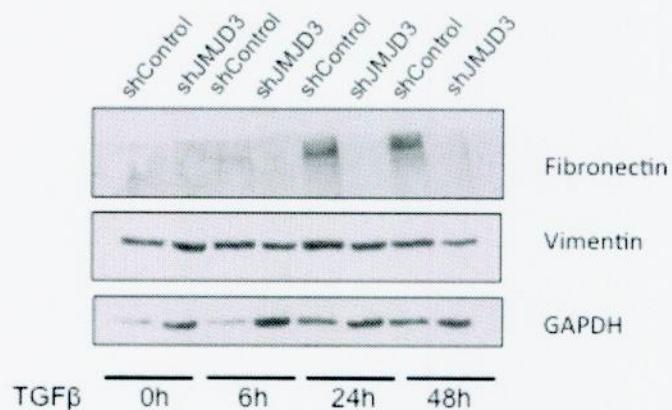
B)



C)



D)



Bibliografia

1. Bruna A., Darken R.S., Rojo F., Ocana A., Penuelas S., Arias A., Paris R., Tortosa A., Mora L., Baselga J., et al. (2007). High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 11, 147-160.
2. De Santa F., Totaro M.G., Prosperini E., Notarbartolo S., Testa G., and Natoli G. (2007). The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 130(6): 1083-94.
3. De Santa F., Narang V., Yap Z.H., Tusi B.K., Burgold T., Austenaa L., Bucci G., Caganova M., Notarbartolo S., Casola S., et al. (2009). Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. *EMBO J.* 28(21): 3341-52.
4. Hong S., Cho Y.W., Yu L.R., Yu H., Veenstra T.D., and Ge K. (2007). Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(47):18439-44.
5. Jepsen K, Solum D, Zhou T, McEvilly RJ, Kim HJ, Glass CK, Hermanson O, Rosenfeld MG. (2007). SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. *Nature* 450(7168):415-9.
6. Lu T.Y., Lu R.M., Liao M.Y., Yu J., Chung C.H., Kao C.F., and Wu H.C. (2010) Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem* 285(12):8719-32.
7. Sen GL, Webster DE, Barragan DI, Chang HY, Khavari PA. (2008) Control of differentiation in a self-renewing mammalian tissue by the histone demethylase JMJD3. *Genes Dev.* 2008 22(14):1865-70.
8. Shaw T., and Martin P. (2009) Epigenetic reprogramming during wound healing: loss of polycomb-mediated silencing may enable upregulation of repair genes. *EMBO Rep.* 2009 10(8):881-6.
9. Xiang Y., Zhu Z., Han G., Lin H., Xu L., and Chen C.D. (2007) JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res* 17(10):850-7.