

## PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Aproximación al síndrome Rett mediante la inmunoprecipitación de cromatina por MeCP2 en un microarray de islas CpG partiendo de células neuronales de un modelo murino de la enfermedad.

**PALABRAS CLAVE:** síndrome de Rett, MeCP2, metilación de DNA, silenciamiento transcripcional, histonas.

### RESUMEN:

El síndrome Rett (RTT) es una de las causas más frecuentes de retraso mental en mujeres. Uno de los avances más importantes en este campo ha sido el descubrimiento de la relación entre esta enfermedad y la presencia de mutaciones en la proteína de unión a DNA metilado MeCP2 (Amir *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 1999). El modelo actual propone que MeCP2 actúa como represor transcripcional que acopla la metilación del DNA al silenciamiento transcripcional. Los ratones deficientes en MeCP2 (Guy *et al.*, 2001) constituyen un modelo excelente para el estudio de las consecuencias de la pérdida de MeCP2 en la función neuronal.

La principal finalidad de esta propuesta es llevar a cabo la búsqueda de dianas de MeCP2 en el cerebro de ratón. Con este propósito realizaremos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina seguidos de la hibridación a un *microarray* genómico (ChIP-on-chip). Los análisis se harán de forma paralela al establecimiento del fenotipo RTT. Se ha demostrado que esta estrategia resulta muy útil en la identificación de nuevas dianas de unión para un gran número de factores nucleares (Weinmann *et al.*, 2001; Ballestar *et al.*, 2003). Los experimentos de ChIP-on-chip y la consiguiente generación de una lista de genes potencialmente candidatos, se sucederá con el análisis comparativo de la expresión entre los cerebros mutante y salvaje. Asimismo realizaremos el estudio de la metilación de los promotores de estos genes.

Por una parte, esta información podría proporcionarnos nuevos marcadores de la enfermedad así como posibles dianas para el tratamiento. Por otro lado, este estudio profundiza en el conocimiento de la etiopatogenia del síndrome Rett y los mecanismos moleculares del desarrollo neurológico.

## ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

El síndrome de Rett, una de las causas más frecuentes de retraso mental en mujeres, fue descrito por primera vez por el Dr Andreas Rett en 1966. Hasta entonces, las niñas actualmente diagnosticadas como pacientes Rett eran clasificadas dentro del heterogéneo grupo de niños autistas. Recientemente ha sido descrita la asociación entre este síndrome y la presencia de mutaciones en el represor transcripcional con afinidad por metil-CpGs MeCP2 (Amir *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 1999).

Las niñas que sufren el síndrome de Rett presentan un desarrollo normal hasta los 6-18 meses. A partir de ese momento sufren un periodo de regresión en el desarrollo, con pérdida de adquisiciones. En particular, se ven afectadas las habilidades motoras, se produce una pérdida del lenguaje y de la interacción social, se instaura un retraso mental profundo, y la habilidad manual es sustituida por movimientos estereotípicos característicos. Además estas niñas sufren un retraso mental grave.

MeCP2, la proteína que aparece mutada en estos pacientes, es el miembro arquetípico de una familia de proteínas con afinidad por DNA metilado (Ballestar and Wolffe, 2001). La metilación de dinucleótidos CpG, la modificación más importante en el genoma de vertebrados, está asociada a represión transcripcional (Bird and Tweedie, 1995; Razin, 1998) y ha sido implicada en alteraciones estables en la expresión génica en desarrollo y cáncer (Esteller, 2000).

MeCP2 contiene dos dominios definidos: un dominio de unión a dinucleótidos CpG metilados (MBD), común en todas las proteínas de unión a DNA metilado, y un dominio de represión transcripcional (TRD), implicado en el reclutamiento del correpresor Sin3A e histona desacetiladas para reprimir la transcripción (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998).

La mayoría de las primeras mutaciones de MeCP2 identificadas en pacientes con el síndrome de Rett eran mutaciones localizadas en el MBD. Más adelante se descubrieron numerosas mutaciones en el TRD y también en el dominio C-terminal, tanto sustituciones como deleciones. Las mutaciones que ocurren en el MBD incapacitan a MeCP2 para la unión de DNA metilado (Ballestar *et al.*, 2000) y ambos tipos de mutaciones afectan la capacidad de MeCP2 para reprimir la transcripción (Yusufzai and Wolffe, 2000).

A pesar de que parece claro que las mutaciones en MeCP2 eliminan su función como represor transcripcional, hasta el momento se desconocen la identidad y el número de genes regulados por la actividad de MeCP2. Resulta evidente que la identificación de genes cuya regulación se ve alterada en el síndrome de Rett resulta de vital importancia para poder conocer el mecanismo detallado por el que progresa esta enfermedad y, en última instancia, poder desarrollar terapias específicas para la misma.

## BIBLIOGRAFÍA

Amir, R. E., I. B. Van den Veyver, et al. (1999). "Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2." Nat Genet **23**(2): 185-8.

Ballestar, E., S. Ropero, et al. (2005). "The impact of MECP2 mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients." Hum Genet **116**(1-2): 91-104.

Ballestar, E. and A. P. Wolffe (2001). "Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression." Eur J Biochem **268**(1): 1-6.

Ballestar, E., T. M. Yusufzai, et al. (2000). "Effects of Rett syndrome mutations of the methyl-CpG binding domain of the transcriptional repressor MeCP2 on selectivity for association with methylated DNA." Biochemistry **39**(24): 7100-6.

Bapat, S. and S. Galande (2005). "Association by guilt: identification of DLX5 as a target for MeCP2 provides a molecular link between genomic imprinting and Rett syndrome." Bioessays **27**(7): 676-80.

Caballero, I. M. and B. Hendrich (2005). "MeCP2 in neurons: closing in on the causes of Rett syndrome." Hum Mol Genet **14 Spec No 1**: R19-26.

Fraga, M. F., E. Ballestar, et al. (2003). "The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties." Nucleic Acids Res **31**(6): 1765-74.

Fuks, F., P. J. Hurd, et al. (2003). "The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation." J Biol Chem **278**(6): 4035-40.

Guy, J., B. Hendrich, et al. (2001). "A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome." Nat Genet **27**(3): 322-6.

Horike, S., S. Cai, et al. (2005). "Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome." Nat Genet **37**(1): 31-40.

Kishi, N. and J. D. Macklis (2004). "MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions." Mol Cell Neurosci **27**(3): 306-21.

Nelson, E. D., E. T. Kavalali, et al. (2006). "MeCP2-dependent transcriptional repression regulates excitatory neurotransmission." Curr Biol **16**(7): 710-6.

Nuber, U. A., S. Kriaucionis, et al. (2005). "Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome." Hum Mol Genet **14**(15): 2247-56.

Peddada, S., D. H. Yasui, et al. (2006). "Inhibitors of differentiation (ID1, ID2, ID3 and ID4) genes are neuronal targets of MeCP2 that are elevated in Rett syndrome." Hum Mol Genet **15**(12): 2003-14.

Wan, M., S. S. Lee, et al. (1999). "Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots." Am J Hum Genet **65**(6): 1520-9.

Yusufzai, T. M. and A. P. Wolffe (2000). "Functional consequences of Rett syndrome mutations on human MeCP2." Nucleic Acids Res **28**(21): 4172-9.

Zlatanova, J. (2005). "MeCP2: the chromatin connection and beyond." Biochem Cell Biol **83**(3): 251-62.

## OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es la búsqueda de dianas de MeCP2 en el cerebro de ratón. Para lograrlo afrontaremos los siguientes pasos u objetivos concretos:

1. Aislamiento de tejido nervioso de ratones MeCP2-null así como controles sanos.

Dado que la patología RTT tiene muy importantes consecuencias a nivel nervioso todo este proyecto se centra en el estudio de tejidos del sistema nervioso central.

Los ratones MeCP2-null (B6.129P2(C)-*Mecp2*<sup>tm1.1Bird/J</sup>) han sido adquiridos de The Jackson Laboratory. La obtención del tejido se llevará a cabo en distintos momentos tras la aparición de los síntomas equiparables al RTT. El cerebro se diseccionará para realizar análisis individuales de encéfalo, mesencéfalo y cerebelo.

2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y microarray.

Para observar la interacción directa de MeCP2 y los promotores de distintos genes, cuya regulación transcripcional sea ejercida por esta proteína, es necesario acudir a ensayos de ChIP. Se comenzará con un análisis masivo empleando la técnica de ChIP-on-chip.

Tras disgregar mediante métodos enzimáticos los tejidos nerviosos escogidos, los ensayos de ChIP se realizarán mediante los procedimientos estándar (Ballestar *et al.*, 2003). Esta prueba se realizará por triplicado. El DNA procedente del ChIP se hibridará en un microarray genómico de ratón. La hibridación también se hará por triplicado. El análisis de los microarrays se efectuará por los servicios de genómica y bioinformática del Centro de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

3. Validación de las dianas I: ChIP.

Con el propósito de validar los genes resultantes del análisis anterior, se harán ensayos de ChIP individuales partiendo de los tejidos procedentes de ratones MeCP2-null y control. Estas pruebas también se realizarán por triplicado.

4. Validación de las dianas II: qRT-PCR.

La comparación de los niveles de expresión de los genes, anteriormente confirmados, en los cerebros de los ratones MeCP2-null y control constituye otro grado de validación. Los niveles de expresión se evaluarán mediante Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). También se realizarán pruebas de Western Blot cuando sea posible dependiendo de la disponibilidad de los anticuerpos correspondientes.

5. Análisis de la metilación de los promotores.

En aquellos genes validados por los análisis anteriores se procederá al estudio del estado de metilación de sus promotores mediante secuenciación genómica de bisulfito así como PCR específica de metilación. Esta determinación permitirá aseverar la dependencia del estado de metilación que conlleva la regulación ejercida por MeCP2.

#### 6. Niveles globales de metilación.

Finalmente, se estudiarán los posibles efectos de la presencia de mutaciones en MeCP2 en la aparición de cambios de los niveles globales de metilación mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE).

## PLAN DE TRABAJO

El síndrome Rett (RTT), una de las causas más comunes de retraso mental en mujeres, ha sido asociado con mutaciones en el gen que codifica para el represor transcripcional con afinidad por DNA metilado MeCP2 (Amir *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 1999).

La identificación de genes cuya expresión es regulada por MeCP2 resulta esencial para la comprensión de las vías de establecimiento de la enfermedad. Los primeros estudios se dirigieron a la investigación de las consecuencias transcripcionales de la pérdida de MeCP2 en pacientes RTT con tejido cerebral post-mortem (Colantuoni *et al.*, 2001) o con líneas celulares linfoblásticas derivadas de linfocitos (Traynor *et al.*, 2002; Ballestar *et al.* 2005). Los ratones deficientes en MeCP2 (Guy *et al.*, 2001) constituyen un modelo alternativo excelente para investigar las consecuencias de la pérdida de MeCP2 en las funciones neuronales y el desarrollo nervioso.

Estudios de microarrays de cDNA en estos modelos han revelado que los cambios en la expresión son sutiles, indicando que la regulación ejercida por MeCP2 podría ser muy específica. Sin embargo, los estudios que únicamente han valorado la expresión génica a partir de muestras deficientes en MeCP2 no informan si esos cambios son consecuencia directa de la pérdida de la función de MeCP2 sobre los promotores de ciertos genes o si es un

efecto secundario debido, por ejemplo, a la desregulación indirecta de un factor de transcripción. Por tanto resulta de especial interés la identificación de dianas directas de MeCP2 en un tejido relevante que podría servir posteriormente para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

La hibridación de DNA de cromatina inmunoprecipitada en un microarray genómico (ChIP-on-chip) es una herramienta poderosa que se puede utilizar para descubrir nuevas secuencias diana para factores de transcripción o para revelar secuencias de DNA con características peculiares de cromatina. Su potencial es el resultado de la acertada combinación de ensayos de ChIP y la tecnología de los microarrays. El ensayo de ChIP permite el aislamiento de una librería genómica de secuencias que están unidas a un factor de transcripción específico o que contiene una modificación de histonas concreta. La tecnología de los microarrays hace posible el análisis de miles de secuencias en un solo experimento. La aplicabilidad de esta técnica reside en la disponibilidad de microarrays genómicos pero, afortunadamente, tanto los microarrays genómicos como los específicos están actualmente disponibles.

La hipótesis de trabajo en este proyecto es que los experimentos de ChIP-on-chip realizados con cerebro de ratones modelo para RTT pueden utilizarse para identificar dianas directas de MeCP2 que probablemente están involucradas en el establecimiento de la enfermedad.

La metodología necesaria para llevar a cabo este proyecto se detalla a continuación:

1. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se llevarán a cabo como ha sido descrito previamente (Fournier *et al.*, 2002). Se realizarán experimentos preliminares que abarquen una fijación con formaldehído desde 5min hasta 1hora para obtener el máximo rendimiento en la combinación de: cromatina fijada in vivo, alta recuperación de DNA y obtención de fragmentos de cromatina de tamaño medio pequeño. En nuestros análisis, la cromatina se rompe en una longitud media de 0.25-1 kb. La amplificación por PCR se llevó a cabo a partir de 25 l con primers específicos para cada promotor estudiado. En cada uno de estos promotores la sensibilidad de la amplificación por PCR se evalúa con diluciones seriadas de DNA total recogido tras la sonicación ("Input"). Se realizarán tres experimentos de ChIP independientes para cada caso. Las muestras se corren en geles de agarosa 2%.

2. ChIP-on-chip.

Se marcarán las fracciones inmunoprecipitadas de tres experimentos independientes de ChIP y se usarán en un microarray CpG descrito anteriormente (Ballestar *et al.*, 2003). Los microarrays CpG se adquirirán de The University Health Network Microarray Centre. Cada muestra estudiada, incluyendo todos los controles, se marcará con Cy5 (rojo) y se hibridará en las

plataformas. El procedimiento se corresponderá con el método de De Risi *et al.* ([www.microarrays.org](http://www.microarrays.org)). Posteriormente se escanearán las plataformas usando GenePix 4000A (Axon) y se analizarán con el programa GenePix Pro4.0. Para cada muestra se llevarán a cabo tres hibridaciones de experimentos independientes de ChIP. La normalización se aplica utilizando la intensidad media global de los loci hibridados para cada plataforma. La selección de clones positivos se realiza de los clones positivos comunes a los tres experimentos independientes de hibridación.

### 3. qRT-PCR.

Se llevarán a cabo Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) en placas ópticas de 96 pocillos, con un volumen de 20  $\mu$ l por pocillo. Cada mezcla de reacción contiene 1  $\mu$ l de la dilución adecuada del cDNA problema (1:10 a 1:100), 5pmol de cada primer y 10  $\mu$ l de 2X SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todas las medidas se realizan por triplicado. Los valores de expresión se normalizan con los de glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) como control endógeno. Las reacciones de PCR se corren y analizan usando ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

### 4. Western Blot.

### 5. Análisis de la metilación de promotores.

El estado de metilación del DNA genómico se establece mediante el análisis tras la modificación con bisulfito sódico. Inicialmente, todos los genes estudiados son analizados por PCR específica de metilación (MSP) como se ha descrito anteriormente. La secuenciación de bisulfito se corresponde con las islas CpG (sense y anti-sense) y es realizada como se ha descrito (Ballestar *et al.*, 2003). Todos los primers para las secuenciaciones de bisulfito y MSP deben ser diseñados de forma individualizada para dirigirse contra los inicios de transcripción de los genes investigados.

### 6. Niveles de metilación global del DNA mediante electroforesis capilar.

Además de estudiar los cambios en la expresión de genes como consecuencia de la inactivación por mutación de la proteína MeCP2 en ratones Rett, se analizarán los efectos de esta mutación sobre los niveles globales de DNA metilado, mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE). Una vez tratadas las líneas celulares con los inhibidores de interés se extraerá el DNA mediante procedimientos estándar, o mediante el kit de Qiagen DNeasy y se somete a digestión con nucleasa a fin de obtener los nucleótidos y de ese modo cuantificar la 5-metilcitosina.



## EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR EN EL TEMA.

El Dr. Manel Esteller dirige el grupo de Epigenética del Cáncer dentro del Programa de Patología Molecular del Centro nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Este grupo habiendo iniciado sus actividades a 1 de Enero del 2001. Este laboratorio se encuentra implicado en el análisis de alteraciones epigenéticas que afectan a tumores y tejidos normales humanos así como en el estudio de enfermedades que estén relacionadas con la metilación del DNA o alguno de los elementos del sistema de metilación, entre los cuales se cuenta la proteína MeCP2, mutante en el síndrome de Rett.

El Dr. Esteller realizó su tesis doctoral en genética molecular del cáncer de mama y ginecológico en el Hospital Valle de Hebron de Barcelona publicando 8 artículos originales y 2 revisiones derivados de esa etapa. Al mismo tiempo fue investigador invitado durante 1995 en la School of Biological and Medical Sciences de la Universidad de St. Andrews en el Reino Unido, estudiando familias con mutaciones germinales en BRCA1, p53 y ATM. En Enero de 1997 empezó su periodo postdoctoral en el Centro Oncológico de la Johns Hopkins University and Medical Institutions en Baltimore, USA en el laboratorio de los Dres. Steve Baylin y James G. Herman, pioneros en el campo de la metilación aberrante en cáncer. Desde Octubre 1999 hasta su incorporación al CNIO, el Dr. Esteller ha ocupado la posición de investigador asociado en dicho laboratorio. Durante este periodo, el trabajo del Dr. Esteller ha sido publicado en forma de 31 artículos originales y 4 revisiones en las más prestigiosas peer-reviewed revistas científicas y médicas (New England Journal of Medicine, Nature, Journal of The National Cancer Institute, Cancer Research, Proceedings of The National Academy of Sciences, American Journal of Pathology, Journal of Clinical Oncology, etc.). Su labor investigadora ha recibido, entre otros, el Premio de Investigador Joven del Cáncer de la American Association for Cancer Research (1999 y 2001), Young Investigator of European Association for Cancer Research (2000), y Young Investigator Award Carcinogenesis and Oxford University Press (2006). Su experiencia en el sistema de metilación del DNA es decisiva para el desarrollo de este proyecto.

El Dr. Esteban Ballestar inició sus actividades en el Programa de Patología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Noviembre de 2001 tras la concesión de un contrato de investigador dentro del **Programa Ramón y Cajal**. Entre los intereses de investigador destaca la determinación del papel específico de cada uno de los miembros de la familia de proteínas MBD, entre las cuales se encuentra MeCP2, y sus implicaciones en la represión específica de genes.

El Dr. Ballestar posee una amplia experiencia en el campo de la cromatina. Realizó su tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Valencia, bajo la dirección del Prof. Luis Franco, en la que estudió aspectos estructurales y funcionales de la cromatina. De esta etapa derivaron cuatro artículos originales publicados en Journal of Biological Chemistry, Biochemistry y Biochemical Journal. Tras este periodo, el Dr. Ballestar realizó una estancia post doctoral en el laboratorio del Dr. Alan Wolffe, en los National Institutes of Health con una beca del programa de perfeccionamiento de doctores en el extranjero del Ministerio de Ciencia. Tras los dos años de beca post doctoral, el Dr. Ballestar recibió una beca Fogarty de los National Institutes of Health para prolongar sus trabajos en el laboratorio del

Dr. Wolffe. El laboratorio del Dr. Wolffe ha sido uno de los laboratorios de cromatina pioneros en el estudio de las proteínas MBD y en establecer su relación con complejos de histona desacetilasa e histona acetiltransferasa. El Dr. Ballestar realizó importantes contribuciones en este campo y sus trabajos fueron publicados en las más prestigiosas revistas como *Nature Genetics*, *EMBO Journal* o *Biochemistry* entre otras. Tras su estancia post doctoral, el Dr Ballestar regresó al Departamento de Bioquímica de la Universidad de Valencia con un contrato de incorporación del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Tras la concesión de un contrato del Programa Ramón y Cajal, el Dr. Ballestar se incorporó al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, dentro del programa de Patología Molecular donde ha continuado trabajando con este grupo de proteínas. En los últimos años sus trabajos se han publicado en revistas como *Carcinogenesis*, *Chromosoma*, *EMBO Journal* y fue invitado a contribuir en dos capítulos de la *Encyclopedia of the Human Genome*, del grupo editorial *Nature*.

El Dr Santiago Roperó es un becario postdoctoral con una dilatada experiencia en el campo de la biología molecular y celular en patología humana, con publicaciones en las mejores revistas del área de las ciencias biológicas como *Nature Genetics*, *Human Molecular Genetics* o *PNAS*. Su creciente interés en el Síndrome de Rett asociado a sus conocimientos lo convierten en pieza clave del proyecto.