

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Estudio de modificaciones postraduccionales de histonas y su efecto citotóxico sobre células endoteliales

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DANIEL VOLTOLINI GONZÁLEZ

TUTORA: ROSA MARÍA PEIRÓ BARBER

COTUTOR: CARLOS ROMÁ MATEO

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, septiembre de 2016



Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial - Sin Obra Derivada"

ESTUDIO DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS Y SU EFECTO CITOTÓXICO SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES

Autor: Daniel Voltolini González

Tutora: Rosa María Peiró Barber

Cotutor: Carlos Romá Mateo

Valencia, septiembre de 2016

RESUMEN

En los últimos años se ha descrito la participación de las histonas en procesos extracelulares implicados en inflamación. Las histonas, liberadas de forma controlada por neutrófilos, contribuyen a la inmovilización y eliminación de patógenos por las células del sistema inmunológico a través de las llamadas redes extracelulares de neutrófilos (NETs). Además, las propias histonas presentan un efecto citotóxico mediado por mecanismos aún no esclarecidos que facilitan el proceso inflamatorio y la respuesta inmunológica. Sin embargo, la presencia de histonas produce así mismo efectos nocivos sobre las células del endotelio de los vasos sanguíneos, por lo que las histonas circulantes se han visto involucradas en procesos patológicos que cursan con una respuesta inflamatoria prolongada, como por ejemplo en sepsis. No obstante, hasta la fecha se desconoce qué tipo de modificaciones postraduccionales concretas sufren las histonas implicadas en enfermedad, más allá de una participación de histonas citrulinadas o hiperacetiladas en lupus sistémico eritomatoso, por ejemplo. Las modificaciones postraduccionales de histonas contribuyen a la modulación de la expresión génica permitiendo o bloqueando el acceso de la maquinaria de transcripción a la cromatina, constituyendo uno de los mecanismos clave de la regulación epigenética y, por tanto, de gran relevancia para el estudio de la respuesta celular a condiciones ambientales específicas. En el presente trabajo se analizarán los patrones de modificaciones presentes en histonas obtenidas a partir de extractos celulares y se pondrá a punto una metodología de purificación para histonas con modificaciones postraduccionales específicas, con vistas a evaluar las diferencias en la capacidad citotóxica sobre células endoteliales humanas de los distintos tipos de histonas y en función de las modificaciones postraduccionales que presenten.

PALABRAS CLAVE

Histonas, modificaciones postraduccionales, FPLC, citotoxicidad

STUDY OF HISTONE POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND THEIR CYTOTOXIC EFFECT ON ENDOTHELIAL CELLS

Author: Daniel Voltolini González

Tutor: Rosa María Peiró Barber

Co-tutor: Carlos Romá Mateo

Valencia, September 2016

ABSTRACT

Participation of histones in extracellular processes related to inflammation has been described in recent years. Through their release in a controlled manner by neutrophils, histones take part in the immobilization and elimination of pathogens by immune cells, being key components in the so-called neutrophil extracellular traps (NETs). Besides, histones themselves show a cytotoxic effect induced by mechanisms not fully understood, that contributes to the inflammatory processes and immune responses. However, the presence of histones yields at the same time noxious effects on the endothelial cells of blood vessels, in such a way that plasma histones have been demonstrated to be involved in pathological processes like sepsis, in which prolonged inflammatory response occurs. Nevertheless, which kind of specific posttranslational modifications in histones are implicated in disease remains currently unknown, with the exception of the presence of some citrullinated or hyperacetylated histones in systemic lupus erythematosus, for instance. Posttranslational modifications of histones contribute to the modulation of gene expression either by allowing or blocking the access to chromatin for the transcription machinery, being one of the key mechanisms underlying epigenetic regulation and, hence, of great relevance for the study of cellular responses to specific environmental conditions. In the present work, the modification pattern present in histones obtained from human cell extracts will be analyzed, and a purification methodology for histones with specific posttranslational modifications will be set, in order to evaluate the differences in the cytotoxic capability of the distinct histone types, and the diverse posttranslational modifications they might show, on human endothelial cells.

KEYWORDS

Histones, posttranslational modifications, FPLC, cytotoxicity

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LAS HISTONAS	2
1.2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS	2
1.3. HISTONAS EXTRACELULARES.....	5
1.4. CITOTOXICIDAD MEDIADA POR HISTONAS	5
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. CULTIVOS CELULARES.....	11
3.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	11
3.3. OBTENCIÓN DE HISTONAS	12
3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	12
3.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	13
3.6. ANÁLISIS DE LA CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS	14
3.7. CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. INDUCCIÓN DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN HISTONAS.....	17
4.1.1. Inducción de carbonilación y ubiquitinación con MG 132	17
4.1.2. Inducción de metilación con IOX1.....	21
4.1.3. Inducción de acetilación con TSA.....	22
4.2. PURIFICACIÓN DE HISTONAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA	24
4.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	26
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos considerados de carácter epigenético y las interacciones entre ellos	1
Figura 2. Esquema de interacción entre proteínas modificadoras de histonas.....	4
Figura 3. Esquema del papel de las histonas extracelulares en la citotoxicidad de las NETs	6
Figura 4. Oxy-Western Blot para la detección de residuos carbonilados	18
Figura 5. Western Blot para la detección de ubiquitinas y poliubiquitinas	19
Figura 6. Western Blot para la detección de ubiquitinas y poliubiquitinas	20
Figura 7. Curva de citotoxicidad del IOX1	21
Figura 8. Western Blot para la detección de residuos metilados	22
Figura 9. Curva de citotoxicidad del TSA.....	23
Figura 10. Western Blot para la detección de residuos acetilados.....	23
Figura 11. Western Blot para la detección de residuos acetilados.....	24
Figura 12. Purificación de histonas mediante FPLC	25

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: proteína C activada
APS: persulfato de amonio
BSA: seralbúmina bovina
CO₂: dióxido de carbono
DAMP: patrón molecular asociado a daño
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidracina
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography
H₂SO₄: ácido sulfúrico
HAT: acetil transferasa de histonas
HDAC: desacetilasa de histonas
HKMT: metiltransferasa de lisinas de histonas
HMT: metiltransferasa de histonas
IOX1: ácido 8-hidroxi-5-quinolin-carboxílico/5-carboxi-8-hidroxiquinolina
KCl: cloruro de potasio
KDM: desmetilasa de lisinas de histonas/proteínas
LD₅₀: dosis letal mediana
MAPK: quinasa de proteínas activada por mitógenos
MgCl₂: cloruro de magnesio
NaCl: cloruro sódico
NET: red extracelular de neutrófilos
NF-κB: factor necrótico κB
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: tampón fosfato salino
PRMT: metiltransferasa de argininas de histonas/proteínas
PTM: modificación postraducciona

RNA: ácido ribonucleico

miRNA: micro RNA

ncRNA: RNA no codificante

ROS: especie reactiva de oxígeno

SDS: dodecilsulfato sódico

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: tetrametiletilendiamina

TFA: ácido trifluoroacético

TLR: receptor tipo Toll

Tris: tris hidroximetilaminometano

TSA: tricostatina A

UV: ultravioleta

WB: Western Blot

1. INTRODUCCIÓN

La epigenética se puede definir, a día de hoy, como el estudio de las modificaciones que, sin alterar directamente la secuencia nucleotídica del DNA, regulan la expresión génica y, en última instancia, el fenotipo celular resultante de dicha expresión (Dupont et al., 2009; Hyun et al., 2015; Imhof, 2006; Kouzarides, 2007; Majnik and Lane, 2014). Actualmente, existe en la comunidad científica cierta controversia acerca del significado preciso de este término, pues se emplea en diferentes ámbitos de la biología muy diferentes entre sí como lo pueden ser la ecología y la biología celular (Deans and Maggert, 2015). Sobre lo que no parece haber duda alguna es el autor que acuñó el término “epigénética”, Conrad Waddington, quien la definió en un primer momento en el año 1942 como la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo (Deans and Maggert, 2015; Dupont et al., 2009; Huang et al., 2014; Hyun et al., 2015). La principal discrepancia que se generó en los años sucesivos respecto a la definición de la epigenética fue la inclusión del concepto de heredabilidad (Deans and Maggert, 2015; Kouzarides, 2007; Tammen et al., 2013). Hoy en día existen ciertas evidencias de herencia transgeneracional de modificaciones epigenéticas, pero la definición más aceptada matiza que las modificaciones consideradas epigenéticas son aquellas que pueden heredarse postmitóticamente. Independientemente de su definición, la mayoría de autores coinciden en aglutinar las modificaciones epigenéticas en tres grandes grupos:

- La metilación del DNA (generalmente en los extremos 5' de citosinas).
- Los RNAs no codificantes (ncRNAs), entre los que destacan los microRNAs (miRNAs).
- Las modificaciones postraduccionales de las histonas y las propias variantes de éstas.

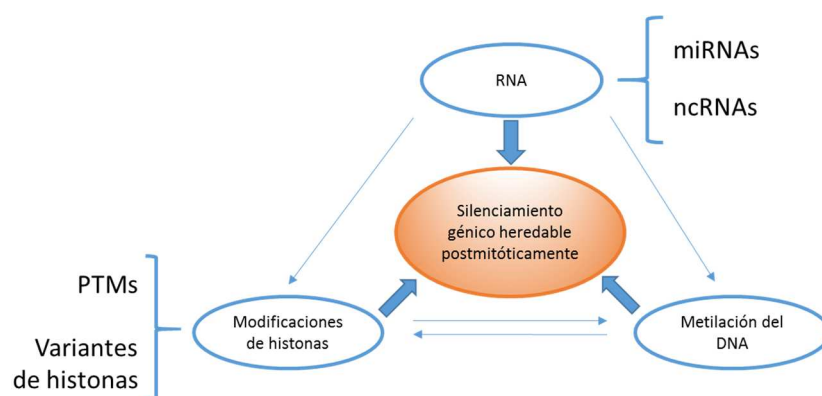


Figura 1. Mecanismos considerados de carácter epigenético y las interacciones entre ellos (modificado de Egger et al., 2004).

Este conjunto de modificaciones se considera hoy en día el objeto de estudio de la epigenética (figura 1), si bien es cierto que hay otros elementos cuya pertenencia o no a la categoría de la epigenética se encuentra todavía en discusión. De entre ellas, la metilación del

DNA es, probablemente, la modificación más estudiada hasta ahora (Dupont et al., 2009; Hyun et al., 2015; Majnik and Lane, 2014; Tammen et al., 2013).

En el presente trabajo se estudiarán las histonas, no como mediadores de la regulación de la expresión génica, sino como participantes en procesos extracelulares relacionados con la respuesta inmunológica en condiciones patológicas. No obstante, la descripción detallada de las modificaciones postraduccionales en histonas y su efecto sobre las propiedades biológicas de éstas es crítico para la mejor comprensión de la compleja interacción entre la célula y su entorno en condiciones ambientales tan intrincadas y dinámicas como las que median procesos de respuesta inmunológica, aportando un valor añadido hacia el conocimiento de los mecanismos epigenéticos subyacentes.

1.1. LAS HISTONAS

Las histonas constituyen, junto con otras proteínas y el DNA, lo que se conoce como cromatina, componente estructural de los cromosomas eucariotas en el núcleo celular. La cromatina está formada por nucleosomas (compuestos por un núcleo de histonas envueltas por un filamento de DNA de 147 pares de bases habitualmente) unidos entre sí por un fragmento de DNA llamado DNA espaciador que da cabida a un cierto plegamiento de la cromatina. Las histonas que conforman los nucleosomas en los seres humanos son dos H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4, lo que suma un total de ocho histonas. El DNA que rodea a este octámero proteico da exactamente 1,7 vueltas a la estructura, consiguiendo un primer nivel de compactación de la información genética. Un segundo nivel de compactación se alcanza gracias a la acción de la histona H1, la cual reside fuera del complejo nucleosómico (Kimura, 2013; Kouzarides, 2007; Tammen et al., 2013).

Desde su descubrimiento en 1884 por el alemán Albrecht Kossel, importantes hallazgos relacionados con las histonas han ampliado el conocimiento sobre los mecanismos a nivel molecular que emplean los organismos para conservar y expresar la información contenida en el DNA. Algunos de ellos tienen que ver con las denominadas “colas” de las histonas, que no son más que elongaciones o proyecciones de las mismas dirigidas hacia el exterior del nucleosoma dejando algunos aminoácidos al descubierto, fuera del complejo nucleosomal. Sobre una gran variedad de aminoácidos de estas colas (y también, aunque en menor proporción, de las partes globulares) se han observado modificaciones de carácter covalente que juegan un rol indiscutible en el control transcripcional (Kimura, 2013).

1.2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS

Las modificaciones covalentes que pueden encontrarse en determinados aminoácidos de las histonas, llamadas modificaciones postraduccionales de histonas o PTMs por sus siglas en inglés, regulan la expresión génica a través de dos mecanismos. Uno de estos mecanismos consiste en la alteración de las cargas iónicas de las colas de las histonas, de modo que éstas ganan o pierden (según el tipo de modificación) afinidad por las hélices de DNA que poseen una carga neta negativa debido a la presencia de grupos fosfato. Así se consigue que la cromatina sea más o menos accesible a la maquinaria de transcripción y traducción del organismo y a otros

elementos reguladores. El otro mecanismo conocido a día de hoy se basa en el reclutamiento de proteínas de naturaleza diferente a la de las histonas. Dependiendo del tipo de modificación, unas u otras proteínas serán atraídas hacia el nucleosoma para ejercer distintas funciones según el proceso que se esté llevando a cabo en ese momento: transcripción, replicación, reparación del DNA... (Kouzarides, 2007; Siggens and Ekwall, 2014; Tammen et al., 2013).

Las PTMs se dan en los residuos de lisina, arginina, treonina, tirosina y serina de los extremos amino de las histonas y, al contrario que el DNA que sólo es modificado covalentemente mediante metilación o hidroximetilación, consisten en no menos de ocho tipos diferentes de modificación (Dupont et al., 2009; Kimura, 2013; Kimura et al., 2015; Tammen et al., 2013). Las PTMs más comunes son: metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP ribosilación, sumoilación, deiminación e isomerización de la prolina (Kouzarides, 2007), entre otras.

De todas las PTMs existentes, la metilación y la acetilación en las histonas H3 y H4 son las más estudiadas (Chen et al., 2014), y es por ello que este trabajo ha sido enfocado en gran parte al análisis de estas dos modificaciones. La acetilación (que se produce únicamente en lisinas) ha sido estudiada en detalle por otros grupos y se ha observado que el aumento de ésta (hiperacetilación) se correlaciona con la activación transcripcional mientras que la disminución de esta marca (hipoacetilación) da lugar a represión transcripcional (Dupont et al., 2009; Tammen et al., 2013). Este hecho cobra sentido si se tiene en cuenta que cuando se añade un grupo acetilo a una lisina de una histona, la carga positiva de este residuo se neutraliza, obteniendo como resultado el debilitamiento de la unión entre la histona y el DNA, provocando que éste sea más accesible a factores de transcripción y demás proteínas. Del mismo modo, si una lisina es desacetilada, la proteína en cuestión ganará afinidad por la cadena de DNA a la que está unida (Tammen et al., 2013).

Al tratarse la acetilación de un componente clave en la regulación de la expresión génica, resulta necesario para el organismo disponer de maquinaria eficiente que acetile o desacetile a las histonas en el lugar y el momento adecuados. Esta maquinaria está compuesta por las HATs ("histone acetyl-transferases") y las HDACs ("histone deacetylases"). Las primeras se encargan de llevar grupos acetilo a las histonas mientras que la tarea de las segundas consiste justo en lo contrario, es decir, en eliminar grupos acetilo de las histonas. Cabe mencionar el hecho de que, a pesar de que ambas denominaciones incluyen el término "histona", su actividad no se limita a la acetilación o desacetilación de éstas, sino que pueden modificar a otras proteínas también (Brandl et al., 2009; de Ruijter et al., 2003; Xu et al., 2007).

La metilación ocurre principalmente en residuos de lisina y arginina. Contrariamente a la acetilación, la metilación ha sido asociada tanto a la activación como a la represión transcripcional, lo cual quiere decir que esta modificación no afecta a la carga neta de las histonas o, al menos, no significativamente. Adicionalmente, la metilación de histonas tiene una particularidad, y es que puede darse más de una vez en el mismo residuo. Las lisinas, por ejemplo, pueden estar monometiladas, dimetiladas o incluso trimetiladas. Las argininas pueden estar monometiladas o bien dimetiladas. Esta característica dota de cierta complejidad al estudio de este tipo de modificación (Bannister and Kouzarides, 2011; Kim et al., 2009; Kimura, 2013).

Tal y como ocurre con la acetilación, en este caso también existen enzimas que se ocupan de regular la metilación de las histonas y otras proteínas. Éstas se dividen en dos grandes grupos: las HMTs ("histone methyltransferases"), que se encargan de añadir metilos a diversos

aminoácidos de las histonas, y las KDMs (“histone/protein lysine demethylases”), que tienen como tarea eliminar grupos metilo de las histonas. Las primeras se pueden subdividir, a su vez, en dos grupos: HKMTs (“histone lysine methyltransferases”) y PRMTs (“protein/histone arginine methyltransferases”). Así pues, la modulación de la metilación de histonas a través de estas enzimas es clave en la regulación epigenética y puede influir en el desarrollo de numerosas patologías (Song et al., 2016; Thinnis et al., 2014).

Hoy en día se conocen diversos inhibidores de estas enzimas, que ejercen diferentes abordajes para la consecución de la inhibición de las enzimas. El tratamiento de células en cultivo con este tipo de inhibidores es una estrategia utilizada para modificar el estado de metilación y acetilación global de las histonas. Las propiedades terapéuticas de algunos de ellos (como el TSA y el IOX1) se encuentran actualmente bajo estudio y, debido a la importancia de las enzimas sobre las que actúan, resultan muy prometedoras.

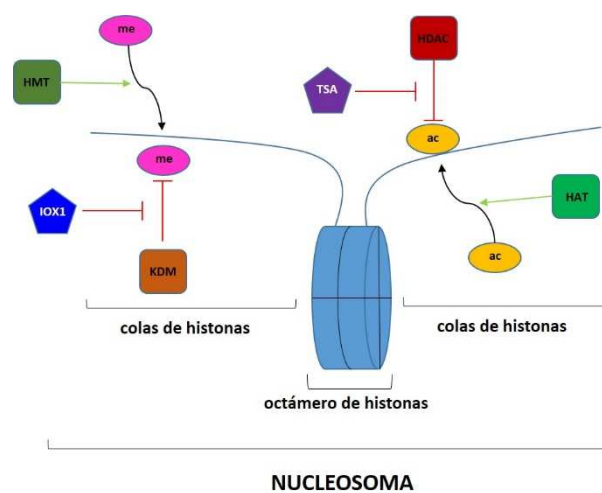


Figura 2. Esquema de interacción entre proteínas modificadoras de histonas. Se muestra un octámero de histonas con presencia de grupos metilo (me) y acetilo (ac) en sus colas de aminoácidos. Estas PTMs son reguladas por las proteínas modificadoras tipo HMTs y KDMs (metilación/desmetilación) y por las HATs y HDACs (acetilación/desacetilación). Existen además inhibidores de estas proteínas, como el IOX1 y el TSA.

Como se ha mencionado anteriormente, existen otros tipos de modificaciones postraduccionales en histonas de carácter minoritario o menos estudiados. Un ejemplo interesante es el de la ubiquitinación, mecanismo de etiquetado de proteínas para su degradación que, no obstante, puede servir también como modificación reguladora de procesos de señalización celular. Se ha descrito la relación entre señalización por la vía de la ubiquitina y las histonas, siendo la ubiquitinación de las isoformas de histona H2 la mejor descrita hasta el momento (Bach and Hegde, 2016).

Por otro lado, el grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo fue el primero en describir modificaciones en histonas como la glutationilación de la histona H3 (García-Giménez et al., 2013), así como la carbonilación de varios tipos de histonas en relación al ciclo celular (García-Giménez et al., 2012). Las consecuencias fisiológicas de la presencia de este tipo de PTMs todavía se desconocen en gran parte, así como su posible papel en el desarrollo de condiciones patológicas en el organismo, motivo por el cual se están llevando a cabo numerosas investigaciones en el campo.

1.3. HISTONAS EXTRACELULARES

En contraste con las histonas intracelulares, existen también histonas extracelulares o circulantes, cuya función no es estructural ni llevan a cabo ningún tipo de regulación génica. Su papel en el organismo parece estar relacionado con la defensa ante microorganismos exógenos y la respuesta inflamatoria. De hecho, existen estudios en los que se propone la inclusión de las histonas extracelulares dentro de la categoría de moléculas con patrones asociados al daño, o DAMPs por su nombre en inglés (Chen et al., 2014; Gould et al., 2015; Xu et al., 2015).

Si bien no es tarea sencilla identificar las fuentes de histonas extracelulares, actualmente se consideran dos orígenes posibles. Las células en estado de necrosis es uno de ellos: en el momento en que una célula sufre la ruptura de la membrana plasmática, su contenido es vertido al espacio extracelular, incluyendo histonas y demás material genético. Así mismo, se hipotetiza que las células en estado apoptótico también vierten histonas al medio extracelular a pesar de que no se produce la disgregación de su membrana (Chen et al., 2014; Xu et al., 2015). Ambos procesos de muerte celular pueden alcanzarse tras la exposición a un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS según las siglas en inglés), como por ejemplo peróxido de hidrógeno, con el cual se ha demostrado que al inducir la muerte celular por ambas vías se produce un vertido de histona H3 al espacio extracelular (Kawano et al., 2014).

La otra fuente descrita radica en las llamadas “neutrophil extracellular traps” o NETs, redes compuestas por las secreciones de los neutrófilos activados, en las que se pueden hallar histonas, DNA, proteínas citoesqueléticas y proteínas granulares como la elastasa, propia de los neutrófilos, o la mieloperoxidasa (Kolaczowska et al., 2015; Xu et al., 2015). La principal función de estas NETs es atrapar y degradar microbios extraños al organismo. Cuando la cantidad segregada de NETs es excesiva se puede producir un tipo de muerte en las células inmunes conocido como NETosis (Chen et al., 2014). El eje estructural de las NETs es el DNA genómico, que con sus cargas negativas atrae al resto de proteínas formando uniones electrostáticas (Kolaczowska et al., 2015), aunque éste no es el causante de la citotoxicidad de las NETs (Saffarzadeh et al., 2012). Se postula que las cargas positivas de las histonas están implicadas en el mecanismo por el cual éstas logran eliminar bacterias y demás patógenos. Gracias a ellas se acoplan a la membrana microbiana, consiguiendo así la muerte directa del microorganismo o bien un aumento de la permeabilidad de dicha membrana alterando la respuesta al calcio y desencadenando procesos todavía no bien descritos (García-Giménez et al., 2015).

1.4. CITOTOXICIDAD MEDIADA POR HISTONAS

Así pues, siguiendo la línea del epígrafe anterior, hay constancia de que las histonas fuera del nucleosoma tienen habilidades proinflamatorias y participan activamente en la eliminación de posibles patógenos como parte del sistema inmune innato. Sin embargo, Gould et al. (2015) proponen que las histonas extracelulares son, en realidad, espadas de doble filo. De la misma manera que las histonas resultan letales para muchos patógenos fuera de la estructura de la cromatina, también lo son para las células del huésped (Kolaczowska et al., 2015; Saffarzadeh et al., 2012), a través de la inducción de la apoptosis o necrosis en diversos tipos celulares, como por ejemplo en células de la retina (Kawano et al., 2014). Aparentemente, la letalidad de las histonas afecta a un gran número de órganos: hígado, riñones, cerebro, pulmones, páncreas, etc. (Chen et al., 2014), y su secreción tras el daño proviene de muchos

tejidos, afectando al mismo tiempo a casi todos ellos de manera negativa cuando la exposición es prolongada.

Uno de los tejidos particularmente sensible al daño mediado por las histonas es el endotelio (Chen et al., 2014; Xu et al., 2009). En el estudio de Saffarzadeh et al. (2012) se comprobó, en células epiteliales y endoteliales, que los componentes causantes de la citotoxicidad de las NETs eran, efectivamente, las histonas. Sin embargo, en este mismo estudio se afirma que la citotoxicidad de las NETs puede ser revertida hasta cierto punto, dependiendo de varios factores. El uso de anticuerpos contra histonas es una de las estrategias propuestas. Otro mecanismo para reducir la citotoxicidad mediada por histonas (no presentes en las NETs, sino aisladas) es el suministro de la proteasa APC ("activated protein C"). Adicionalmente, la heparina ha mostrado ser una vía para prevenir el daño causado por las histonas circulantes en plasma, independientemente de su capacidad anticoagulante (Iba et al., 2015; Wildhagen et al., 2014).

Hay estudios que afirman que las histonas extracelulares pueden inducir la producción de interleuquinas (Kawano et al., 2014) y otras citoquinas (Ekaney et al., 2014) o unirse a receptores (TLRs entre otros) para activar diferentes rutas de señalización, tales como MAPK, inflammasoma y NF- κ B. Así pues, se cree que las histonas extracelulares constituirían unos biomarcadores útiles para el diagnóstico y pronóstico de múltiples enfermedades (Chen et al., 2014; García-Giménez et al., 2015), destacando la sepsis y diferentes tipos de patologías asociadas a traumatismos (Ekaney et al., 2014).

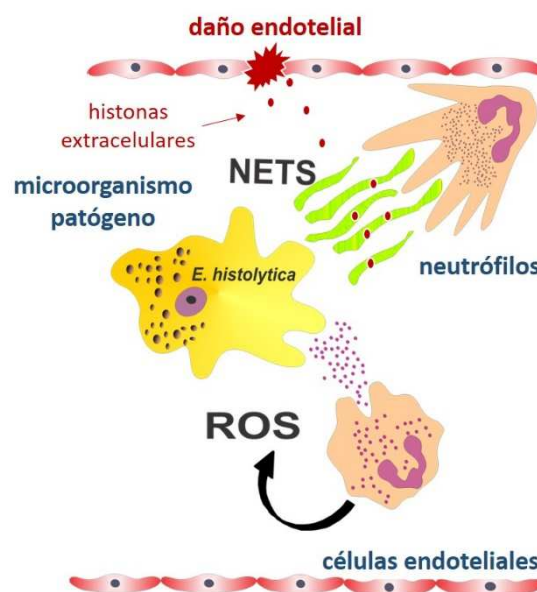


Figura 3. Esquema del papel de las histonas extracelulares en la citotoxicidad de las NETs. Los neutrófilos activados segregan diferentes componentes al espacio extracelular entre los que se encuentran diversos tipos de histonas, que resultan tóxicas para los microorganismos patógenos así como para las células endoteliales.

A pesar de la acumulación de evidencias en cuanto a la toxicidad mediada por histonas, existen muchos interrogantes todavía respecto a los mecanismos moleculares que median en estos procesos. Se desconoce en gran medida la participación de las modificaciones postraduccionales específicas en estos procesos, más allá de ejemplos puntuales como el requerimiento de la citrulinación de histonas para la formación de NETs (Leshner et al., 2012;

Wang et al., 2009) o la correlación entre niveles de histonas citrulinadas e hiperacetiladas en lupus eritematoso sistémico (Dwivedi et al., 2014; Pieterse et al., 2015). La relación entre los daños producidos en el endotelio de los vasos sanguíneos y las características de las histonas que participan es, a fecha de hoy, un frente abierto cuyo estudio puede proporcionar importante información en cuanto a los detalles mecanísticos, así como servir de base para el diseño de biomarcadores epigenéticos específicos. En el presente trabajo se desarrolla un protocolo de inducción de modificaciones postraduccionales en histonas y su posterior purificación, en vistas a la evaluación de las propiedades citotóxicas de estas formas específicas en relación al daño endotelial producido por la presencia de histonas circulantes.

2. OBJETIVOS

1. El primer objetivo del presente trabajo consiste en la inducción de modificaciones postraduccionales específicas en histonas, mediante la utilización de distintos compuestos:

- 1.1. MG 132 para la inducción de ubiquitinaciones/carbonilaciones.
- 1.2. IOX1 para la inducción de metilaciones.
- 1.3. TSA para la inducción de acetilaciones.

2. El segundo objetivo es la obtención de extractos celulares puros de histonas individuales a partir de extractos complejos obtenidos en las condiciones descritas en el objetivo primero mediante técnicas cromatográficas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

Para la realización de todos los experimentos se emplearon células HeLa, línea celular de cáncer cervical humano. Éstas se crecieron en medio de cultivo DMEM (*Invitrogen, San Diego, CA, EEUU*) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (*Invitrogen, San Diego, CA, EEUU*) y un 1% de penicilina/estreptomocina (*Invitrogen, San Diego, CA, EEUU*).

Las células se mantuvieron en frascos de cultivo celular T75 a una densidad de 20000 células/cm² aproximadamente, a 37°C en atmósfera humidificada y con un 5% de CO₂ en la incubadora *Heracell 150i CO₂* (*Thermo Scientific, New York, NY, EEUU*).

3.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Para determinar el grado de citotoxicidad de los compuestos empleados se utilizó el método de la sulforhodamina B. Este compuesto tiñe de un color rosado el contenido proteico de las células. Por tanto, solo se teñirán aquellas células cuya membrana se encuentre dañada como consecuencia de muerte celular, ya que esta es la única manera en la que la sulforhodamina tiene acceso a las proteínas contenidas en el interior de las células. Midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm se pueden cuantificar las proteínas, cuyo número es directamente proporcional al número de células supervivientes antes de comenzar el método de la sulforhodamina.

El procedimiento realizado comenzó por el cultivo de células HeLa en una placa de 96 pocillos para cada compuesto, con 1000 células por pocillo en un volumen de 95 µl. Cada placa se guardó en la incubadora mencionada previamente y al día siguiente se sacó y se añadieron los respectivos tratamientos en un volumen de 5 µl, alcanzando un volumen total en cada pocillo de 100 µl. Al finalizar el tratamiento, se guardó la placa en la incubadora y tras 24 h cada pocillo recibió el mismo tratamiento en el mismo volumen. Tras 24 h más en la incubadora se añadió 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 50% frío (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*) en cada pocillo para fijar las células y provocar la precipitación de las proteínas en el fondo de la placa. Inmediatamente se incubaron las células en la misma placa a 4°C durante 1 h. Pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante y se realizaron cinco lavados con agua, de 200 µl cada lavado. Tras haber eliminado meticulosamente el sobrenadante y haber esperado a que se secase la placa, se pipeteó un volumen de 100 µl de sulforhodamina B (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*) al 0,4% en ácido acético al 1% en cada pocillo y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se llevó a cabo un lavado quintuple con ácido acético al 1% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*) con volúmenes de 150 µl por pocillo. Este paso sirvió para eliminar el colorante que no había quedado fijado a las proteínas. Una vez más se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la placa. Hecho esto se añadió 100 µl por pocillo de trizma 10 mM (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*) con tal de solubilizar el colorante fijado a las proteínas y poder así después leer la absorbancia. Tras unos minutos de reposo se introdujo la placa en el espectrofotómetro *SpectraMax Plus 384* (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU*) y se realizó mediciones tanto a 570 nm de longitud de onda como a 620

nm. Todas las condiciones y concentraciones ensayadas se llevaron a cabo por triplicado. Para el cálculo de la LD₅₀, se representó gráficamente el promedio de los porcentajes de células vivas en cada condición respecto a la condición control, y se calculó el ajuste de los puntos a una curva de tipo hiperbólica obteniendo una R² de 0,948.

3.3. OBTENCIÓN DE HISTONAS

Para la obtención de histonas se procedió a la lisis de unas 3·10⁶ células, previamente tratadas con TSA (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*), IOX1 (*Abcam, Cambridge, RU*) o DMSO a las 24 h y a las 48 h tras la siembra en placas T150; y con MG 132 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*) o DMSO a las 4 h tras la siembra en placas T150. Para ello, se eliminó el medio de cultivo y se lavó cada placa dos veces con 5 ml de PBS. Una vez eliminados los restos de PBS, se añadieron 3 ml de tripsina y se incubaron las placas durante 5 min a 37°C en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Seguidamente, la tripsina fue inactivada añadiendo 3 ml de medio DMEM. Nada más inactivada la tripsina se transfirió el contenido de las placas a tubos Corning y se realizó una centrifugación a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y los “pellets” se resuspendieron en 1 ml de PBS, tras lo cual el contenido se transfirió a tubos de 1,5 ml y se volvió a centrifugar a 1500 rpm durante 5 min. Eliminando el sobrenadante una vez más, se añadió a los tubos 1 ml de tampón de lisis hipotónico (Tris-Cl pH=8 10 mM, KCl 1 mM, MgCl₂ 1,5 mM y ditiotreitól 1 mM) y se dejaron rotando en la noria a 4°C durante 30 min para favorecer la lisis mecánica y el hinchado hipotónico de las células. A continuación, se centrifugaron los tubos a 10000 rpm a 4°C durante 10 min y, posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el contenido de cada tubo en 400 µl de H₂SO₄ 0,4 N. El siguiente paso fue dejar los tubos en rotación constante en la cámara fría (a 4°C) durante toda la noche.

Al día siguiente se volvieron a centrifugar los tubos a 13000 rpm a 4°C durante 10 min y la fase líquida se transfirió a tubos de 1,5 ml nuevos. Inmediatamente se añadió 132 µl de ácido tricloroacético al 100% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*) gota a gota y se invirtieron los tubos varias veces para facilitar la precipitación de las histonas, tras lo cual se dejaron reposar en hielo durante unos 30 min. Pasado este tiempo, se llevó a cabo otra centrifugación a 13000 rpm a 4°C de 10 min. Para eliminar el ácido se aspiró cuidadosamente el sobrenadante con la pipeta y se lavó el “pellet” con 0,5 ml de acetona fría. La centrifugación y la adición de acetona se repitieron una vez más y, tras una última centrifugación, se eliminó el sobrenadante con la pipeta y se dejó secar el “pellet” de histonas purificadas durante unos 30 min. Por último, el “pellet” se disolvió en un volumen determinado de agua bidestilada, dependiendo de la cantidad de “pellet” presente en cada tubo (entre 50 µl y 100 µl).

3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para cuantificar la cantidad de proteína se utilizó el método de Bradford, una técnica colorimétrica que permite medir cantidades de proteínas en disolución. En primer lugar, con el fin de obtener una recta patrón, se preparó una serie de muestras estándar de seralbúmina bovina (BSA) de concentraciones conocidas: 0,25; 1; 2; 4; 5 y 10 (mg/ml). Al mismo tiempo, en una microcubeta *Plastibrán standard disposable cuvette* (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU*) se introdujo 1 ml de agua bidestilada, que sirvió como blanco para calibrar el espectrofotómetro.

A continuación se añadió en cada microcubeta de espectrofotometría, incluyendo las que contendrían las muestras cuya concentración se deseaba conocer, 800 μl de agua bidestilada y 200 μl de *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania*), cuya mezcla se había preparado previamente para todas las cubetas en un tubo Falcon de 50 ml. Justo después se añadió un 1 μl de muestra en las correspondientes cubetas, tanto de las de BSA como las que contenían el extracto de histonas. Seguidamente se invirtieron todas las microcubetas tapándolas antes con film para que la mezcla quedara bien homogénea y se incubaron en completa oscuridad durante unos pocos minutos para que los componentes reaccionaran entre ellos. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro *Jenway 7315 Spectrophotometer* (*Bibby Scientific Ltd, Stone, Staffs, RU*). Con los datos obtenidos de las muestras de concentración conocida se procedió a la elaboración de una recta patrón. Con la ecuación de la recta se obtuvieron las concentraciones desconocidas de las muestras de histonas.

3.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

Para poder detectar específicamente las proteínas (modificadas o no) presentes en los extractos de histonas se llevaron a cabo varios ensayos de Western Blot con distintas muestras y anticuerpos. En primer lugar, para que la detección de las diferentes histonas fuese posible, éstas se separaron según su peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Con tal fin, se preparó un gel de poliacrilamida al 15% para cada ensayo, cuyo contenido era: 3,55 ml de agua bidestilada; 3,75 ml de acrilamida al 40%; 2,5 ml de Tris pH=8,8 1,5 M; 0,1 ml de SDS al 10%; 0,1 ml de APS y 0,004 ml de TEMED.

Mientras el gel polimerizaba se prepararon las muestras que más tarde se cargarían en el mismo. Se dispuso, en tubos de 1,5 ml nuevos, el volumen necesario de disolución de histonas para que hubiera un total de 5 μg de proteína, 4 μl de tampón de carga (Tris 40 mM, EDTA 4 mM, azul de bromofenol al 0,01%, sacarosa al 40%, SDS al 4% y β -mercaptoetanol al 10%) y el volumen necesario de agua bidestilada para alcanzar los 20 μl . Posteriormente, se pusieron los tubos a calentar en un termobloque a 95 °C durante unos 5 min, transcurridos los cuales se llevó a cabo un “spin” en la centrifuga para asegurar que todo el contenido del tubo se encontrara en el fondo. Finalmente, se cargaron los 20 μl de cada tubo en los distintos pocillos del gel ya polimerizado dentro de una cubeta *MiniPROTEAN Tetra cell* (*Biorad, Hercules, CA, EEUU*) con “running buffer” (Tris 0,25 M, glicina 2 M y SDS al 1%) y se dio comienzo a la electroforesis corriendo a 120 V durante una hora.

Una vez el frente de bandas alcanzó la parte más inferior del gel, se detuvo la electroforesis y se montó el gel y una membrana *Nitrocellulose Blotting Membrane* de 0,45 μm (*GE Healthcare Life Sciences*) entre dos papeles, estos a su vez envueltos en dos estropajos, sobre un soporte que mantuviera el gel completamente pegado a la membrana para llevar a cabo la transferencia de las histonas del gel a la membrana. Instalando el montaje en una cubeta de transferencia se añadió tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina pH=8,3 192 mM y un 20% de metanol puro) y se aplicó un voltaje constante de 120 V a 4 °C durante 1 h aproximadamente.

Finalizada esta fase y una vez separado el gel de la membrana se dejó teñir al primero en azul de Coomassie (1,25 g de Coomassie R-250, 250 ml de metanol, 50 ml de ácido acético y 1200 ml de agua bidestilada), mientras que la membrana se sumergió en tampón de bloqueo

compuesto por BSA, con una concentración dependiente del anticuerpo utilizado posteriormente (0,01 g/ml o 0,05 g/ml), en TBS-Tween (Tris 20 mM, NaCl pH=7,6 137 mM y un 0,1% de Tween 20) o PBS-Tween, según el anticuerpo empleado después, durante 1 h. Este bloqueo sirve para reducir las uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Tras el bloqueo se procedió a la hibridación de los anticuerpos primarios con las histonas. Los anticuerpos utilizados se unían específicamente a: H3K27me3 (1:1000, *Diagenode, Denville, NJ, EEUU*), H3K9ac (1:1000, *Cell Signaling, Danvers, MA, EEUU*), H2AK5ac (1:1000, *Cell Signaling, Danvers, MA, EEUU*), H3 (1:25000, *MerckMillipore, Darmstadt, Alemania*), H2A (1:1000, *Cell Signaling, Danvers, MA, EEUU*) y ubiquitina (*MerckMillipore, Darmstadt, Alemania*). Cada anticuerpo se diluyó, según las indicaciones de las respectivas casas comerciales, en TBS-Tween o PBS-Tween con BSA, dependiendo del tipo de anticuerpo, antes de dejar cada membrana en sus correspondientes disoluciones durante toda la noche a 4 °C en agitación suave.

Al día siguiente se lavó cada membrana con 0,01 g/ml o 0,05 g/ml de BSA en TBS-Tween o PBS-Tween, según el anticuerpo utilizado, para eliminar el exceso de anticuerpo primario que no se hubiera unido a la membrana. A continuación se volvió a incubar las membranas, esta vez con anticuerpo secundario, conjugado con el enzima peroxidasa de rábano, de cabra anti-ratón (1:7500, *Merck KGaA, Darmstadt, Alemania*) o de cabra anti-conejo (1:2500, *Cell Signaling, Danvers, MA, EEUU*) en función del anticuerpo primario empleado, durante 1 h en agitación suave. Tras esta incubación se lavó nuevamente por triplicado cada membrana con los mismos tampones de los lavados precedentes y se procedió a la detección quimioluminiscente de las proteínas. Para ello, se incubó cada membrana con 1 ml de mezcla 1:1 de los reactivos del kit de revelado ECL™ Western Blotting Detection Reagents (*GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, RU*) y tras unos minutos se introdujeron en el escáner densitométrico ImageQuant LAS 4000 (*GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, RU*). Finalmente, los resultados se analizaron mediante el programa de análisis de imágenes *ImageJ*.

3.6. ANÁLISIS DE LA CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS

Para el estudio de la carbonilación en proteínas se llevó a cabo una variante de Western Blot conocida como OxyBlot u Oxy-Western Blot. Una de las diferencias respecto al WB original es la necesidad de derivatizar antes las muestras, para lo cual se emplearon los reactivos del *OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Millipore, Billerica, MA, EEUU)*.

La derivatización de las muestras se realizó mediante la desnaturalización de 5 µl de cada muestra al añadir 5 µl de SDS al 12%. Seguidamente, se añadieron 10 µl de 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) 10 mM en TFA al 10% a cada disolución, menos al control negativo, al cual se añadieron 10 µl de *Derivatization-Control Solution*. Tras esto, se incubaron todas las muestras en oscuridad durante 15 min aproximadamente, con cuidado de no dejar que las reacciones continuaran más tiempo para evitar reacciones secundarias no deseadas. Después se añadieron 7,5 µl de *Neutralization Solution* (Tris 2 M en glicerol al 30%) a cada muestra para neutralizar la reacción y 1 µl de β-mercaptoetanol. A continuación las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% para continuar con el procedimiento clásico de WB sin necesidad de añadir tampón de carga ni de desnaturalizar la muestras en un termobloqueo.

Tras la transferencia la membrana fue bloqueada con BSA al 5% en PBS-Tween durante 1 h. Finalizado el bloqueo, se incubó con anticuerpo anti-DNP (provisto también en el *OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit*) según las indicaciones del fabricante.

3.7. CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA

Para la separación cromatográfica de los extractos de histonas se utilizó un equipo cromatográfico de FPLC (“Fast Protein Liquid Chromatography”) ÄKTA™ pure (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia*), con los siguientes tampones de trabajo:

- Eluyente A (5% de acetonitrilo y 0,1% de TFA).
- Eluyente B (90% de acetonitrilo y 0,1% de TFA).
- Tampón de limpieza (0,1% de TFA).
- Tampón de mantenimiento de la columna (20% de etanol).

Antes de proceder se desgasificaron todos los tampones en un sonicador para evitar daños al equipo y a la columna. Posteriormente, se conectó la columna SOURCE™ 15RPC ST 4.6/100 (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia*) al equipo y se llevó a cabo un lavado de todo el circuito con el tampón de limpieza. Seguidamente se dio comienzo al programa de elución partiendo de una concentración de eluyente B igual a 0, que iría aumentando gradualmente con un flujo constante hasta llegar a una concentración del 100% y se inyectó el volumen correspondiente a un 1 mg de muestra directamente en el “loop”. Las proteínas se mezclan con los tampones correspondientes en un mezclador y, al separarse en la columna según su hidrofobicidad, van pasando por un lector UV que mide la conductividad (concentración de sales), el pH y la absorbancia (concentración de proteínas) y muestra los resultados en forma de picos. Al salir del bloque del lector UV, las proteínas se dividen mediante el colector *Fraction collector F9-R* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia*) acoplado al equipo de FPLC en diferentes fracciones en tubos de 1,5 ml, mientras que las impurezas se vierten por otra salida a un tubo de desechos. Por último, una vez el programa de elución hubo finalizado, se llevó a cabo otro lavado del circuito con tampón de limpieza, para asegurar que no quedara ningún resto de muestra a lo largo del circuito. Cuando el lavado hubo terminado, se inyectó etanol al 20% y se invirtió el flujo para el posterior almacenamiento de la columna. De esta manera, la columna pudo ser almacenada con etanol en su interior evitando la entrada de aire. Tras esto, el flujo se detuvo y se obtuvo el cromatograma con el programa *Unicorn*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. INDUCCIÓN DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN HISTONAS

El objetivo principal de este trabajo es la obtención de histonas modificadas postraduccionalmente, cuyo potencial citotóxico en células endoteliales pueda ser evaluado más adelante. En base a la bibliografía existente, así como en la experiencia previa del laboratorio, se decidió estudiar ubiquitinación, carbonilación, acetilación y metilación de histonas. Para poder inducir estas modificaciones postraduccionales específicas, se seleccionaron los siguientes compuestos:

- El MG 132 para inducir ubiquitinación y carbonilación como resultado de la inhibición del proteasoma.
- La 5-carboxi-8-hidroxiquinolina (IOX1) para inducir metilación gracias a la inhibición de desmetilasas.
- La tricostatina A (TSA) para la inducción de la acetilación vía la inhibición de enzimas con actividad desacetilasa.

En los siguientes subapartados se comentarán en detalle los resultados obtenidos con cada tratamiento.

4.1.1. *Inducción de carbonilación y ubiquitinación con MG 132*

El MG 132 es un inhibidor del proteasoma comúnmente utilizado. Los efectos de este compuesto pueden ser muy distintos según la concentración de uso y el tiempo de incubación; para los experimentos del presente trabajo se tomaron los rangos empleados en otros trabajos (Gao et al., 2013), así como los parámetros previamente utilizados por el propio grupo de laboratorio (García-Giménez et al., 2012). En este último trabajo se definió que la inhibición del proteasoma conducía a una elevación en los niveles de histonas carboniladas. Por lo tanto, se decidió utilizar estos datos para inducir de forma indirecta la carbonilación de las histonas.

Así pues, una vez tratadas las células según las condiciones de cultivo descritas en el apartado “Materiales y métodos”, se extrajeron las histonas y se procedió al análisis de proteínas mediante WB.

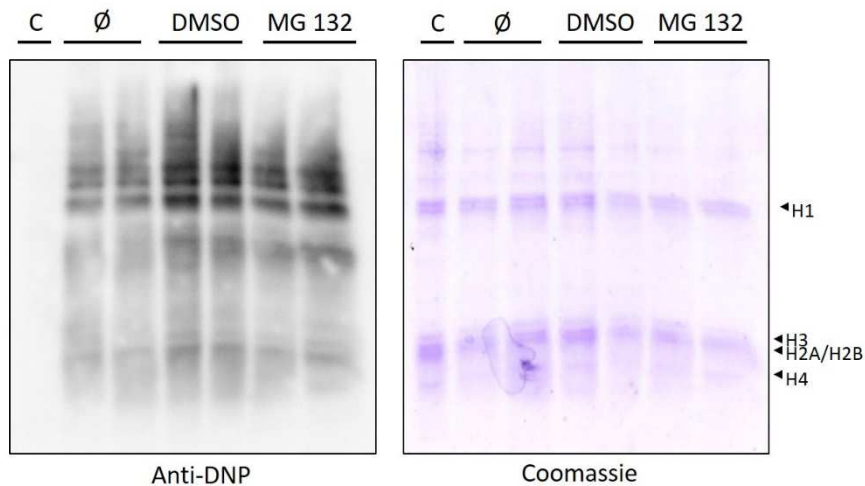


Figura 4. Oxy-Western Blot para la detección de residuos carbonilados. Patrón de la carbonilación de histonas obtenido a partir de extractos de células HeLa derivatizados con DNPH, correspondiendo “C” a un control negativo de la reacción de derivatización, “Ø” a control negativo (extractos derivatizados procedentes de células sin tratar), “DMSO” a extractos de células tratadas con el vehículo DMSO y “MG 132” a extractos de células tratadas con MG 132 (izquierda). Gel teñido con azul de Coomassie de los mismos extractos de histonas una vez realizada la transferencia a la membrana de nitrocelulosa (derecha). Cada condición de cultivo celular se ensayó por duplicado.

Para analizar los niveles de carbonilación se empleó una variante del WB, conocida como OxyBlot u Oxy-Western Blot. Así pues, en la figura 4 puede observarse cómo con una concentración de 1 μM de MG 132 ya existe una diferencia considerable en la intensidad de las bandas con respecto a los controles positivos, lo cual quiere decir que, de acuerdo con la hipótesis de partida, los niveles de carbonilación en las histonas aumentan significativamente en presencia de un inhibidor del proteasoma como es el MG 132. Sin embargo, en la figura también se observa un aumento de la intensidad en las bandas correspondientes al tratamiento con vehículo (DMSO) con respecto a las bandas de los controles negativos; un aumento mayor, si cabe, que el observado en las bandas de las células tratadas con MG 132.

Una explicación plausible para este hecho podría ser que el DMSO por si solo ya produce un aumento de los niveles de carbonilación en las histonas y que, por consiguiente, la intensidad de las bandas relativas al MG 132 es consecuencia del DMSO que hay en la disolución y no del propio compuesto. Se necesitará repetir el experimento y probar diferentes condiciones de cultivo para poder obtener una inducción clara de carbonilación en las histonas, puesto que la fase del ciclo celular resulta crítica para observar un pico de carbonilación en las histonas nucleares, como se describe en García-Giménez et al. (2012).

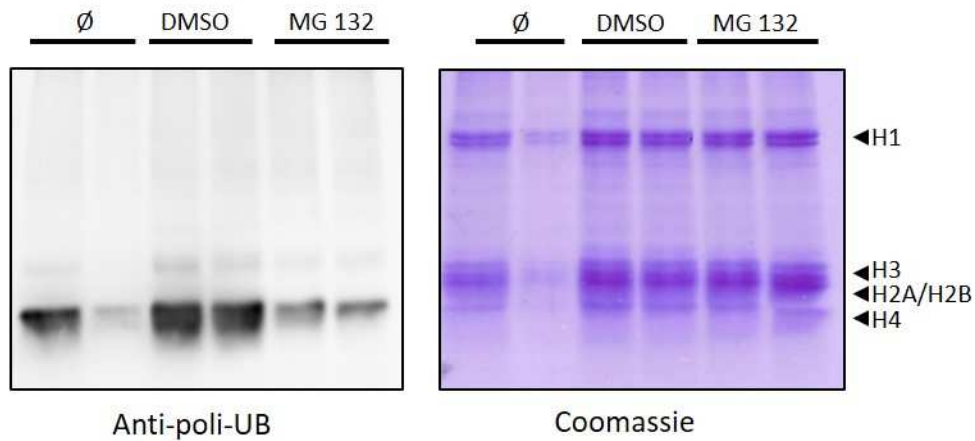


Figura 5. Western Blot para la detección de ubiquitinas y poliubiquitinas. Patrón de la ubiquitinación de histonas obtenido a partir de extractos de células HeLa, “∅” a controles positivos, “DMSO” a extractos de células tratadas con el vehículo DMSO y “MG 132” a extractos de células tratadas con MG 132 (izquierda). Gel teñido con azul de Coomassie de los mismos extractos de histonas una vez realizada la transferencia a la membrana de nitrocelulosa (derecha).

En paralelo, una parte de los mismos extractos se utilizó para realizar un WB contra residuos de poliubiquitina (figura 5). Con la salvedad de las calles correspondientes a la condición control (en una de las cuales, como puede apreciarse por el control de carga que permite la tinción de Coomassie, se cargó mucha menos cantidad de proteína total), los duplicados de cada condición (vehículo y MG 132) son uniformes en cuanto al resultado observado. Las bandas de los extractos de MG 132 son, en este caso, menos intensas que las del único control que permite la comparación. El DMSO, por el contrario, presentó unas bandas ligeramente más intensas que el resto de condiciones ensayadas. Este resultado parece sugerir que el MG 132 no promueve la presencia de ubiquitinas o poliubiquitinas sobre las histonas; además, se observa de nuevo que el DMSO es capaz de estimular la aparición no solo de grupos carbonilo (figura 4) sino de marcas de ubiquitina en histonas (figura 5). No obstante, resulta llamativo que en un WB frente a residuos de ubiquitina se observe un patrón de bandas tan simple, por lo que se decidió realizar un segundo experimento, pero esta vez utilizando un rango de concentraciones de MG 132 que tal vez permitiese observar un patrón de ubiquitinación más complejo: 1 μ M como concentración mínima y 10 μ M como concentración máxima, incubando en todos los casos 4 horas antes de lisar las células. El resultado de este nuevo WB puede verse en la figura 6.

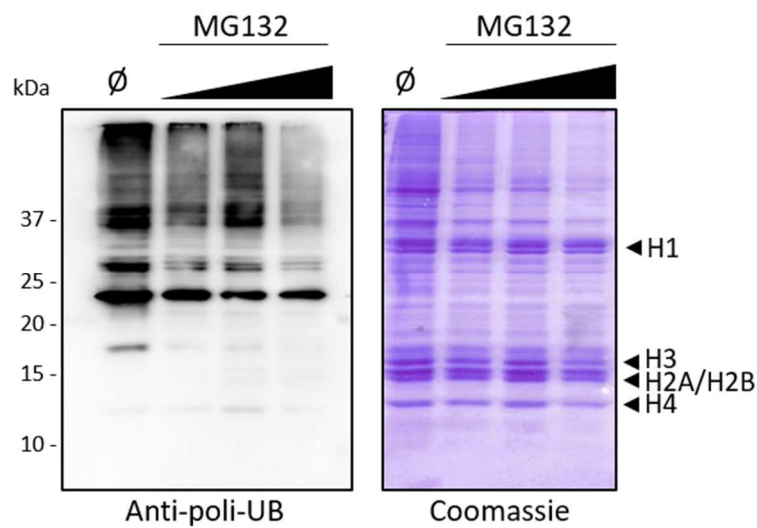


Figura 6. Western Blot para la detección de ubiquitinas y poliubiquitinas. Patrón de la ubiquitinación de histonas obtenido a partir de extractos de células HeLa, correspondiendo “∅” a un control y “MG 132” a extractos de células tratadas con MG 132 con el siguiente gradiente de concentraciones: 1, 2 y 10 μM (izquierda). Gel teñido con azul de Coomassie de los mismos extractos de histonas una vez realizada la transferencia a la membrana de nitrocelulosa (derecha).

De nuevo, se observa la presencia de una señal más fuerte para el control que para las muestras tratadas con MG 132. Además, dado que en este WB se probaron tres concentraciones diferentes, pudo constatar que, a excepción de las bandas correspondientes al tratamiento con 2 μM de inhibidor, la señal sigue un patrón descendente de intensidad a medida que aumenta la concentración. En este caso, y según se puede comprobar gracias a la tinción del gel con Coomassie, la carga de las distintas calles se encuentra más equilibrada, salvo en el caso del control, con lo que la mayor intensidad puede no reflejar una mayor marca de ubiquitinación. En esta ocasión se obtuvo un patrón de bandas más complejo, siendo la más intensa la banda en torno a 20-25 kDa; puesto que la adición de cada molécula de ubiquitina supone un retraso en la migración de las proteínas equivalente a unos 8 kDa, según el tamaño de las diferentes histonas, esta banda podría corresponder bien a una forma parcialmente ubiquitinada de alguna de las histonas más pequeñas, o a una forma monoubiquitinada de histona H1. Para contrastar estas posibilidades se debería realizar experimentos adicionales revelando los extractos contra anticuerpos específicos de histonas. Del mismo modo, harán falta más experimentos para determinar si estas bandas corresponden a histonas ubiquitinadas o a otro tipo de proteínas nucleares que, aun siendo minoritarias, se encuentran presentes en los extractos de histonas obtenidos, como se puede apreciar en los geles teñidos con Coomassie.

Resulta llamativo el hecho de que el uso del MG 132 no aumente, sino más bien reduzca, la ubiquitinación sobre las histonas. Se ha descrito que, en la ubiquitinación inducida por compuestos con níquel, el MG 132 sí que incrementa, vía la inhibición del proteasoma, las marcas de ubiquitina en proteínas celulares; pero que, por el contrario, los niveles de ubiquitina libre y de histonas monoubiquitinadas (al menos de H2A) se ven reducidos (Ke et al., 2008). A pesar de que el estudio se centra en el níquel y que el MG 132 sólo se utiliza complementariamente para intentar esclarecer los mecanismos por los cuales actúan los compuestos níquelados sobre los niveles celulares de ubiquitinación, la explicación propuesta

por los autores para el efecto del MG 132 consiste en que, realmente, los niveles de ubiquitinación en la célula no cambian pero sí la distribución de las ubiquitinas. En otras palabras, bajo la acción del MG 132 las ubiquitinas que se encuentran libres o sobre los residuos de las histonas son transferidas a otras proteínas, aumentando el contenido de ubiquitina en extractos proteicos totales y reduciéndose en extractos de histonas, como ocurre en el caso del presente trabajo. Por otro lado, en el trabajo de Ke et al. (2008) se afirma también que los compuestos de níquel inhiben la actividad de una proteína con actividad desubiquitinasa específica de histonas; por lo tanto, una posibilidad para obtener extractos de histonas ubiquitinadas podría consistir en la utilización de estos compuestos para inducir este tipo de PTMs.

No obstante, tal y como se ha comentado antes, es necesario llevar a cabo más experimentos sobre esta línea con el objeto de dilucidar si el MG 132 es un compuesto idóneo para la inducción de ubiquitinación en histonas y si, realmente, el DMSO tiene la capacidad de inducir carbonilación y/o ubiquitinación, así como la combinación de estas condiciones con la presencia de compuestos de níquel.

4.1.2. Inducción de metilación con IOX1

El ácido 8-hidroxi-5-quinolin-carboxílico o 5-carboxi-8-hidroxiquinolina, (en adelante, IOX1) es un compuesto del cual se ha descrito previamente su actividad como inhibidor de desmetilasas de histonas, concretamente de desmetilasas JmJc (King et al., 2010; Schiller et al., 2014; Thinner et al., 2014). Con el fin de hallar una concentración que se pudiera utilizar en el laboratorio para inducir la metilación de histonas sin provocar muerte celular, se realizó un estudio de citotoxicidad en células HeLa (figura 7) encaminado a la determinación de un valor de LD₅₀. Este valor sirvió para diseñar unas condiciones experimentales no tóxicas para las células.

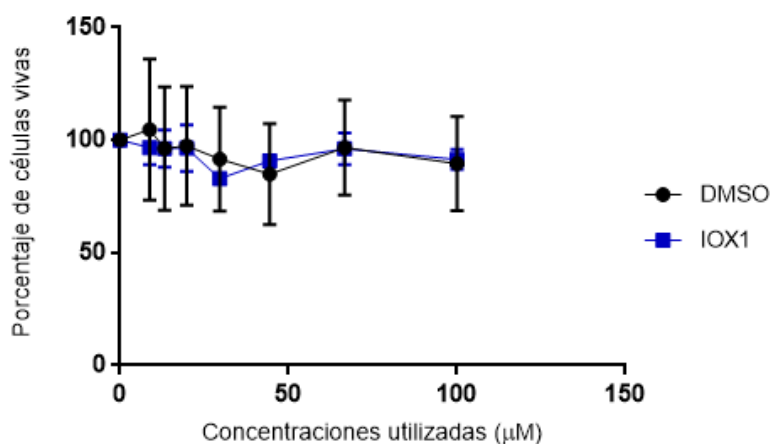


Figura 7. Curva de citotoxicidad del IOX1. Porcentaje de células vivas frente al rango de concentraciones empleado. La línea negra con círculos corresponde a los valores obtenidos con el vehículo DMSO. La línea azul con cuadrados corresponde a los valores obtenidos con IOX1.

Sorprendentemente, no se observó efecto citotóxico alguno del producto sobre las células, incluso a concentraciones que, según la bibliografía, tendrían que resultar parcialmente

letales (Schiller et al., 2014). Podría hipotetizarse que o bien el compuesto no ha funcionado o se halla en mal estado.

A pesar de esto, probó a realizarse un experimento ensayando un rango de concentraciones en base a la bibliografía, y se analizó el patrón de metilación de la histona H3 mediante WB, para descartar la posibilidad de que aun no habiendo inducido la muerte de las células, el IOX1 sí que indujera la metilación de las histonas (figura 8).

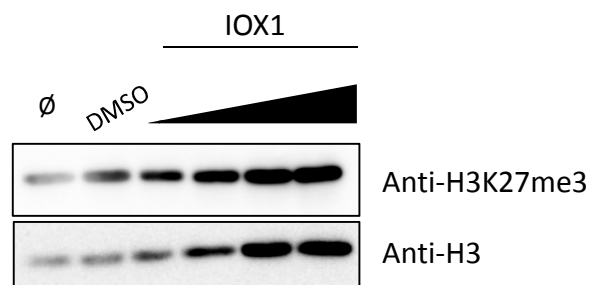


Figura 8. Western Blot para la detección de residuos metilados. Patrón de la metilación de histonas obtenido a partir de extractos de células HeLa, correspondiendo “∅” a un control, “DMSO” a extractos de células tratadas con el vehículo DMSO e “IOX1” a extractos de células tratadas con IOX1 con el siguiente gradiente de concentraciones: 25, 50, 75 y 100 μM .

En el WB puede comprobarse que no hubo alteración en la metilación del residuo K27 de la histona H3, si bien en la imagen parece que sí hay un aumento de señal en las primeras calles con tratamiento, pero éste se debe a diferencias en la carga del gel de poliacrilamida (no mostrado). Paralelamente a los WB anteriores sí que parece darse un incremento de metilación en las muestras tratadas con DMSO, siendo el aumento de señal en la membrana no atribuible a diferencias de carga en este caso, lo cual no hace sino confirmar la necesidad de llevar a cabo más experimentos con DMSO.

4.1.3. Inducción de acetilación con TSA

El TSA es un conocido inhibidor de desacetilasas de histonas (entre otras proteínas). Para estudiar su acción sobre las histonas primero se halló empíricamente su LD_{50} (figura 9), puesto que, según la bibliografía consultada, este compuesto resulta tóxico para las células a partir de cierta concentración (Gan et al., 2008; Ma et al., 2015; Marks, 2010; You and Park, 2013).

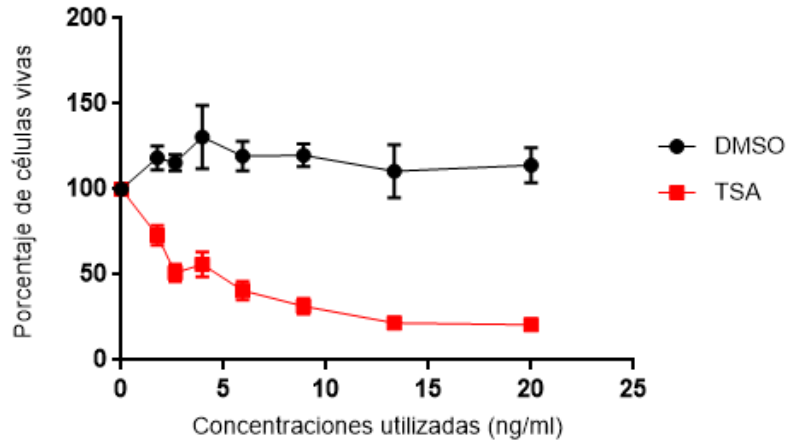


Figura 9. Curva de citotoxicidad del TSA. Porcentaje de células vivas frente al rango de concentraciones empleado. La línea negra con círculos corresponde a los valores obtenidos con el vehículo DMSO. La línea roja con cuadrados corresponde a los valores obtenidos con TSA.

Mediante esta curva de toxicidad se calculó matemáticamente un valor de LD₅₀ de 4,18 ng/ml; por lo tanto, se decidió utilizar una concentración de TSA de 2 ng/ml, valor que se encuentra aproximadamente un 50 % por debajo del umbral de toxicidad, con el fin de inducir altos niveles de acetilación en las histonas, alterando lo menos posible la viabilidad celular. Tras el tratamiento, se extrajeron las histonas de las células y se estudiaron las acetilaciones inducidas mediante WB (figura 10). Concretamente, se estudiaron dos residuos donde puede darse acetilación: la lisina 5 de la histona H2A y la lisina 9 de la histona H3.

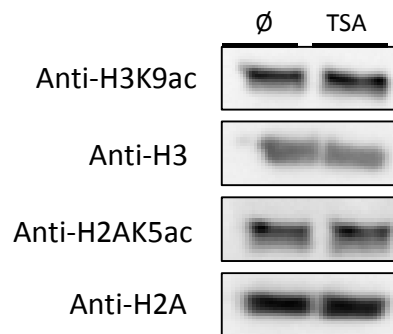


Figura 10. Western Blot para la detección de residuos acetilados. Patrón de la acetilación de las histonas H3 y H2A en los residuos K9 y K5, respectivamente, obtenido a partir de extractos de células HeLa, correspondiendo "∅" a controles y "TSA" a extractos de células tratadas con 2 ng/ml de TSA.

A la luz de estos resultados se puede afirmar que ambas PTMs no se han visto significativamente aumentadas tras el tratamiento con TSA. Al haber utilizado también anticuerpos contra H2A y H3 sin modificaciones, se puede comprobar que el TSA tampoco ha inducido una mayor expresión de H2A y H3 totales en comparación con las muestras control, constituyendo un buen control de carga.

Con el fin de intentar obtener una inducción significativa de las histonas, aun pudiendo afectar a la viabilidad celular, se llevó a cabo otro experimento ensayando concentraciones más altas de TSA. Se trataron los cultivos celulares con un rango de concentraciones entre 20 y 100 ng/ml, a pesar de lo cual la tasa de muerte celular no fue tan elevada como para no permitir la obtención de extractos de histonas para ser analizados. A partir de dichos extractos se realizó

un WB y en este caso sí que puede apreciarse un incremento gradual de la intensidad de las bandas de las membranas incubadas con anticuerpos contra histonas acetiladas, proporcional a la concentración de TSA, tanto en aquellas con anti-H3K9ac como con anti-H2AK5ac, si bien este último en menor medida (figura 11). Respecto a las bandas con anticuerpos contra histonas totales (anti-H3 y anti-H2A) no hay cambios apreciables, por lo que se deduce que los niveles de estas histonas no se vieron afectados por el TSA y por tanto puede concluirse que el aumento de intensidad de las bandas correspondientes a residuos acetilados es debido al efecto del TSA.

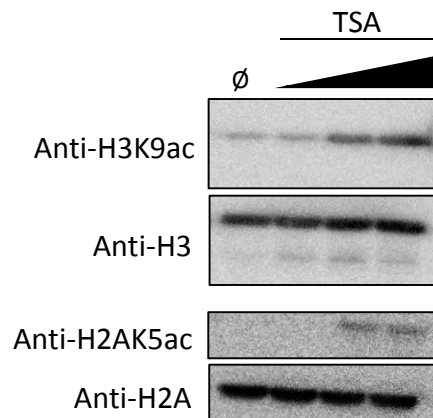


Figura 11. Western Blot para la detección de residuos acetilados. Patrón de la acetilación de las histonas H3 y H2A en los residuos K9 y K5, respectivamente, obtenido a partir de extractos de células HeLa, correspondiendo “∅” a un control y “TSA” a extractos de células tratadas con TSA con el siguiente gradiente de concentraciones: 20, 50 y 100 ng/ml.

A pesar de que, en este caso, se trabajó con valores de concentración muy superiores a los sugeridos por el ensayo de toxicidad, el hecho de haber obtenido inducción de la acetilación en dos histonas diferentes apunta a que podría obtenerse, de escalar lo suficiente el proceso, una cantidad suficiente de extracto de histonas hiperacetiladas como para utilizarlo en un proceso de purificación que permita su aislamiento.

4.2. PURIFICACIÓN DE HISTONAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA

En paralelo a la inducción de las PTMs específicas en histonas, se diseñó un protocolo de purificación utilizando la técnica de cromatografía de fase reversa. Dado que las histonas presentan un tamaño molecular y unas propiedades bioquímicas muy similares, esta técnica se presenta como una opción adecuada para separar los distintos tipos en función de las diferencias en el carácter hidrofóbico de sus dominios globulares. Para ello, se cultivaron células HeLa sin inducir, a mayor escala que en los experimentos descritos anteriormente, con vistas a obtener extractos de histonas lo suficientemente concentrados como para separar sus componentes cromatográficamente. Obtenidos estos extractos, se cargó un volumen correspondiente a 1 mg de extracto total de histonas en un equipo de FPLC equipado con una columna de fase reversa, para eluir con un gradiente de acetonitrilo (incrementando la proporción de tampón B), según el protocolo detallado en el apartado “Materiales y métodos”.

En la figura 12A se muestra el cromatograma obtenido, en el cual se observa que la mayoría de proteínas se eluyen de la columna en el tramo incluido entre el 40% y el 60%,

aproximadamente, de tampón B. Tras la elución, se recogieron las proteínas en diferentes fracciones (tubos de 1,5 ml) y se cargaron geles para evaluar el contenido total en proteínas mediante tinción de Coomassie (no mostrado). Se seleccionaron las fracciones que contenían bandas con tamaño correspondiente a las histonas (coincidentes con algunos de los picos discretos observados en el recuadro de la figura 12A; fracciones 25-30), y tras concentrarlas se cargó un nuevo gel que permitiese comparar la cantidad de proteína obtenida en cada fracción una vez normalizada la carga (figura 12B). La tinción con Coomassie permite constatar que las bandas de mayor intensidad, separadas en fracciones independientes, corresponden al tamaño de las histonas al compararlas con una muestra proveniente del extracto total antes de su paso por la columna. A continuación, se analizó mediante WB la identidad de dichas bandas (figura 12C).

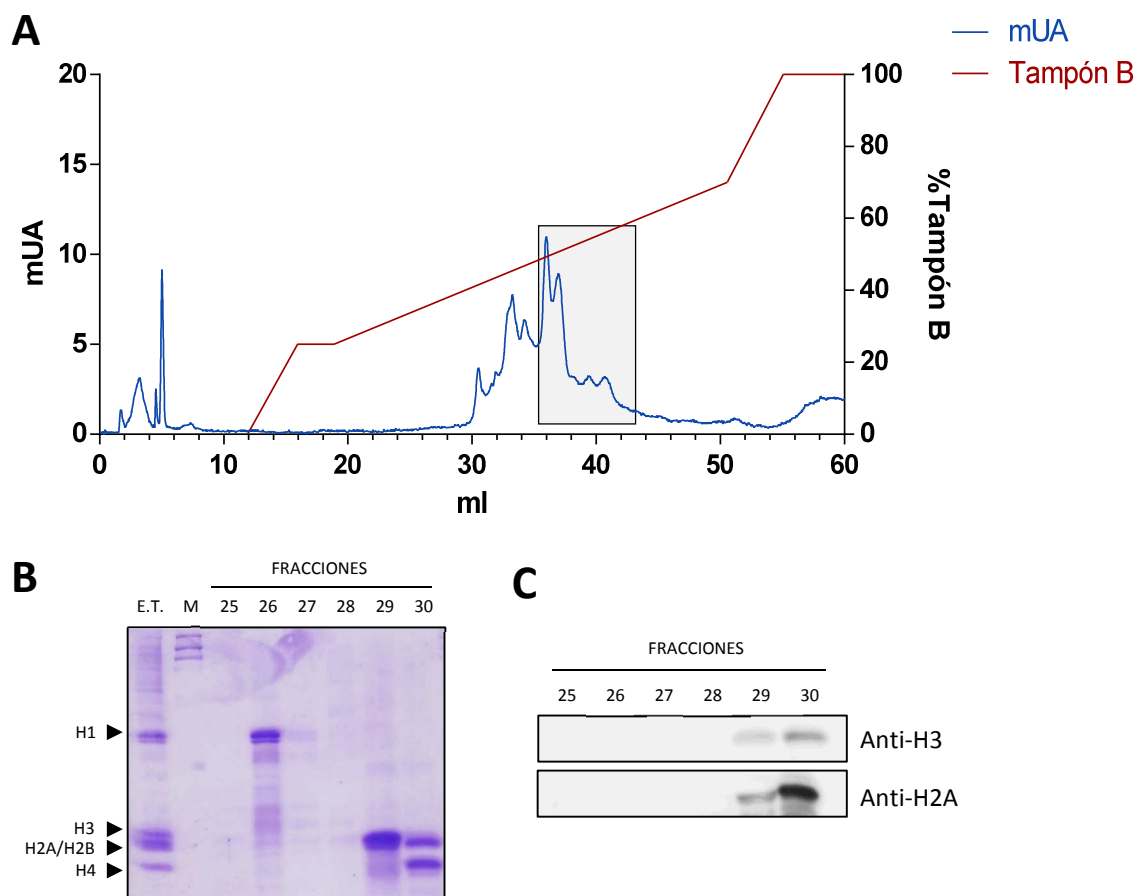


Figura 12. Purificación de histonas mediante FPLC. Cromatograma del extracto de histonas introducido en el FPLC (A). Gel teñido con azul de Coomassie del mismo extracto de histonas una vez realizada la transferencia del WB a la membrana de nitrocelulosa (B). Análisis mediante WB de histonas H3 y H2A en distintas fracciones del extracto de histonas (C).

En la incubación de la membrana (dividida para poder usar dos anticuerpos diferentes a la vez) se emplearon anticuerpos contra H3 y H2A. Sin embargo, a pesar de que tanto para H3 como para H2A hay detección (calles 29 y 30), las bandas aparecen en las dos calles indistintamente, detectándose H3 y H2A al mismo tiempo en las dos fracciones. Es posible que la aparición de señal en ambas calles se deba más bien a una reacción cruzada de los anticuerpos con las histonas, cosa relativamente frecuente. De la misma manera, en la figura 12A, la tinción de Coomassie sugiere que más que una reacción cruzada de los anticuerpos, las diferentes

histonas no llegaron a separarse adecuadamente en la cromatografía, obteniendo las mismas histonas en fracciones diferentes. Por lo tanto, aunque la técnica se muestra adecuada para la separación de histonas, se requiere una modificación del gradiente y en general del protocolo de purificación para asegurar la correcta separación de los diferentes tipos de histonas, especialmente de la H2A, la H3 y la H4. Además, se deberán realizar WB contra una batería de anticuerpos más amplia para asegurar la identidad de todas las bandas aparecidas.

4.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En conjunto, los experimentos realizados para cada uno de los objetivos planteados en el presente trabajo constituyen un buen punto de partida para la elaboración de un protocolo de aislamiento de histonas con modificaciones postraduccionales específicas. Como se ha comentado en los apartados anteriores, la inducción de modificaciones concretas como la ubiquitinación, carbonilación o metilación requiere estudios en mayor profundidad. Una de las cuestiones a dilucidar, de gran interés, sería determinar el grado de influencia de la presencia de DMSO en las condiciones de cultivo ensayadas, puesto que parece influir de forma inespecífica en la aparición de formas de histonas modificadas, especialmente en el caso de las ubiquitinaciones y carbonilaciones.

Si bien no se ha conseguido una clara inducción de muchas de las PTMs estudiadas, en el caso de los experimentos con TSA se han hallado unas condiciones que permiten observar un incremento en la marca de acetilación de las histonas H2A y H3. Dado que también se ha puesto a punto un protocolo de purificación que permite obtener fracciones enriquecidas con dichas histonas, el siguiente paso sería la combinación de ambas estrategias para, finalmente, obtener una fracción con H3 y H2A acetiladas que permita ser comparada frente a fracciones de histonas en condiciones control. La utilización de estas fracciones purificadas en ensayos de citotoxicidad frente a células endoteliales – estrategia que se desarrolla en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo de Investigación en Células Endoteliales del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología (UV) – aportaría datos muy relevantes acerca de la posible función de las PTMs en los mecanismos fisiopatológicos relacionados con la presencia de histonas circulantes.

5. CONCLUSIONES

1. La inhibición del proteasoma con MG 132 en cultivos de células HeLa no es suficiente para inducir un incremento en los niveles de carbonilación ni ubiquitinación en histonas.
2. El tratamiento de células HeLa con IOX1, incluso en concentraciones superiores a la LD₅₀, no permite inducir la trimetilación de la histona H3 en el residuo K27.
3. El tratamiento con TSA sólo es capaz de inducir la acetilación de los residuos K9 y K5 de las histonas H3 y H2A, respectivamente, cuando se utiliza en concentraciones superiores a la LD₅₀ calculada experimentalmente.
4. Mediante un protocolo de cromatografía en fase reversa es posible separar la histona H1 de las histonas H2, H3 y H4, así como obtener una fracción mayoritaria de H3 y otra de H2A/H2B y H4.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bach, S.V., Hegde, A.N., 2016. The proteasome and epigenetics: zooming in on histone modifications. *Biomol. Concepts* 7, 215–227. doi:10.1515/bmc-2016-0016
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395. doi:10.1038/cr.2011.22
- Brandl, A., Heinzl, T., Krämer, O.H., 2009. Histone deacetylases: salesmen and customers in the post-translational modification market. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 101, 193–205. doi:10.1042/BC20080158
- Chen, R., Kang, R., Fan, X.-G., Tang, D., 2014. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis.* 5, e1370. doi:10.1038/cddis.2014.337
- de Ruijter, A.J.M., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B.P., 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737–749. doi:10.1042/BJ20021321
- Deans, C., Maggert, K.A., 2015. What do you mean, “epigenetic”? *Genetics* 199, 887–896. doi:10.1534/genetics.114.173492
- Dupont, C., Armant, D.R., Brenner, C.A., 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin. Reprod. Med.* 27, 351–357. doi:10.1055/s-0029-1237423
- Dwivedi, N., Neeli, I., Schall, N., Wan, H., Desiderio, D.M., Csernok, E., Thompson, P.R., Dali, H., Briand, J.-P., Muller, S., Radic, M., 2014. Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 2840–2851. doi:10.1096/fj.13-247254
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457–463. doi:10.1038/nature02625
- Ekaney, M.L., Otto, G.P., Sosdorf, M., Sponholz, C., Boehringer, M., Loesche, W., Rittirsch, D., Wilharm, A., Kurzai, O., Bauer, M., Claus, R.A., 2014. Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Crit. Care Lond. Engl.* 18, 543. doi:10.1186/s13054-014-0543-8
- Gan, Y., Wang, J., Coselli, J., Wang, X.L., 2008. Synergistic induction of apoptosis by HMG-CoA reductase inhibitor and histone deacetylases inhibitor in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 386–392. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.002
- Gao, C., Chen, G., Liu, L., Li, X., He, J., Jiang, L., Zhu, J., Xu, Y., 2013. Impact of high glucose and proteasome inhibitor MG132 on histone H2A and H2B ubiquitination in rat glomerular mesangial cells. *J. Diabetes Res.* 2013, 589474. doi:10.1155/2013/589474
- García-Giménez, J.L., 2015. *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. Academic Press.
- García-Giménez, J.L., Ledesma, A.M.V., Esmoris, I., Romá-Mateo, C., Sanz, P., Viña, J., Pallardó, F.V., 2012. Histone carbonylation occurs in proliferating cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1453–1464. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.022
- García-Giménez, J.L., Òlaso, G., Hake, S.B., Bönisch, C., Wiedemann, S.M., Markovic, J., Dasí, F., Gimeno, A., Pérez-Quilis, C., Palacios, O., Capdevila, M., Viña, J., Pallardó, F.V., 2013. Histone h3 glutathionylation in proliferating mammalian cells destabilizes nucleosomal structure. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1305–1320. doi:10.1089/ars.2012.5021

- Gould, T.J., Lysov, Z., Liaw, P.C., 2015. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J. Thromb. Haemost. JTH* 13 Suppl 1, S82-91. doi:10.1111/jth.12977
- Huang, B., Jiang, C., Zhang, R., 2014. Epigenetics: the language of the cell? *Epigenomics* 6, 73–88. doi:10.2217/epi.13.72
- Hyun, B.-R., McElwee, J.L., Soloway, P.D., 2015. Single molecule and single cell epigenomics. *Methods San Diego Calif* 72, 41–50. doi:10.1016/j.ymeth.2014.08.015
- Iba, T., Hashiguchi, N., Nagaoka, I., Tabe, Y., Kadota, K., Sato, K., 2015. Heparins attenuated histone-mediated cytotoxicity in vitro and improved the survival in a rat model of histone-induced organ dysfunction. *Intensive Care Med. Exp.* 3, 36. doi:10.1186/s40635-015-0072-z
- Imhof, A., 2006. Epigenetic regulators and histone modification. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 5, 222–227. doi:10.1093/bfgp/ell030
- Kawano, H., Ito, T., Yamada, S., Hashiguchi, T., Maruyama, I., Hisatomi, T., Nakamura, M., Sakamoto, T., 2014. Toxic effects of extracellular histones and their neutralization by vitreous in retinal detachment. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 94, 569–585. doi:10.1038/labinvest.2014.46
- Ke, Q., Ellen, T.P., Costa, M., 2008. Nickel compounds induce histone ubiquitination by inhibiting histone deubiquitinating enzyme activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 190–199. doi:10.1016/j.taap.2007.12.015
- Kim, J.K., Samaranayake, M., Pradhan, S., 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 596–612. doi:10.1007/s00018-008-8432-4
- Kimura, H., 2013. Histone modifications for human epigenome analysis. *J. Hum. Genet.* 58, 439–445. doi:10.1038/jhg.2013.66
- Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Stasevich, T.J., Sato, Y., 2015. Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. *Histochem. Cell Biol.* 144, 101–109. doi:10.1007/s00418-015-1344-0
- King, O.N.F., Li, X.S., Sakurai, M., Kawamura, A., Rose, N.R., Ng, S.S., Quinn, A.M., Rai, G., Mott, B.T., Beswick, P., Klose, R.J., Oppermann, U., Jadhav, A., Heightman, T.D., Maloney, D.J., Schofield, C.J., Simeonov, A., 2010. Quantitative high-throughput screening identifies 8-hydroxyquinolines as cell-active histone demethylase inhibitors. *PLoS One* 5, e15535. doi:10.1371/journal.pone.0015535
- Kolaczowska, E., Jenne, C.N., Surewaard, B.G.J., Thanabalasuriar, A., Lee, W.-Y., Sanz, M.-J., Mowen, K., Opdenakker, G., Kubes, P., 2015. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat. Commun.* 6, 6673. doi:10.1038/ncomms7673
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
- Leshner, M., Wang, S., Lewis, C., Zheng, H., Chen, X.A., Santy, L., Wang, Y., 2012. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol.* 3, 307. doi:10.3389/fimmu.2012.00307
- Ma, J., Guo, X., Zhang, S., Liu, H., Lu, J., Dong, Z., Liu, K., Ming, L., 2015. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and promotes apoptosis of esophageal squamous cell lines. *Mol. Med. Rep.* 11, 4525–4531. doi:10.3892/mmr.2015.3268

- Majnik, A.V., Lane, R.H., 2014. Epigenetics: where environment, society and genetics meet. *Epigenomics* 6, 1–4. doi:10.2217/epi.13.83
- Marks, P.A., 2010. Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 717–725. doi:10.1016/j.bbagr.2010.05.008
- Pieterse, E., Hofstra, J., Berden, J., Herrmann, M., Dieker, J., van der Vlag, J., 2015. Acetylated histones contribute to the immunostimulatory potential of neutrophil extracellular traps in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 179, 68–74. doi:10.1111/cei.12359
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M.A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S.P., Lohmeyer, J., Preissner, K.T., 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PloS One* 7, e32366. doi:10.1371/journal.pone.0032366
- Schiller, R., Scozzafava, G., Tumber, A., Wickens, J.R., Bush, J.T., Rai, G., Lejeune, C., Choi, H., Yeh, T.-L., Chan, M.C., Mott, B.T., McCullagh, J.S.O., Maloney, D.J., Schofield, C.J., Kawamura, A., 2014. A cell-permeable ester derivative of the JmJc histone demethylase inhibitor IOX1. *ChemMedChem* 9, 566–571. doi:10.1002/cmdc.201300428
- Siggens, L., Ekwall, K., 2014. Epigenetics, chromatin and genome organization: recent advances from the ENCODE project. *J. Intern. Med.* 276, 201–214. doi:10.1111/joim.12231
- Song, Y., Wu, F., Wu, J., 2016. Targeting histone methylation for cancer therapy: enzymes, inhibitors, biological activity and perspectives. *J. Hematol. Oncol.* 9, 49. doi:10.1186/s13045-016-0279-9
- Tammen, S.A., Friso, S., Choi, S.-W., 2013. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol. Aspects Med.* 34, 753–764. doi:10.1016/j.mam.2012.07.018
- Thinnes, C.C., England, K.S., Kawamura, A., Chowdhury, R., Schofield, C.J., Hopkinson, R.J., 2014. Targeting histone lysine demethylases — Progress, challenges, and the future. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 1416–1432. doi:10.1016/j.bbagr.2014.05.009
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., Allis, C.D., Coonrod, S.A., 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184, 205–213. doi:10.1083/jcb.200806072
- Wildhagen, K.C.A.A., García de Frutos, P., Reutelingsperger, C.P., Schrijver, R., Aresté, C., Ortega-Gómez, A., Deckers, N.M., Hemker, H.C., Soehnlein, O., Nicolaes, G.A.F., 2014. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood* 123, 1098–1101. doi:10.1182/blood-2013-07-514984
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C.T., Semeraro, F., Taylor, F.B., Esmon, N.L., Lupu, F., Esmon, C.T., 2009. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* 15, 1318–1321. doi:10.1038/nm.2053
- Xu, W.S., Parmigiani, R.B., Marks, P.A., 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26, 5541–5552. doi:10.1038/sj.onc.1210620
- Xu, Z., Huang, Y., Mao, P., Zhang, J., Li, Y., 2015. Sepsis and ARDS: The Dark Side of Histones. *Mediators Inflamm.* 2015, 205054. doi:10.1155/2015/205054

You, B.R., Park, W.H., 2013. Trichostatin A induces apoptotic cell death of HeLa cells in a Bcl-2 and oxidative stress-dependent manner. *Int. J. Oncol.* 42, 359–366.
doi:10.3892/ijo.2012.1705