

**SIMPOSIO I.
NUEVOS AVANCES EN GENÉTICA
MOLECULAR**

MEDICINA (Buenos Aires) 2005; 65 (Supl. II): 23-25

**HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (CGH): APLICACIÓN EN EL DIAGNOSTICO
DE ENFERMEDADES GENÉTICAS Y EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

DR. CARLOS A. BACINO

Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Texas Children's Hospital.

La hibridación genómica comparativa mediante el uso de microchips de DNA (microarrays), esta revolucionado la genética humana en las áreas de diagnóstico clínico e investigación. Esta nueva técnica permite la exploración simultánea de múltiples áreas del genoma. Originalmente fue concebida para el análisis de aberraciones cromosómicas y ha tenido una amplia aplicación en estudios de tumores. Recientemente, el Departamento de Genética Molecular y el laboratorio de Citogenética del "Baylor College of Medicine" de Houston, Texas, desarrolló un estudio de microchip que permite la detección simultánea de patologías cromosómicas de mayor relevancia clínica.

Esta técnica fué bautizada por nuestro grupo con el nombre de microchip cromosómico (chromosome microarray). Cada región incluida en este microchip esta representada por 3 o 4 clones, y es estudiada en duplicado. Las muestras de los pacientes estudiados son procesadas para extracción de DNA y luego mezcladas con una muestra control de DNA de un individuo normal. La combinación de ambas muestras en cantidades equimolares es previamente marcada con fluorocromos Cy3 y Cy5 que permiten su detección posterior. La muestra es luego hibridada en el microchip. El microchip utilizado contiene los clones de interés que han sido adheridos a la superficie del vidrio mediante un proceso de siliconización. Luego de la hibridación y lavado, la detección de la señal fluorescente es efectuada por una escaneadora automática. Los datos obtenidos son analizados con un programa que permite la normalización de los clones con respecto a la muestra del paciente y el control. Se establecieron rangos de variación para facilitar el análisis y determinar la presencia de deleciones, duplicaciones o variantes polimórficas. La localización de las sondas utilizadas para este estudio se verificaron previamente mediante el uso de FISH (hibridación *in situ* por fluorescencia).

Nuestra última versión clínica del microchip (versión 5), contiene 866 clones de BACs (cromosomas artificiales bacterianos) que representan más de 80 patologías cromosómicas específicas, incluyendo síndromes de microdeleciones y micro duplicaciones. Este microchip incluye regiones pericentroméricas y sondas específicas para regiones subtelo méricas. Actualmente efectuamos el estudio a un total de 694 muestras enviadas para estudio clínico y detectamos 44 anomalías con buena correlación clínica.

ca. Detectamos además, en un pequeño número de muestras, duplicación, deleción o ambos, de clones únicos que en su mayoría representan polimorfismos. Estos estudios preliminares permitieron la detección de más de un 6 % de anomalías en pacientes, que tenían estudios cromosómicos previos, normales. Todas las anomalías detectadas fueron verificadas posteriormente con FISH.

La utilización de la hibridación genómica comparativa no es limitada sólo a la clínica. Esta tecnología es aplicada también en el campo de la investigación básica y clínica. Nuestro grupo, actualmente ha utilizado una grilla de hibridación genómica comparativa específica para el cromosoma 15 en 22 pacientes con síndrome de Angelman con deleciones de la región 15q11-q13 para así poder establecer una correlación genotipo-fenotipo. El síndrome de Angelman es una enfermedad caracterizada por retardo mental, ataxia, convulsiones, alteraciones conductuales y dismorfias faciales. Es causado por deficiencia de UBE3A (gen de la proteína ubiquitina-ligasa asociada a la proteína E6). Hasta el momento se conocen cuatro etiologías diferentes para el síndrome de Angelman. Un 70% es por deleción intersticial de la región 15q11-q13 del cromosoma de origen materno. Las deleciones de esta región pueden ser subclasificadas de acuerdo a su tamaño en Clase I y Clase II. Las deleciones de Clase I son de mayor tamaño en comparación a las de Clase II. En nuestro estudio encontramos que los niños con deleción de Clase I tienen un fenotipo más severo en el área de lenguaje y en su capacidad cognitiva, y necesitan más drogas anticonvulsivantes para controlar la epilepsia. Por otra parte, la gran mayoría de niños con esta deleción tienen más probabilidades de ser diagnosticados con autismo.

En conclusión el microchip cromosómico permite: 1) Detección simultánea de un gran número de alteraciones cromosómicas de alta relevancia clínica incluyendo deleciones y duplicaciones. 2) Identificación de anomalías que difícilmente son detectadas con técnicas de análisis convencional como en el caso de las micro duplicaciones que son raramente visibles aún con FISH en células en metafase y que requieren estudios de FISH en células de interfase. 3) Efectuar correlaciones genotipo-fenotipo en alteraciones de regiones genómicas conocidas. 4) Delineación de nuevos fenotipos.

REGULACIÓN GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DEL IMPRINTING DE H19/IGF2.

DRA. NORA ENGEL

University of Pennsylvania

El imprinting geonómico es un mecanismo epigenético de regulación transcripcional que afecta un grupo reducido de genes en mamíferos y que resulta en la expresión monoalélica de estos genes. Además, el alelo expresado está determinado por el origen parental. Los genes *H19* e *Igf2* están ligados y tienen un patrón de imprinting opuesto: el *H19* es expresado exclusivamente del alelo materno y solo la copia paterna del *Igf2* es activa. La regulación coordinada de imprinting en este locus depende de una región de 2 kb diferencialmente metilada (DMD, "*differentially methylated domain*") *upstream* del gen de *H19*. El DMD contiene cuatro secuencias repetitivas altamente conservadas y ricas en el dinucleótido CG. Las repeticiones unen al CTCF ("*CCCTC-binding factor*"), una proteína involucrada en el establecimiento de insuladores (elementos aislantes). En consecuencia, el DMD funciona como elemento aislante, regulando el uso de los *enhancers* comunes para *H19* e *Igf2*. Sin embargo, el insulador funciona solamente en el alelo materno, ya que está regulado epigenéticamente por el mecanismo de imprinting. Dado que la unión de CTCF a su secuencia de reconocimiento es sensible al estado de metilación del ADN, no se establece un insulador en el alelo paternal hipermetilado.

Se ha hipotetizado que además de funcionar como sitios de reconocimiento de CTCF, las secuencias repetitivas contenidas en el DMD tienen un rol en el establecimiento y mantenimiento de la metilación del alelo paterno. Para ensayar el rol de las repeticiones en la regulación del imprinting en el locus endógeno, utilizamos tecnología de *targeting* genómico para reemplazar el DMD salvaje con una versión mutada en la que se han sustituido 9 CGs altamente conservados dentro de las repeticiones. Los ratones generados de células embrionarias mutantes se usaron para analizar el estado de metilación según origen parental y el imprinting y expresión de *H19* e *Igf2*. Cuando la mutación se hereda maternalmente, no hay alteraciones en el imprinting ni en la hipometilación del alelo mutante respecto del salvaje. Por otro lado, los experimentos muestran que la mutación de 9 CGs permite el establecimiento ectópico de un insulador sobre el alelo paternal, alterando su identidad epigenética. Ratones que heredan la mutación del padre presentan una dramática reducción de expresión de *Igf2*, consistente con la presencia de un insulador, y un fenotipo de retardo de crecimiento. Además, tienen hipometilación del DMD y expresión bialélica de *H19*. Estos resultados revelan un antagonismo entre dos señales epigenéticas, la metilación y el insulador, que compiten por el control de imprinting en este locus.

MECHANISMS OF EPIGENETIC SILENCING IN CANCER

DR. ARI MELNIK

Faculty Scholar in Cancer Research, Department of Developmental and Molecular Biology and Albert Einstein Cancer Center

Introduction: In recent years it has become apparent that genetic lesions alone do not fully explain malignant transformation of human tissues. Traditionally, gain of oncogenes or loss of tumor suppressors was attributed to genomic alterations such as amplifications or deletions respectively. However, heritable information can also be transmitted independently of DNA sequence via DNA cytosine methylation, or by covalent modifications of DNA-associated proteins such as histones. Collectively, the cellular content of this extra-genetic gene regulatory information is referred to as the "epigenome". While certain components of the epigenome are extremely stable, others can be quite labile and are modified for example by diet, the environment and aging. In contrast to the genome, the epigenome has tissue and differentiation stage-specific

settings that can be modified using transcription factors and epigenetic-targeted drugs or peptides. It is now accepted that epigenomic lesions can initiate cancer. For example, individuals with hereditary loss of DNA methylation on the normally imprinted IGF2A locus are predisposed to renal and colonic tumors. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes such as p16 and HIC1 and DNA repair enzymes such as MGMT and MLH1 plays a critical role in cancer progression and accordingly tumor formation in certain cancer-prone animal models when crossed into a methylation deficient background. Moreover, therapeutic drugs that block epigenetic silencing can reactivate gene expression and have anti-tumor effects *in vitro* and *in vivo*.

It is important to note that methylation of DNA per se does not mediate gene silencing. Rather, methylated DNA

recruits proteins that must be able to somehow repress the loci where they are bound. We are interested in determining the mechanism through which this occurs. We propose that proteins that mediate epigenetic silencing of methylated genes in cancer function as potent oncogenes and could be excellent therapeutic targets. The MBD (**methylcytosine-binding domain**) family of proteins includes three transcriptional repressors that silence methylated target genes by recruiting histone deacetylases. More recently it was discovered that a novel transcriptional repressor protein called kaiso can also bind to methylated DNA, but requires a more extensive methylated sequence and binds with much higher affinity than MBDs. We hypothesized that kaiso might be a major repressor of methylated tumor suppressors during tumor progression, and that it would bind with predilection to heavily methylated regions and displace MBDs, leading to permanent silencing.

Kaiso contains an N-terminal BTB repression domain. With our collaborators we determined the structure of this domain by X-ray crystallography. The kaiso BTB domain forms an obligate dimer with an open charged pocket structure that is likely to mediate protein docking. Neutralization of the pocket by point mutations abrogates the ability of the kaiso BTB domain to repress. Kaiso also forms BTB mediated oligomers, which appear to mediate cooperative binding. This is consistent with a model whereby progressive methylation of promoters could induce kaiso oligomerization, leading to cooperative binding and potent transcriptional repression. We also found that kaiso mediates transcriptional repression by recruiting two different corepressor complexes that mediate repression by covalently modifying the surrounding chromatin. Aberrant promoter methylation is clearly linked with the pathogenesis of colon cancer. We found that kaiso is expressed in normal intestinal mucosa but that its expression is increased in colonic neoplasias in both animal models and in human patients. We found that kaiso binds to hypermethylated promoters of the p16, HIC1, MGMT and MLH1 genes by performing chromatin immunoprecipitations in colon cancer cells, where methylation was precisely quantified by bisulphite pyrosequencing. Kaiso was required to maintain silencing of these tumor suppressor genes, since RNAi knockdown of kaiso in these cells caused these genes to be re-expressed. This result proves that DNA methylation does not silence these genes but rather that transcriptional repressors are required. Accordingly, kaiso deficient colon cancer cells became susceptible to stress induced apoptosis, since they are now able to activate tumor suppressor checkpoints. Confirming the importance of kaiso as a methylation dependent oncogene, colon cancer prone mice display a marked increase in survival when crossed into a kaiso null background. We conclude that kaiso is a new

class of "opportunistic" oncogene, which only becomes oncogenic in the presence of DNA methylation. Since kaiso was required to silence tumor suppressors and for survival and progression of colon cancer it is an excellent candidate for therapeutic targeting. We are attempting to design specific inhibitors of kaiso by extending our crystallography studies to include its corepressor partner proteins.

Cancer is a complex, multigenic process, and although isolated examples of aberrant DNA methylation or histone modifications have been identified, identification of the entire global epigenome of the cancer cell might allow a more accurate understanding of the contribution of epigenetic changes to the molecular pathogenesis of the disease. We hypothesized that global patterns of DNA methylation and histone modifications play a critical role in determining the biological basis of disease, tumor classification prediction of therapeutic response, and selection of patients for treatment with molecular targeted therapeutic agents. Current genome-wide profiling studies using expression arrays have already provided advances in these areas, but are hampered by the fact that only a small set of genes on expression arrays are informative, and by the fact that they represent only a baseline snapshot and provide no information as to the regulatory status of genes or whether they are available to be expressed. Epigenomic profiling could solve these issues.

We predicted that a combined and integrated genomic and epigenomic analysis of cancer cells would provide the most comprehensive and accurate characterization of cancer to date. We established novel assays and analytical methods for determining the cytosine methylation and histone covalent modification status of the entire genome. Global cytosine methylation is detected by an assay called HELP (Hpa II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR) developed by our collaborator and optimized by us in human tumors using a specially designed custom high-density oligonucleotide microarray. Histone modifications are detected by a modified high throughput chromatin immunoprecipitation protocol using high density tiling promoter microarrays. In order to detect gene copy number we perform high-density arrayCGH with a resolution of 6 KB, and finally, gene expression profiling. We developed novel statistical tools to analyze and integrate these data and have embarked upon a large-scale effort involving hundreds of patients to characterize the genetic and epigenetic basis of acute leukemia and B-cell lymphomas. Our initial results providing a global epigenetic and genetic characterization of acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias and identifying novel pathogenic lesions will be presented. We expect our studies to lead to novel classification, risk adapted therapy and the application of epigenetic-targeted therapeutic agents to hematological malignancies.