



**Fundació**  
La Marató de TV3  
XVI SIMPOSIUM  
Enfermedades minoritarias

## Caracterización integral de los defectos subyacentes de metilación del DNA asociados a todos los síndromes de la impronta genómica causados por epimutaciones

**Dr. David Monk**

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

**Dr. Pablo D. Lapunzina Badia**

Fundación para la Investigación Biomédica.

Hospital Universitario La Paz. Madrid





## 1. Resumen del proyecto

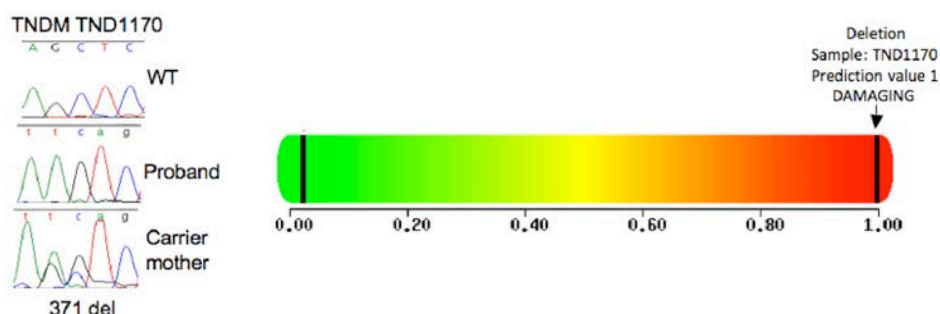
La metilación del DNA es esencial para la regulación de la expresión alélica de los genes bajo control de la impronta genómica (genes improntados). Estos genes son el ejemplo clásico de la memoria epigenética de origen parental a largo plazo, ya que se mantiene durante toda la vida (FERGUSON-SMITH, 2011). La metilación en estas regiones diferencialmente metiladas (RDM) se origina a partir de los respectivos gametos coordinando esta expresión de origen parental (SMALLWOOD *et al.*, 2011). Estas RDM derivadas de la línea germinal conservan la metilación en uno de los dos alelos (el materno o el paterno), resultando en una copia alélica completamente metilada y la otra desmetilada. En el ser humano, numerosos síndromes complejos (que incluyen diabetes mellitus neonatal transitoria [DMNT], síndrome de Beckwith-Wiedemann [SBW], síndrome de Silver-Russell [SSR] y pseudohipoparatiroidismo [PHP1B]) se asocian a pérdida de impronta genómica (LOI, por su sigla en inglés) en *loci* específicos (revisado en EGGERMANN *et al.*, 2015). Durante la última década se han incrementado las evidencias de que la LOI no es sólo un acontecimiento aislado que sucede en un locus asociado a una enfermedad, sino que los pacientes con trastornos asociados con la impronta genómica (ID, por su sigla en inglés) pueden tener defectos de impronta en múltiples *loci* que afecten a RDM improntadas adicionales, influyendo en el fenotipo resultante. Hasta hoy, solo las mutaciones en el factor de transactivación ZFP57 se han asociado a casos de DMNT con defectos de impronta genómica en múltiples *loci* (MACKAY *et al.*, 2008). El presente proyecto tiene como objetivo la caracterización completa de las aberraciones de metilación en los ID con causa epigenética subyacente y la identificación de las proteínas implicadas en este mecanismo.

## 2. Resultados

### 1) Elaboración de perfiles de metilación de las RDM improntadas para caracterizar defectos de metilación en múltiples *loci*

Mediante el uso inicialmente de *arrays* de metilación Goldengate diseñados a medida y posteriormente, *arrays* comerciales Infinium HumanMethylation450 Beadchip de Illumina, hemos caracterizado los perfiles de metilación de todas las RDM improntadas conocidas en una gran cohorte de pacientes de España con DMNT, SBW, SSR y PHP1B. Estos análisis revelaron que en estos individuos se producen comúnmente defectos de metilación en múltiples *loci*, lo que sugiere una falta de mantenimiento de la metilación alélica durante la reprogramación epigenética embrionaria (NAKABAYASHI *et al.*, 2011; COURT *et al.*, 2013). La pirosecuenciación de elementos repetitivos (LINE, SINE y ALU-Yb8) mostró perfiles de metilación normal, sugiriendo que los defectos epigenéticos se encuentran restringidos a los *loci* improntados (COURT *et al.*, 2013).

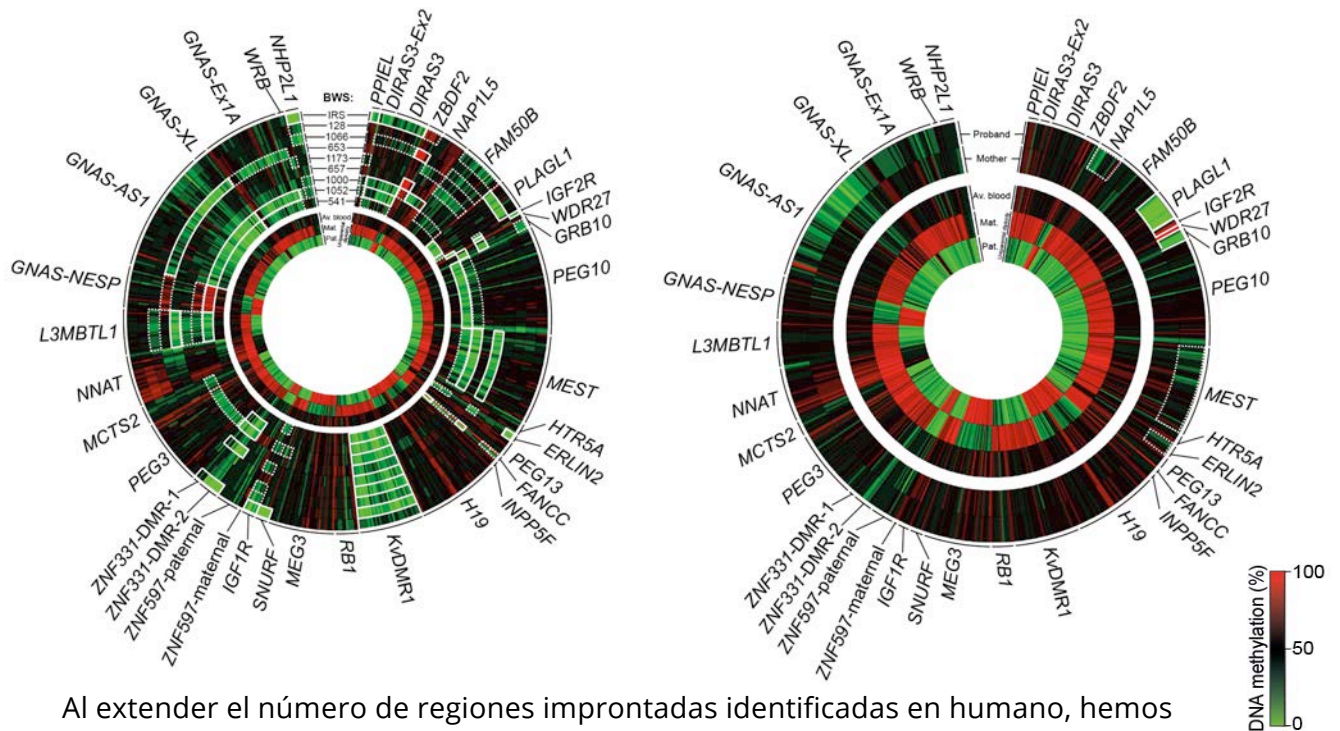
Un cribado mutacional de *ZFP57*, *NLRP2*, *NLRP7* y *KHDC3L* reveló un solo cambio causal, una delección de 1 pb en *ZFP57*, en un paciente de DMNT con defectos de impronta genómica en múltiples *loci*. Se ha secuenciado el exoma de todos los casos con información parental (trios) asociados a defectos en la impronta genómica en múltiples *loci* para identificar posibles mutaciones causales. En la actualidad estamos realizando modelos bioinformáticos de efectos *de novo*, recesivos o maternos sobre la herencia.



**Figura 1.** Mutaciones en *ZFP57* en pacientes de DMNT

## **2) Identificación de nuevos *loci* improntados mediante un cribado mutacional de todo el genoma**

Durante el transcurso de este proyecto hemos identificado un paciente de SBW con diploidía uniparental paterna (todos los cromosomas son de origen paterno en mosaico) (ROMANELLI *et al.*, 2011). Como resultado de nuestro caso publicado, se han descrito cinco pacientes adicionales con características cromosómicas similares mencionando nuestros laboratorios. Combinándolo con muestras de diploidía uniparental materna de pacientes con SSR (fenotipo opuesto a SBW) (YAMAZAWA *et al.*, 2010) realizamos un cribado de metilación para todo el genoma mediante el *array* Infinium HumanMethylation450 Beadchip de Illumina y methyl-seq (secuenciación de todo el genoma convertido con bisulfito). La alta densidad de las sondas del *array* que mapean sobre las islas CpG permite un mapeado preciso de la metilación alélica de las RDM improntadas, y además da una oportunidad única para identificar nuevos *loci* improntados. Como resultado, identificamos 8 RDM con dominios de impronta genómica conocidos y 7 nuevos *loci* improntados: *PPIEL*, *WDR27*, *HTR5A*, *ERLIN2*, *TRAPPC9* (también conocido como *PEG13*), *WRB* y *NHP2L1*. Mediante un enfoque similar se compararon muestras de placenta de embarazos llevados a término con molas hidatiformes y se identificaron 15 dominios de metilación materna específicos de placenta no presentes en tejidos somático (COURT *et al.*, 2014).

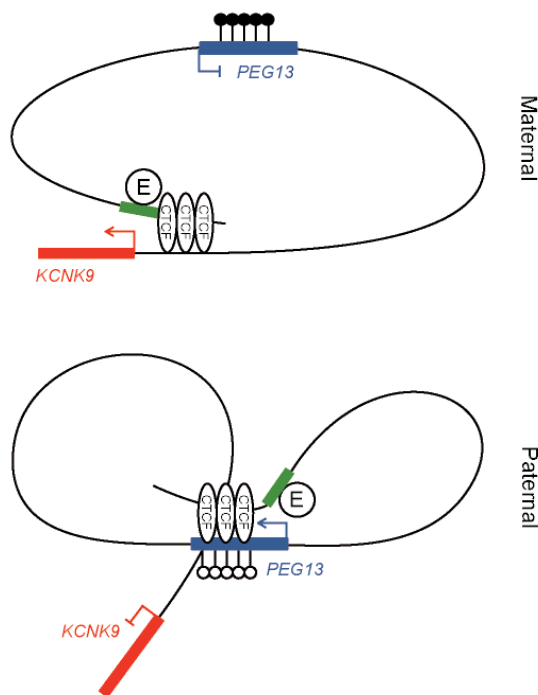


Al extender el número de regiones improntadas identificadas en humano, hemos identificado *loci* que comúnmente se encuentran sujetos a hipometilación en pacientes de SBW, SSR y DMNT con defectos de metilación en múltiples *loci*. Estos resultados han sido confirmados recientemente por Docherty y sus colaboradores en el Reino Unido basándose en una cohorte donde observaron que los genes *WRB* y *NHP2L1* se encuentran frecuentemente afectados en estos pacientes. Nuestra aproximación de todo el genoma también confirmó la pérdida de metilación asociada a mutaciones recesivas en *ZFP57* con defectos de metilación en solo un subconjunto de RDM (*PLAGL1*, *GRB10* e invariabilidad en *PEG3*, *NAP1L5*, *GNAS* y *NHP2L1*) (MACKAY *et al.*, 2008; COURT *et al.*, 2013; DOCHERTY *et al.*, 2014).

**Figura 2. Heatmap circular de la caracterización del “improntoma” humano en pacientes de SBW y DMNT con mutaciones en ZFP57.** Las regiones gravemente hipometiladas se encuentran destacadas en cajas blancas y las parcialmente afectadas en cajas con líneas discontinuas.

### 3) Caracterización de las interacciones de la cromatina específicas de cerebro y la impronta genómica dentro del locus 8q24 asociado a discapacidad intelectual

Una de las nuevas regiones maternalmente metiladas, *TRAPPC9/PEG13* coincide en parte con un locus implicado en retraso en el desarrollo (tanto autismo como discapacidad intelectual). Por este motivo realizamos una extensa caracterización epigenética de este dominio. Observamos que la RDM de metilación materna *PEG13* une cohesinas-CTCF y posee potenciadores de actividad bloqueadora, por lo que hipotetizamos que dicta un bucle de cromatina mutuamente excluyente entre una región potenciadora nueva y los promotores de los transcritos recíprocamente improntados *PEG13* y *KCNK9* (COURT *et al.*, 2014). Realizamos un seguimiento de estos experimentos mecánicos con un cribado mutacional en una gran cohorte de pacientes con discapacidad intelectual idiopática, pero no identificamos ningún cambio patológico (SÁNCHEZ-DELGADO *et al.*, 2014).



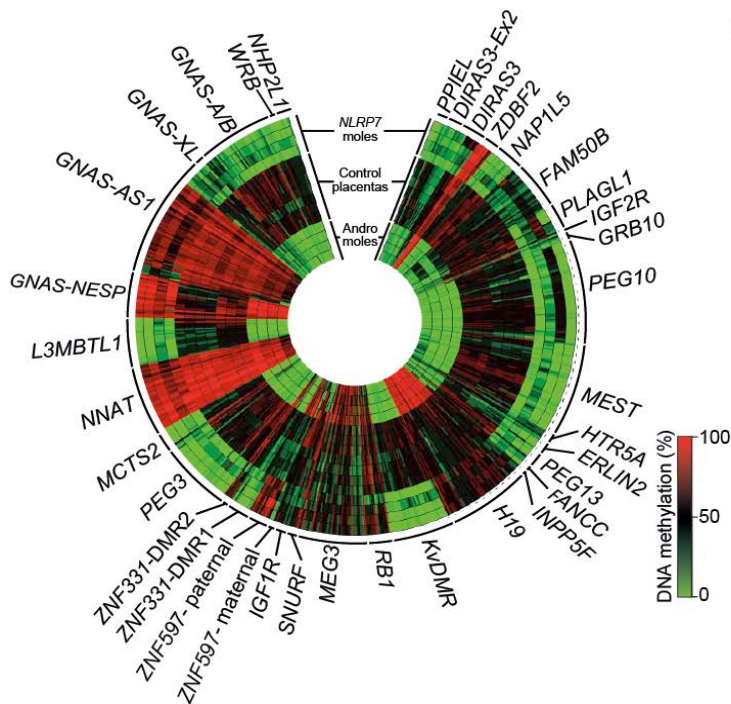
**Figura 3.** El bucle de cromatina en el locus *PEG13* entre el gen maternalmente expresado *KCNK9* y el potenciador específico de cerebro a 58-500kb aguas arriba.

#### **4) Ausencia de metilación materna en molas hidatiformes biparentales con mutaciones de efecto materno en *NLRP7***

Las molas hidatiformes recurrentes (MHR) familiares son trastornos recesivos

autosómicos de efecto materno asociados a mutaciones en el gen *NLRP7* (JUDSON *et al.*, 2002; MURDOCH *et al.*, 2006). Se caracterizan por ser MH con una proliferación excesiva del trofoblasto que imita la apariencia de las concepciones molares de origen androgenético a pesar de su origen biparental diploide. Se ha propuesto que los fenotipos de los dos tipos de mola se encuentran asociados a impronta genómica aberrante. Para caracterizar el grado de afectación asociado a impronta genómica en muestras de MHR, analizamos el perfil de metilación de todo el genoma de MH espontáneas, tanto de origen androgenético como biparental (con defecto en *NLRP7*) mediante *arrays* Infinium HumanMethylation450 Beadchip de Illumina. Hemos observado una total paternalización de todas las RDM, tanto ubicuas como específicas de placenta en cuatro molas androgenéticas; es decir, ganancia de metilación en los *loci* paternalmente metilados y ausencia de metilación en los maternalmente metilados, mientras que los defectos de metilación observados en cuatro biopsias de MHR de pacientes con *NLRP7* defectuoso se encuentran restringidos a la pérdida de metilación en las RDM maternas. Sorprendentemente, MHR de dos hermanas con la misma mutación de cambio de sentido mostraban diferencias sutiles, con algunas RDM que mantenían metilación alélica, lo que sugiere variaciones interindividuales. Estos epigenotipos son consistentes con el hecho que *NLRP7* es un gen de efecto materno y que participa en la adquisición de impronta genómica en el ovocito. Además, mediante cribados bioinformáticos de los datos de metilación resultantes, se identificaron más de sesenta *loci* con un perfil de metilación consistentes con impronta genómica en placenta. De estos *loci*, hemos confirmado 20 como nuevos *loci* de metilación materna. Estas observaciones sugieren que el fenotipo molar es debido a una impronta genómica específica de placenta defectuosa y una sobreexpresión de los transcritos de expresión paterna, señalando que el efecto materno de las mutaciones en *NLRP7* se asocia a la forma más grave de defectos en múltiples *loci* en humano.





**Figura 4.** Heatmap circular que revela los perfiles de metilación de las RDM improntadas de manera ubicua en muestras de MHR.

#### 4. Implicaciones

La descripción de los defectos de impronta genómica en múltiples *loci* en todo el genoma ha permitido realizar un listado de los *loci* más comúnmente afectados para cada uno de los trastornos relacionados con la impronta genómica. En algunos casos, la hipometilación de genes con implicación conocida en diabetes (*PLAGL1*) y cáncer (*IGF-2* y *RB1*) sugiere que los individuos con estos *loci* afectados deberían estar sujetos a exámenes clínicos frecuentes para detectar la aparición temprana de esta comorbilidad. Nuestros resultados han aumentado la lista de *loci* conocidos bajo control de la impronta genómica en el ser humano, muchos de los cuales muestran metilación anormal en los pacientes con defectos de impronta genómica en múltiples *loci*. Como resultado directo de nuestro trabajo la European COST-action for Congenital Imprinting Disorders (<http://www.imprinting-disorders.eu>) ha recomendado una lista de *loci* que se deben analizar para la búsqueda de anomalías de metilación, incluyendo *PPIEL*, *WRB* y *NHP2L1*, tres de los nuevos *loci* improntados identificados en este proyecto. En la actualidad, estos nuevos *loci* improntados son utilizados de forma rutinaria por los laboratorios de

diagnosis de ID y están en estado de aprobación para formar parte de la regulada Locus Reference Genomic (LGR).

Nuestro trabajo ha mostrado que las mutaciones de efecto materno en *NLRP7* resultan en una hipometilación catastrófica de RDM improntadas de metilación materna en molas hidatiformes recurrentes de casos familiares. Como resultado directo de nuestro trabajo, varios laboratorios están determinando la metilación de las RDM improntadas para diferenciar entre molas androgenéticas esporádicas y las MHR, ya que ambas son histológicamente similares, pero requieren una gestión y asesoramiento genético distinto.

#### 4. Publicaciones

##### Referencias

Ferguson-Smith AC.

*Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm.*

Nat Rev Genet. 2011; 12: 565-75.

Smallwood SA, Tomizawa S, Krueger F, *et al.*

*Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos.*

Nat Genet. 2011; 43: 811-4.

Eggermann T, Netchine I, Temple IK, Tümer Z, Monk D, Mackay D, Grønskov K, Riccio A, Linglart A, Maher ER.

*Congenital imprinting disorders: EUCID.net - a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care.*

Clin Epigenetics. 2015;7:23.

Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, *et al.*

*Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal*

*diabetes is associated with mutations in ZFP57.*

Nat Genet. 2008; 40: 949-51.

Court F, Martin-Trujillo A, Romanelli V, *et al.*

*Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes.*

Hum Mutat. 2013; 34: 595-602.

Docherty LE, Rezwan FI, Poole RL, *et al.*

*Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated regions associated with novel candidate imprinted genes.*

J Med Genet. 2014; 51: 229-38.

Court F, Camprubi C, Garcia CV, Guillaumet-Adkins A, Sparago A, Seruggia D, Sandoval J, Esteller M, Martin-Trujillo A, Riccio A, Montoliu L, Monk D.

*The PEG-13DMR and brain-specific enhancers dictate imprinted expressions within the 8q24 intellectual disability risk locus.*

Epigenetics Chromatin. 2014;7:5.

Sánchez Delgado M, Camprubí C, Tümer Z, Martínez F, Milà M, Monk D.

*Screening individuals with intellectual disability, autism and Tourette's syndrome for KCNK9 mutations and aberrant DNA methylation within the 8q24 imprinted cluster.*

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2014; 165B:472-8.

Judson H, Hayward BE, Sheridan E, *et al.*

*A global disorder of imprinting in the human female germ line.*

Nature. 2002; 416: 539-42.

Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, *et al.*

*Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans.*

Nat Genet. 2006; 38: 300-2.

## **Bibliografía científica generada**

Tenorio J, Mansilla A, Valencia M, Martínez-Glez V, Romanelli V, Arias P, Castrejón N, Poletta F, Guillén-Navarro E, Gordo G, Mansilla E, García-Santiago F, González-Casado I, Vallespín E, Palomares M, Mori MA, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Fernández L, Mena R, Benito-Sanz S, del Pozo Á, Silla JC, Ibañez K, López-Granados E, Martín-Trujillo A, Montaner D; SOGRI Consortium, Heath KE, Campos-Barros Á, Dopazo J, Nevado J, Monk D, Ruiz-Pérez VL, Lapunzina P.

*A new overgrowth syndrome is due to mutations in RNF125.*

Hum Mutat. 2014, 35(12):1436-41.

Iglesias-Platas I, Martín-Trujillo A, Petazzi P, Guillaumet-Adkins A, Esteller M, Monk D.

*Altered expression of the imprinted transcription factor PLAGL1 deregulates a network of genes in the human IUGR placenta.*

Hum Mol Genet. 2014, 23(23): 6275-85.

Sánchez Delgado M, Camprubí C, Tümer Z, Martínez F, Milà M, Monk D.

*Screening individuals with intellectual disability, autism and Tourette's syndrome for KCNK9 mutations and aberrant DNA methylation within the 8q24 imprinted cluster.*

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2014, 165B(6):472-8.

Court F, Camprubi C, Garcia CV, Guillaumet-Adkins A, Sparago A, Seruggia D,

Sandoval J, Esteller M, Martín-Trujillo A, Riccio A, Montoliu L, Monk D.

*The PEG13-DMR and brain-specific enhancers dictate imprinted expression within the 8q24 intellectual disability risk locus.* Epigenetics Chromatin. 2014, 7(1):5.

Romanelli V, Nakabayashi K, Vizoso M, Moran S, Iglesias-Platas I, Sugahara N, Simón C, Hata K, Esteller M, Court F, Monk D.

*Variable maternal methylation overlapping the nc886/vtRNA2-1 locus is locked between hypermethylated repeats and is frequently altered in cancer.*

Epigenetics. 2014, 9(5):783-90.

Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D.

*Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment.*

Genome Res. 2014, 24(4):554-69.

Camprubí C, Iglesias-Platas I, Martin-Trujillo A, Salvador-Alarcon C, Rodriguez MA, Barredo DR, Court F, Monk D.

*Stability of genomic imprinting and gestational-age dynamic methylation in complicated pregnancies conceived following assisted reproductive technologies.*

Biol Reprod. 2013, 89(3):50.

Court F, Martin-Trujillo A, Romanelli V, Garin I, Iglesias-Platas I, Salafsky I, Guitart M, Perez de Nanclares G, Lapunzina P, Monk D.

*Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes.*

Hum Mutat. 2013, 34(4):595-602.

Iglesias-Platas I, Court F, Camprubi C, Sparago A, Guillaumet-Adkins A, Martin-Trujillo A, Riccio A, Moore GE, Monk D.

*Imprinting at the PLAGL1 domain is contained within a 70-kb CTCF/cohesin-mediated non-allelic chromatin loop.*

Nucleic Acids Res. 2013, 41(4):2171-9.

Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Coto E, Corral-Juan M, San Nicolás H, Corral J, Volpini V, Matilla-Deñás A, Monk D.

*Genotype of an individual single nucleotide polymorphism regulates DNA methylation at the TRPC3 alternative promoter.*

Epigenetics. 2011, 6:1236-41.

Lapunzina P, Monk D.

*The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer.*

Biol Cell. 2011, 103(7):303-17.

Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D.

*Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes.*

Hum Mol Genet. 2011, 20(16):3188-97.