



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Tumores del Desarrollo, Epigenética y miRNAs

Soledad Gómez González

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universidad de Barcelona
Facultad de Farmacia
Programa de Doctorado en Biomedicina

“Tumores del Desarrollo, Epigenética y miRNAs”

Laboratorio de Tumores del Desarrollo,
Hospital-Fundación Sant Joan de Déu

Soledad Gómez González

Directora de Tesis: Dra. Cinzia Lavarino
Tutor de Tesis: Dr. Carlos J. Ciudad Gómez

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

“Tumores del Desarrollo, Epigenética y miRNAs”

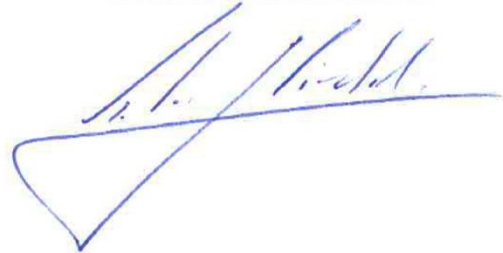
Memoria presentada por Soledad Gómez González para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona

Laboratorio de Tumores del Desarrollo,
Hospital-Fundación Sant Joan de Déu

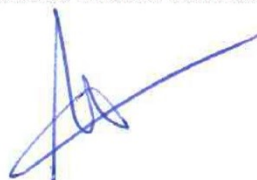
V^oB^o de la directora de la tesis,
Dra. Cinzia Lavarino



V^oB^o del tutor de la tesis,
Dr. Carlos J. Ciudad Gómez



La doctoranda,
Soledad Gómez González



Índice

Índice	5
Introducción	11
Cáncer del desarrollo	13
Neuroblastoma	14
Origen y Embriología	14
Presentación clínica	15
Neuroblastoma Localizado	15
Neuroblastoma Metastásico	16
Regresión espontánea	16
Diagnóstico	16
Sistema de clasificación	17
Histología de los tumores Neuroblásticos	18
Neuroblastoma	18
Ganglioneuroma	19
Ganglioneuroblastoma	19
Alteraciones Genéticas Recurrentes en el Neuroblastoma	20
Amplificación del gen <i>MYCN</i>	20
Pérdida 1p	21
Ganancia del cromosoma 17	21
Pérdida del cromosoma 11	21
Ploidía	22
Predisposición Genética a Neuroblastoma	22
Mutaciones Somáticas Recurrentes en Neuroblastoma	22
Tratamiento	23
Meduloblastoma	24
Origen y Embriología	24
Presentación clínica	24
Diagnóstico de Meduloblastoma	25
Histología del Meduloblastoma	25
Sistemas de Clasificación	27
Subgrupos moleculares de Meduloblastoma	27
Subgrupo WNT	28
Subgrupo SHH	29
Subgrupos 3 y 4	29
Definición de subgrupos moleculares	30
Tratamiento	31
Epigenética	32
Metilación de Citosinas del ADN	32
Mecanismos de metilación	33
DNMTs	33
TET	34
Metilación en Citosinas CpG	34
Metilación en Citosinas no-CpGs	35
Metilación y Cáncer	36
Técnicas de detección	38
Bisulfito	39
Secuenciación Sanger de productos de PCR obtenidos a partir de ADN convertido por bisulfito (BSP)	39
Pirosecuenciación	41
Microarrays Infinium	41

Infinium Human Methylation 450K BeadChip _____	43
Anotación Genómica de las Citosinas incluidas en el HM450K _____	44
Herramientas Bioinformáticas _____	46
miRNAs _____	46
miRNA y Cáncer _____	48
ARNm como ceRNAs en Cáncer _____	48
Técnicas de detección de miRNAs _____	48
Objetivos _____	51
Objetivo Global _____	51
Objetivos Específicos _____	51
Resultados _____	53
La hipometilación del ADN afecta a funciones biológicas relacionadas con cáncer y a genes relevantes para la patogénesis del neuroblastoma _____	55
El patrón de metilación específico del neuroblastoma revela nuevos conocimientos biológicos y clínicos _____	71
Método para la clasificación en subgrupos moleculares de pacientes con Meduloblastoma _____	111
Discusión _____	147
Conclusiones _____	159
Bibliografía _____	161
ANEXOS _____	173
Alteración de la expresión de redes de miRNAs en Neuroblastoma, una aproximación multi “-ómica” _____	175

Introducción

Cáncer del desarrollo

El cáncer del desarrollo define los tumores propios el desarrollo del individuo, conocidos como cáncer infantil o pediátrico (desde la infancia hasta la edad de joven adulto). Los tumores del desarrollo son un raro evento aunque representan una de las causas principales de muerte en la edad pediátrica. En España se registran aproximadamente 1,000 casos anuales de cánceres pediátricos (Informe Estadístico RETI-SEHOP, 1980-2016). La leucemia es el más frecuente de los cánceres pediátricos, seguidos por tumores de sistema nervioso central, linfomas, neuroblastomas, sarcomas, tumores de Wilms y tumores de células germinales (Informe Estadístico RETI-SEHOP, 1980-2016).

En 1875 se postuló la teoría embrionaria para describir el origen del cáncer infantil y se basa en la relación existente entre el desarrollo del individuo normal y la oncogénesis que implica una maduración celular alterada que da lugar a la sobreproducción de células indiferenciadas y a la acumulación de las mismas¹⁻³.

Los tumores pediátricos se desarrollan en el tejido inmaduro a lo largo del complejo proceso que dirige la organogénesis durante el desarrollo humano. Los tumores del desarrollo imitan funcionalmente a las células indiferenciadas de los tejidos de origen, como por ejemplo en los tumores de Wilms y el mesénquima metanéfrico, el neuroblastoma y los progenitores simpatoadrenales de la cresta neural, el rhabdomyosarcoma y el músculo esquelético, los hemangiomas y las células endoteliales fetales, el meduloblastoma y los precursores cerebelares^{4,5}.

Los tumores del desarrollo tienen características biológicas y clínicas únicas, que los distinguen del cáncer que afecta el individuo adulto. Sin embargo la etiología del cáncer infantil sigue siendo en gran medida desconocida.

Neuroblastoma

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más común en la edad pediátrica y la neoplasia más frecuentemente diagnosticada durante la infancia^{6, 7}. El neuroblastoma es un tumor neuroendocrino embrionario maligno que pertenece al grupo de los Tumores Neuroblásticos: ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma y neuroblastoma.

La primera descripción del neuroblastoma la realizó en 1864, el patólogo Rudolf Ludwig Karl Virchow que describió la gran masa que se observaba en la cavidad abdominal infantil como un "glioma"⁸. Pero no fue hasta 1910 cuando el Dr. James Homer Wright que unificó las observaciones realizadas al inicio del siglo XX por el Dr. Robert Hutchison y Dr. William Pepper con sus propios descubrimientos, para describir por primera vez bajo el nombre de "Neuroblastoma" al tumor de origen neural que se originaba en la cavidad retroperitoneal infantil^{9, 10}.

El neuroblastoma es una enfermedad heterogénea con un amplio espectro de comportamiento clínico que causa alrededor del 15% de las muertes por tumores pediátricos¹¹. El 90% de los neuroblastomas se diagnostican por debajo de los 5 años de edad, siendo la media de edad al diagnóstico de 19 meses¹¹. Este tumor puede detectarse prenatalmente en el seno materno mediante ecografías y el 37% de los diagnósticos de neuroblastoma corresponden a pacientes lactantes^{7, 12 11}. El neuroblastoma en el paciente adulto es un evento raro y su incidencia cae por debajo de 0.2 casos por millón por año al superar los 30 años de edad¹³. La edad de presentación del paciente afecto de neuroblastoma está asociada significativamente con el pronóstico de la enfermedad, siendo los pacientes menores de 18 meses quienes tienen el mejor pronóstico en comparación con los pacientes de mayor edad^{6, 7}.

Origen y Embriología

Los tumores neuroblásticos se originan a partir de células embrionarias inmaduras de la cresta neural predestinadas a la diferenciación del sistema nervioso simpático.

La cresta neural es un tejido transitorio, pluripotente y migratorio que tiene origen en la parte más dorsal del tubo neural derivado del neuroectodermo. Las células de la cresta neural dan origen a una gran variedad de tipos celulares que incluyen las células de Schwann, las células de la médula de la glándula suprarrenal, los melanocitos, y múltiples componentes del tejido esquelético y del tejido conectivo craneofacial. El destino de las células de la cresta neural depende, en gran medida, de las rutas de migración que siguen y dónde se establecen y diferencian^{14, 15}.

Los neuroblastos derivados de la cresta neural migran ventralmente y de forma paralela a la aorta dorsal fetal para formar una columna longitudinal paralela a la aorta dorsal fetal. Esta disposición longitudinal de los neuroblastos dará lugar a la cadena simpática paravertebral, la médula de la glándula suprarrenal y el conjunto del tejido paraganglionar. Durante esta migración las células de la cresta neural van perdiendo la pluripotencialidad a la vez que se van diferenciando. La médula suprarrenal y los paraganglios son ganglios simpáticos inervados por el sistema nervioso simpático y están especializados en la síntesis y liberación de catecolaminas: adrenalina y noradrenalina. En la médula de la glándula suprarrenal se localizan los nódulos neuroblásticos que permanecen ahí hasta la semana 24 de gestación, momento en el cual comienza la diferenciación. La diferenciación de los nódulos neuroblastos en células neuroendocrinas sucede por la acción paracrina de los glucocorticoides. Después

del proceso de diferenciación y maduración los nódulos neuroblásticos desaparecen prenatalmente de forma natural y progresiva. Es posible detectar nódulos neuroblásticos postnatalmente y este hecho que se define como neuroblastoma *in situ* o microscópico¹⁶.

Un bloqueo en la migración y diferenciación normal de los neuroblastos da lugar a los tumores neuroblásticos que conforman un grupo de tumores morfológica, genética y biológicamente heterogéneos^{17, 18}.

Presentación clínica

Debido a su origen embrionario, el neuroblastoma puede desarrollarse en cualquier localización del sistema nervioso simpático^{7, 19}. La inmensa mayoría de los tumores primarios se localizan en el abdomen (65%), principalmente en la médula de la glándula suprarrenal, en los ganglios simpáticos paraespirales y de forma menos frecuente en el nervio paraespinal del pecho (20%), cuello (<5%) y pelvis (<5%)^{20, 21}.

Tanto la presentación clínica como los síntomas del neuroblastoma son muy variables y dependientes de la localización del tumor primario, así como de la presencia y localización de las metástasis²². Existen tres tipos de presentación clínica del neuroblastoma: Tumores locoregionales localizados, Tumores Metastásicos y Tumor Metastásico Especial (4S).

Neuroblastoma Localizado

Alrededor del 40% de los pacientes se presentan con enfermedad localizada. Estas masas tumorales pueden llegar a ser muy grandes e invasivas a nivel local, con posible afectación de ganglios adyacentes pero sin afectación a ganglios distales o presencia de metástasis⁷.

Cuando los tumores se localizan en la cavidad abdominal o torácica, el cuadro clínico del paciente se suele manifestar mediante signos de distensión abdominal y/o dificultad respiratoria al comprimir por efecto de masa los pulmones⁷.

Los tumores de localización paraespinal tienden a crecer a través de los forámenes de conjunción intervertebral y a manifestarse mediante signos de compresión medular. Estos tumores generan déficit motores en los pacientes y pueden dar lugar a dolores de espalda, alteraciones de esfínteres y en algunos casos alteraciones sensitivas⁷. El neuroblastoma cervical suele presentarse en asociación con el Síndrome de Horner (<http://www.orpha.net; ORPHA:91413>), compuesto por miosis, ptosis palpebral y enoftalmos, o heterocromía del iris^{7, 19}. Pacientes con tumores localizados en la región de conjunción paraespinal, con invasión del canal medular de larga evolución, pueden presentar síntomas clínicos crónicos tales como la alteración de la motilidad intestinal normal⁷.

Altas concentraciones de catecolaminas o sus metabolitos (ácido vanilmandélico y ácido homovanílico) pueden encontrarse en la sangre u orina en el 90-95% de los pacientes afectados de neuroblastoma. La detección de concentraciones anormales de catecolaminas es un marcador de la enfermedad y puede causar hipertensión^{21, 22}.

La capacidad de maduración sin progresión tumoral es un fenómeno biológico propio del neuroblastoma locoregional, sin embargo, existe un subgrupo de tumores locoregionales con una evolución clínica agresiva²¹⁻²³.

Neuroblastoma Metastásico

Alrededor del 60% de los pacientes con neuroblastoma presentan enfermedad metastásica al debut. Habitualmente metastásico son niños mayores de 18 meses, Los tumores metastásicos se comportan de forma agresiva y pueden presentar una rápida progresión clínica. Los síntomas que presentan los pacientes con neuroblastoma metastásico son de carácter general ya que transcurren con dolor, fiebre y afectación del estado general con astenia y palidez. Las localizaciones metastásicas más comunes son huesos (60%), médula ósea (50%), ganglios linfáticos (42%) e hígado (15%)^{21, 22, 24}. Una localización que no es frecuente al diagnóstico, pero cada vez está siendo más habitual durante la progresión de la enfermedad, es la metástasis en el sistema nervioso central^{7, 25}.

Una de las manifestaciones clínicas del neuroblastoma metastásico más evidente son los hematomas bilaterales periorbitarios, característicos de las metástasis de hueso y médula ósea de la base del cráneo o en órbita, que dan lugar al llamado ojo de panda o “raccoon eyes”.

Regresión espontánea

Un 5% de los neuroblastomas metastásicos se desarrollan en pacientes lactantes (<1 año de edad). Estos tumores pueden presentarse en localización torácica o abdominal asociados a metástasis en hígado, presencia de nódulos subcutáneos y posible infiltración de médula ósea (<10%), en ausencia de metástasis óseas^{6, 7, 26}. Cuando el neuroblastoma metastatiza subcutáneamente en lactantes, lo hace en forma de nódulos múltiples y duros de apariencia gris-azulada dando un fenotipo conocido como “Blueberry Muffin baby”.

La característica esencial e impactante de estos tumores, llamados 4s de especial (*special* en inglés), es la regresión espontánea sin tratamiento. Sin embargo, en casos concretos donde los lactantes muestran una rápida y extensa expansión intrahepática (Síndrome de Pepper) con compromiso de la función respiratoria, es necesario iniciar tratamiento con quimioterapia. Esta quimioterapia suele desencadenar la rápida regresión del tumor. La rápida regresión del tumor puede dar lugar a toxicidad por alta concentración de toxinas derivadas de la muerte celular tumoral^{19, 27}.

Diagnóstico

El diagnóstico del neuroblastoma requiere una amplia serie de pruebas clínicas, incluyendo imágenes radiográficas, pruebas de laboratorio y la evaluación histológica del tumor. El diagnóstico de neuroblastoma se basa en la presencia de características histopatológicas del tejido tumoral o la presencia de células tumorales en un aspirado o biopsia de médula ósea, acompañada de concentraciones elevadas de catecolaminas urinarias⁷.

El estudio de extensión de la enfermedad se realizan mediante pruebas de imagen para delimitar la localización, presencia de calcificaciones, los márgenes del tumor primario, así como identificar posibles lesiones metastásicas en médula ósea, órganos y ganglios linfáticos tanto adyacentes como a distancia⁶.

La tomografía axial computarizada (TAC) es el método indicado para la evaluación de tumores en el abdomen, pelvis o mediastino, mientras que la resonancia magnética nuclear es el método más adecuado para estudiar las lesiones paraespinales, y es esencial a la hora de

evaluar la extensión de la enfermedad presente en los forámenes de conjunción intervertebrales.

La técnica empleada para detectar de forma sensible y específica las metástasis de neuroblastoma en hueso, así como presencia de enfermedad en tejido blando, es la gammagrafía con metayodobencilguanidina (MIBG)^{6, 28, 29}.

Las células neuroblásticas metastásicas migran habitualmente a la médula ósea. El estudio de la enfermedad mínima residual en la médula ósea permite realizar un seguimiento de la evolución clínica de la enfermedad y evaluar así la respuesta al tratamiento de un paciente o su supervivencia libre de evento. El grado de infiltración de células neuroblásticas en la médula ósea puede determinarse mediante técnicas tales como la inmunocitología o la cuantificación de los niveles de expresión de marcadores, como GD2 sintetasa, *TH* (Tyrosine Hydroxylase), *CCND1* (Cyclin D1), *PHOX2B* (Paired-like homeobox 2b), *DCX* (Doublecortin) o *DDX53* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 53 o CAGE) por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR, del inglés quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) en muestras de aspirados de médula ósea^{6, 7, 21, 22, 30-32}.

Sistema de clasificación

Durante las últimas tres décadas se han desarrollado múltiples sistemas de estratificación del neuroblastoma, siendo el sistema más aceptado el Sistema Internacional de Estadaje del Neuroblastoma (INSS, International Neuroblastoma Staging System)³³. Este sistema está basado en criterios clínicos (la edad del paciente y la extensión de la enfermedad) y quirúrgicos (evaluación del resto tumoral posquirúrgico). Con todo ello se puede clasificar el neuroblastoma en los siguientes estadios:

- Estadio 1: Tumor localizado confinado a su región de origen. Resección macroscópicamente completa. Sin metástasis a ganglios.
- Estadio 2A: Tumor unilateral con resección incompleta. Sin metástasis a ganglios.
- Estadio 2B: Tumor unilateral con resección completa o incompleta. Con metástasis a ganglios linfáticos ipsilaterales pero no en los ganglios contralaterales.
- Estadio 3: Tumor que infiltra a través de la línea media, con o sin afectación de los ganglios linfáticos regionales; o tumor unilateral con afectación de los ganglios linfáticos contralaterales.
- Estadio 4: Tumor primario con diseminación tumoral a distancia: médula ósea, hueso, ganglios linfáticos a distancia, hígado u otros.
- Estadio 4S: Tumor primario definido como estadio 1 ó 2 y diseminación limitada a hígado, piel y/o médula ósea (<10% infiltración) en pacientes menores de 12 meses.

Sin embargo, a la hora de estadiar los tumores locoregionales definidos por el INSS los diferentes enfoques quirúrgicos entre instituciones tienen grandes repercusiones. Con la finalidad de definir la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico de forma homogénea que permitiese la comparación entre ensayos clínicos llevados a cabo por diferentes grupos cooperativos a nivel internacional, se generó el Sistema de Estratificación del Grupo Internacional de Riesgo de Neuroblastoma (INRGSS)³⁴. El INRGSS incorporaba los factores clínicos y biológicos adicionales a las categorías del INSS como resultado de los avances en el conocimiento de la biología y la genética del neuroblastoma. Este sistema de Estratificación determina la extensión de la enfermedad en base a la presencia o ausencia de factores de riesgo definidos por imagen y/o enfermedad metastásica en el momento del

diagnóstico, previamente a cualquier tratamiento o cirugía. De esta forma se definen los estadios de la enfermedad como locales (L1 y L2) o metastásicos (M y MS) (Tabla 1).

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	MYCN	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group	
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low	
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low	
				Amp			K High	
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low	
					Yes		G Intermediate	
					No		E Low	
	≥ 18	GNB nodular; neuroblastoma	Differentiating	NA	Yes		H Intermediate	
					Poorly differentiated or undifferentiated	NA		
						Amp		N High
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F Low	
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate	
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate	
	< 18			Amp			O High	
	≥ 18						P High	
MS	< 18			NA	No		C Very low	
					Yes		Q High	
						Amp		R High

Tabla 1: Esquema de estratificación INRG. GN: Ganglioneuroma; GNB: Ganglioneuroblastoma; NA: no amplificado; A: Amplificado. (Cohn *et al.* JCO. 2009)³⁴.

Histología de los tumores Neuroblásticos

Histológicamente los tumores neuroblásticos presentan un amplio espectro de diferenciación. Están compuesto por dos componentes celulares: células neuroblásticas y células estromales de tipo Schwann. El grado de diferenciación de las células neuroblásticas y la proporción de células estromales determina la clasificación histológica de los tumores neuroblásticos en neuroblastoma, ganglioneuroma y ganglioneuroblastoma (Figura 1).

Neuroblastoma

El neuroblastoma es un tumor compuesto por células neuroblásticas en su mayoría y pobre en estroma, con menos del 50% de células de Schwann. El Neuroblastoma se clasifica dependiendo del grado de diferenciación de las células neuroblásticas: indiferenciado, pobremente diferenciado y en diferenciación³⁵.

El Neuroblastoma indiferenciado: Su componente neuroblástico es indiferenciado, las células son pequeñas con núcleo redondeado, azul (tinción hematoxilina-eosina) y de escaso citoplasma. Se componen de cromatina granular gruesa que suele denominarse en “sal y pimienta” y pueden contener más de un nucléolo. Las células no muestran signos de diferenciación y son difíciles de distinguir las unas de las otras³⁶.

El neuroblastoma pobremente diferenciado: El componente neuroblástico es mayoritariamente indiferenciado presentando únicamente el 5% de los neuroblastos indicios de diferenciación tales como cierto grado de neuropilo (formado por un fondo fibrilar eosinófilo) y/o presencia de rosetas de Homer-Wright (caracterizadas por un lumen central relleno de neuropilo rodeado por un halo de células tumorales).

El neuroblastoma en diferenciación: Está compuesto por abundante neuropilo y más de un 5% de los neuroblastos muestran signos de diferenciación a células ganglionares, tales como presencia de neuropilo o rosetas de Homer-Wright. Se trata de células neuroblásticas de núcleo grande, nucléolos prominentes, cromatina vesicular y un citoplasma grande y eosinófilo.

Ganglioneuroma

El ganglioneuroma está compuesto principalmente por células de Schwann y las células ganglionares. El grado de maduración lo determinan las células ganglionares pudiendo darse el ganglioneuroma en maduración o maduro.

- Ganglioneuroma en maduración: está formado por un estroma rico en células de Schwann y focos de neuroblastos con claros signos de diferenciación o células ganglionares en maduración.
- Ganglioneuroma maduro: se caracteriza por la presencia de estroma glial maduro y únicamente células ganglionares maduras en ausencia de componente neuroblástico.

Ganglioneuroblastoma

El ganglioneuroblastoma es un tumor que combina características del neuroblastoma y del Ganglioneuroma.

- Ganglioneuroblastoma intermedio: Es un tumor compuesto por más del 50% de células de Schwann, presenta focos de células neuroblásticas y células ganglionares en un fondo de neuropilo abundante. Los focos de células neuroblásticas están formados por una mezcla de neuroblastos en diferentes estados de diferenciación, mientras que el fondo se haya compuesto por tejido gangliomatoso.
- Ganglioneuroblastoma nodular: Es un tumor donde coexisten nódulos neuroblásticos indiferenciados macroscópicos y frecuentemente hemorrágicos, con ganglioneuroblastoma intermedio o ganglioneuroma en diferentes momentos de maduración.

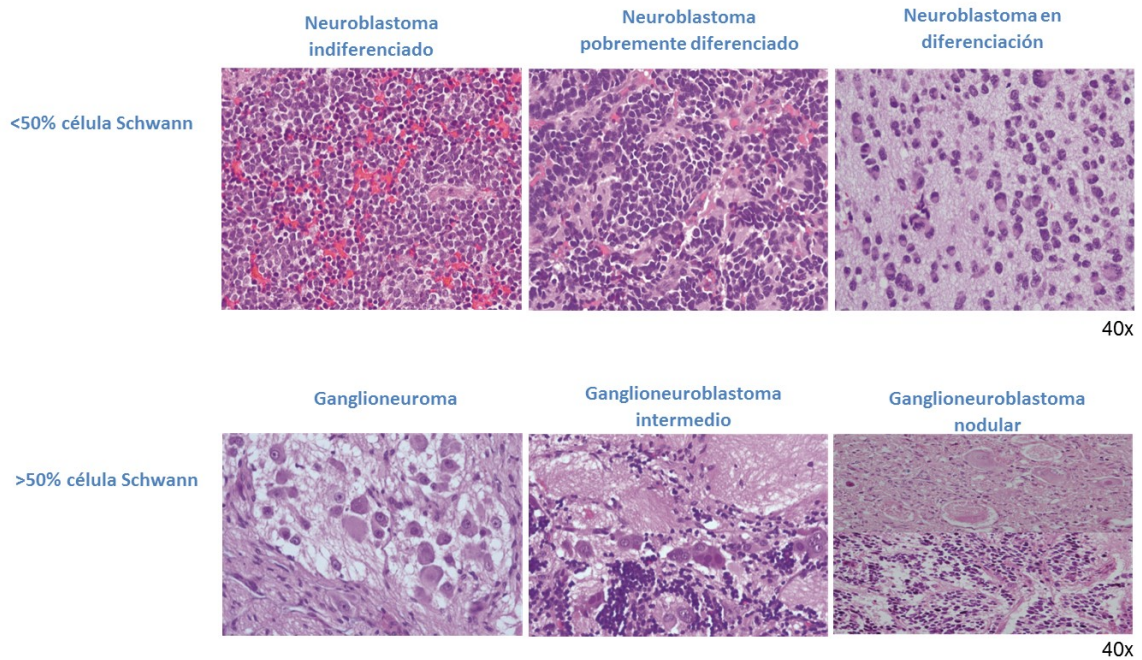


Figura 1: Histología de los tumores neuroblásticos. Dra, M.Suñol, Departamento Anatomía patológica. Hospital Sant Joan de Déu.

Alteraciones Genéticas Recurrentes en el Neuroblastoma

El neuroblastoma presenta numerosas alteraciones genético-moleculares que tienen implicación en el pronóstico y en comportamiento clínico de la enfermedad.

Amplificación del gen MYCN

El gen humano *MYCN* (v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived) se localiza en el brazo corto del cromosoma 2, 2p24. Es un miembro de la familia de oncogenes *MYC* y codifica un factor de transcripción con un dominio basic helix-loop-helix (bHLH). La proteína *MYCN* forma heterodímeros con MAX y este complejo funciona como activador transcripcional, regulando la expresión de genes que contribuye al mantenimiento del estadio de indiferenciación y al aumento de la proliferación celular, así como evasión de la apoptosis³⁷.

La amplificación de *MYCN* (5 copias o más de *MYCN* que de centrómero del cromosoma 2) sólo se halla presente en un 20-25% de neuroblastomas, pero es el factor pronóstico independiente más importante en estos tumores y todavía hoy es el único marcador genético utilizado para la estratificación de pacientes en los ensayos clínicos de neuroblastoma^{7, 38-40}. La amplificación de *MYCN* se asocia con rápida progresión tumoral y pronóstico desfavorable en pacientes de todas las edades y estadios, aunque los pacientes de estadios 1 y 2 que tienen amplificación de *MYCN*, presentan un pronóstico algo mejor si su contenido total de DNA es hiperdiploide^{7, 15, 39, 40}. La amplificación del oncogén *MYCN* se ha relacionado con la pérdida alélica del locus 1p en neuroblastoma y se presenta de forma excluyente a la alteración genética de pérdida de la región 11q⁴¹.

El mecanismo responsable de la amplificación de *MYCN* es desconocido. Se producen de manera aberrante copias adicionales del locus de *MYCN* en forma de elementos extra-cromosómicos circulares (double minutes) o copias que se acumulan en contigüidad al locus normal, integradas en el cromosoma, dando lugar a la aparición de regiones identificadas por citogenética como teñidas homogéneamente (homogeneous staining regions) ⁴².

Pérdida 1p

En neuroblastoma se identifica la pérdida de la región cromosómica 1p pérdida en un 25-35% de los tumores primarios, asociada principalmente con tumores de mal pronóstico, siendo más común en tumores metastásicos. La pérdida del 1p (1p36) se ha descrito asociada a otras alteraciones recurrentes en neuroblastoma como la amplificación del oncogén *MYCN* y la ganancia de la región cromosómica 11q ^{21, 22, 38, 43}.

En brazo corto del cromosoma 1 han sido identificados potenciales genes supresores de tumores tales como *CAMTA1* (Calmodulin binding transcription activator 1), *CHD5* (Chromodomain helicase DNA binding protein 5), *RIZ* (Retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene) y *CASZ1* (Castor zinc finger 1) entre otros ^{38, 44-49}.

Ganancia del cromosoma 17

La ganancia total o parcial del cromosoma 17 es la anomalía más frecuente en el neuroblastoma ya que se encuentra aproximadamente en el 80% de los casos ^{18, 40}. Cuando la ganancia es del cromosoma completo se asocia a tumores con menor agresividad, cuasi-triploides (40%), que tienden a presentar un pronóstico favorable. Sin embargo cuando la ganancia del cromosoma 17 es segmentaria (17q), evento que sucede en menos del 50% de los neuroblastomas, este se relaciona con tumores de comportamiento agresivo ³⁸. La ganancia segmentaria se obtiene como producto de una translocación desequilibrada que sucede entre el cromosoma 17, mayoritariamente de la región 17q21-qter, con múltiples regiones receptoras, entre ellas habitualmente asociado con el segmento distal del cromosoma 1 (1p36) u 11 ^{7, 18, 50, 51}.

Se han descritos varios genes relevantes localizados en esta región que se encuentran sobreexpresados en neuroblastoma tales como *BIRC5* (Baculoviral IAP repeat containing 5), *NME1* (Non metastatic cells 1) y *PPM1D* (Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D) ^{7, 18, 40, 52}.

Pérdida del cromosoma 11

La pérdida de la región cromosómica 11q se identifica entre un 35 y un 45% de los neuroblastomas primarios. Se encuentra asociada a un bajo índice de supervivencia ^{7, 38, 53}. La pérdida del cromosoma 11 se encuentra asociada directamente con la pérdida de la región 14q e inversamente con la pérdida 1p36 y la amplificación de *MYCN* ^{19, 38}.

Ploidía

El contenido de ADN de los neuroblastomas tiene valor pronóstico ya que la mayoría de los tumores de pronóstico favorable tienen un contenido total de ADN (ploidía) hiperdiploide, cuasi-triploide (de 58 a 80 cromosomas) caracterizado por ganancias y pérdidas de cromosomas enteros, mientras que los neuroblastoma de pronóstico desfavorable, habitualmente metastásicos, presentan un contenido de ADN frecuentemente cuasi-diploide (de 44 a 57 cromosomas) caracterizados por múltiples pérdidas y ganancias segmentales⁵⁴⁻⁵⁷.

Predisposición Genética a Neuroblastoma

Alrededor del 1% de los casos corresponden a neuroblastoma familiar. Mutaciones en línea germinal del gen *ALK* y del gen *PHOX2B* causan neuroblastoma familiar con alta penetrancia, aunque los alelos mutantes de *ALK* y *PHOX2B* son muy raros en la población y se heredan de forma autosómica dominante^{6, 20, 58-60}. La mutación en el gen *PHOX2B* se encuentra frecuentemente asociado a neurocristopatías tales como el Síndrome de Ondina (<http://www.orpha.net>; ORPHA:661) también conocido como Síndrome de Hipoventilación Central Congénita⁶¹⁻⁶⁴. Mutaciones en otros genes en línea germinal tales como *TP53*, *NRAS* y *BRCA2*, predisponen a neuroblastoma, sin embargo la relevancia clínica de muchas de estas mutaciones no ha sido plenamente demostrada. Varios polimorfismos comunes (como *BARD1* o *LMO1*) que individualmente tienen un efecto relativamente pequeño en la iniciación tumoral, pueden cooperar para inducir neuroblastoma esporádico⁶. Otras alteraciones en línea germinal se han asociado con neuroblastoma congénito tales como deleciones en el locus del cromosoma 1p36 o en el 11q14-23^{65, 66}.

Mutaciones Somáticas Recurrentes en Neuroblastoma

Los tumores pediátricos en general tienen una frecuencia menor de mutaciones somáticas, del orden de 100 veces menos, que los cánceres del adulto⁶⁷.

El gen más frecuentemente mutado en neuroblastoma es *ALK* (2p23.1). El 14% de los neuroblastomas presentan alteraciones en este gen, ya sea mediante mutaciones de cambio de sentido (*missense*) (3-4%) o amplificación génica (3-11%)⁶⁸⁻⁷⁰. Un 10% de los neuroblastomas, con mayor incidencia en pacientes adolescentes, presentan mutaciones que causan pérdida de función en el gen *ATRX* (a-thalassemia/mental retardation syndrome X linked). Otras proteínas remodeladoras de la cromatina como los genes *ARID1A/1B* (AT-rich interactive domain 1A/1B) se encuentran alteradas en un 6-7% de los neuroblastomas mediante mutación puntual o deleciones. Se suelen encontrar asociados al neuroblastoma clínicamente agresivo⁶⁸.

Existen otras mutaciones somáticas detectadas en neuroblastoma en genes como *PTPRD*, *ODZ3* (odd Oz/ten-m homolog 3), *PTPN11* (protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 11), *MYCN* y *NRAS* (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog), pero cuya incidencia es por debajo del 5% de los neuroblastomas primarios)⁶⁸⁻⁷⁰.

Tratamiento

El neuroblastoma locoregional tiene excelente supervivencia global si cuenta con características genómicas favorables. En estos casos la intensidad del tratamiento es baja, ya que se tratan únicamente con cirugía o con quimioterapia de baja intensidad. Sin embargo, existe un subgrupo de tumores locoregionales de alto riesgo clínico, que exhiben una evolución clínica agresiva debido a que presentan alteraciones asociadas a pronóstico desfavorable, que precisan de tratamiento de alta intensidad^{21, 71}.

Aunque en las últimas décadas se ha observado una mejora sustancial en el resultado general de los pacientes con neuroblastoma, el resultado en los niños afectados de neuroblastomas metastásicos y/o de alto riesgo clínico ha mejorado modestamente, con una supervivencia a largo plazo inferior al 40%⁷. El neuroblastoma de alto riesgo se encuentra asociado a una proliferación agresiva y resistente al tratamiento. En el neuroblastoma de alto riesgo el tratamiento es multimodal y de alta intensidad que incluye cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. Los índices de supervivencia de los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo se encuentran por debajo del 50%⁶⁸⁻⁷³.

En los lactantes con neuroblastomas estadio 4S, se observa con frecuencia una regresión espontánea del tumor sin tratamiento. Únicamente se aplica tratamiento de baja intensidad, en aquellos casos donde debido a la localización del tumor por localización exista un compromiso respiratorio severo que haga peligrar la vida del paciente^{6, 7}.

Meduloblastoma

El meduloblastoma representa un grupo heterogéneo de tumores embrionarios neuroepiteliales del cerebelo caracterizados por tener comportamiento clínico, histopatología, biología e índices de curación diversos⁷⁴.

El meduloblastoma originariamente se identificó como glioma del cerebelo hasta el 1925, cuando los doctores Bailey y Cushing lo identificaron como una enfermedad diferente y lo denominaron meduloblastoma^{75, 76}.

El meduloblastoma es el tumor cerebral maligno más común en la edad pediátrica y representa aproximadamente el 20% de los tumores pediátricos de sistema nervioso central^{74, 77, 78}. En los países desarrollados, el meduloblastoma es la causa más común de muerte por cáncer en niños mayores de 1 año de edad^{78, 79}. La edad de presentación de la enfermedad es variable, y puede desarrollarse tanto en niños pequeños como en adolescentes, con un pico de incidencia en niños de 3 a 6 años de edad. El meduloblastoma en jóvenes adultos es un evento raro⁸⁰.

Origen y Embriología

El meduloblastoma es un tumor embrionario neuroepitelial maligno que emerge del cerebelo y cuyo origen se establece en algún momento durante el desarrollo embrionario del cerebelo⁷⁷.

El cerebelo primordial se establece en el techo del metaencéfalo en el embrión, a partir de los labios rombóticos derivados de las placas alares del metaencéfalo⁷⁷. En contraposición a otras regiones cerebrales, las células del cerebelo derivan de dos zonas germinales diferentes que emergen de los labios rombóticos. La zona germinal primaria se sitúa en el techo del cuarto ventrículo y genera las neuronas de proyección glutamatérgica del núcleo profundo que migran y dan lugar a las neuronas GABAérgicas que incluyen aquellas del núcleo profundo, las células de Purkinje y las neuronas de Golgi.

El cerebelo está dividido en tres partes que de más superficial a más interna se compone del córtex, derivado de las capas granulares, la materia blanca derivada de las células madres de materia blanca y el núcleo cerebelar, derivadas de los precursores de neuronas glutamatérgicas^{77, 81, 82}. Posteriormente, las porciones laterales del cerebelo crecen marcadamente y originan los lóbulos laterales o hemisferios cerebelosos que quedan unidos en la línea media por el vermis cerebeloso.

El cerebelo incluye tres tipos de células progenitoras que presentan vías de señalización diferentes durante los diferentes momentos de la embriogénesis. Las alteraciones de las vías moleculares de estas células progenitoras durante la formación del cerebelo pueden dar lugar a diferentes anomalías, y se ha propuesto como posible origen del meduloblastoma^{77, 83}.

Presentación clínica

Aproximadamente un 75% de los meduloblastomas de la edad pediátrica tienen origen en el *vermis* cerebeloso, y protruyen hacia el cuarto ventrículo, y el restante 25% se localizan en los hemisferios cerebelosos. Las células tumorales pueden invadir el córtex, la materia blanca

profunda y el núcleo cerebeloso profundo del cerebelo, y frecuentemente ocupan el espacio subaracnoideo.

Los síntomas más comunes de presentación clínica son dolor de cabeza, vómitos y ataxia. Adicionalmente puede observarse letargo, discapacidad motora, parálisis visual debida a la hidrocefalia, vértigos, pérdida auditiva, cambios de comportamiento e irritabilidad⁸⁴.

Alrededor de un 30% de los casos pediátricos presentan metástasis en el momento del diagnóstico⁷⁴. La mayoría de las metástasis se desarrollan en el sistema nervioso central, espinal o craneal. La propagación a los órganos extracraneales es muy rara al diagnóstico. Estos casos pueden cursar con dolor extracraneal como dolor de espalda en los casos de metástasis espinales.

En una minoría de pacientes, el meduloblastoma está asociado con el síndrome de Gorlin (<http://www.orpha.net>; ORPHA:377), la poliposis adenomatosa o con el síndrome de Li-Fraumeni (<http://www.orpha.net>; ORPHA:616)^{85, 86}.

Diagnóstico de Meduloblastoma

El diagnóstico de meduloblastoma se basa en la presencia de características histopatológicas propias del tejido tumoral en combinación con imágenes radiográficas características del meduloblastoma.

En el TAC el meduloblastoma aparece como una masa sólida y homogénea localizada en línea media de la fosa posterior. Los cambios quísticos así como las calcificaciones aparecen en un bajo porcentaje (22%)⁸⁷.

Las células metastásicas de meduloblastoma diseminan a líquido cefalorraquídeo (LCR). Aproximadamente un 30% de los pacientes presentan diseminación al diagnóstico y esta probabilidad aumenta en niños de menor edad. La detección de células de meduloblastoma en LCR se realiza mediante una citología de LCR por punción lumbar. Mediante la RM puede evaluarse la presencia de enfermedad diseminada a leptomeninges en la médula espinal y otras partes del cerebro⁸⁷.

El diagnóstico diferencial del meduloblastoma se plantea, macroscópicamente, con otros tumores de fosa posterior (*vermis* cerebeloso) como el astrocitoma pilocítico y el ependimoma. El tumor teratoide rabdoide atípico también ha de barajarse en determinadas situaciones. Desde el punto de vista histológico, la confusión con el astrocitoma pilocítico es rara, con excepción de los tumores desdiferenciados, como astrocitomas malignizados o glioblastomas de esta región. Con respecto a los ependimomas, la dificultad puede plantearse en los casos de elevada densidad celular, en los que los sistemas gliovasculares pequeños pueden inducir a confusión con rosetas o pseudorosetas y con otras estructuras secundarias características de los ependimomas^{77, 88}.

Histología del Meduloblastoma

El meduloblastoma es un tumor considerado altamente maligno y corresponde a un grado IV de la clasificación de los tumores del sistema nervioso central de la Organización Mundial de la Salud (OMS). De acuerdo a la clasificación de la OMS del 2007, histológicamente el

meduloblastoma se clasifica en tres grandes grupos que incluyen el subtipo clásico, el subtipo desmoplásico/nodular (MBEN) y el subtipo de células gigantes/anaplásico (LCA)^{86, 89} (Figura 2).

El subtipo clásico representa el subgrupo histológico más común (66%) y está compuesto por capas de células indiferenciadas densamente empaquetadas de pequeño tamaño, azules y redondas con núcleos hipercromáticos de escaso citoplasma. En un 40% de los meduloblastomas subtipo clásico se forman rosetas de Homer-Wright. El subtipo clásico crece desde la parte más central del cerebelo (*vermis* cerebeloso) y presentan índices de proliferación celular variables^{90, 91}.

Las regiones que contienen nódulos con desmoplasia intranodular son características del meduloblastoma subtipo desmoplásico/nodular (MBEN). El subtipo desmoplásico/nodular (MBEN) representa el 15% de los meduloblastomas y generalmente se desarrolla en la región más lateral del hemisferio cerebeloso. El subtipo desmoplásico presenta células pequeñas azules e indiferenciadas que rodean a nódulos de isletas pálidas libres de reticulina en un fondo rico en estroma y reticulina. El subtipo anaplásico (15%) se caracteriza por un marcado pleomorfismo nuclear y un patrón celular concreto donde las células se moldean ajustándose a las células adyacentes. Este subtipo forma un continuo con la variante de célula grande (2-4%), que presenta una población celular monomorfa con nucléolo prominente. Es por ello que estos dos subtipos de pronóstico más desfavorable se han agrupado como un único grupo llamado meduloblastoma de célula grande/anaplásico (LCA, *large cell anaplastic medulloblastoma*). Todos los meduloblastomas de célula grande presentan regiones de anaplasia. Ambas variantes se caracterizan por elevada proliferación celular, abundante apoptosis y pronóstico más desfavorable⁹⁰.

El meduloblastoma al ser un tumor embrionario de origen neuroepitelial puede expresar marcadores para ambos linajes neuronal y glial. Por ello puede expresar sinaptofisina propio del linaje neuronal y proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) propio del linaje glial^{90, 92-94}.

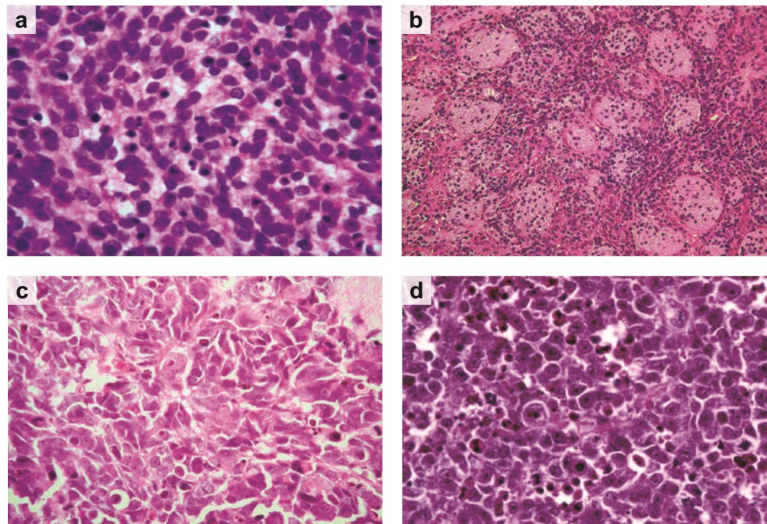


Figura 2: Variantes histológicas del meduloblastoma (Gilbertson *et al.* Ann Rev. 2008⁷⁷). (A) Subtipo Clásico. (B) Subtipo desmoplásico/nodular (MBEN). (C) Subtipo anaplásico. (D) Subtipo de célula grande.

Sistemas de Clasificación

El primer sistema de clasificación del meduloblastoma en base a la clínica fue propuesto en 1969 por el Dr. Chang⁹⁵. Se basaba en el tamaño e invasividad del tumor determinada de forma preoperatoria así como la presencia de metástasis.

Aunque el sistema de clasificación clínica propuesto por el Dr.Chang actualmente no se emplee, sentó las bases de las variables pronosticas aceptadas por el grupo de Oncología Norteamericano (*North American Children's Oncology Group (COG)*) y el la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (*International Society of Pediatric Oncology (SIOP)*)⁹⁴. Estas variables pronosticas tienen en cuenta la edad del paciente al diagnóstico, el tamaño del tumor primario, presencia de enfermedad diseminada y el grado de resección quirúrgica. La edad del paciente en el momento del diagnóstico es un factor determinante. Los meduloblastomas de riesgo estándar se dan en pacientes con 3 años o más al diagnóstico, que tras la cirugía tienen menos de 1.5 cm² de enfermedad residual y no presentan evidencias de metástasis.

Los meduloblastomas de alto riesgo se dan en pacientes menores a 3 años o en pacientes mayores que presenten evidencias de metástasis en el sistema nervioso central y/o con más de 1.5 cm² de enfermedad residual tras la cirugía^{84, 94}.

Estos sistemas de clasificación clínica empleados durante décadas, no tienen en cuenta la heterogeneidad del comportamiento clínico de estos tumores.

Subgrupos moleculares de Meduloblastoma

Durante los últimos años se han llevado a cabo varios estudios genómicos (secuenciación masiva del genoma, análisis del transcriptoma y del metiloma del ADN y estudio de las alteraciones cromosómicas) con el fin de definir las bases moleculares subyacentes al comportamiento clínico-patológico del meduloblastoma. Uno de los hallazgos más relevantes derivado de estos estudios ha sido la identificación de cuatro subgrupos principales de meduloblastoma denominados: *wingless* (WNT), *sonic hedgehog* (SHH), Grupo 3 y Grupo 4 (Figura 3). Estos subgrupos se caracterizan por tener un comportamiento clínico, un perfil transcripcional y una genética distinta^{92, 93, 96-102}.

Los subgrupos WNT y SHH llevan el nombre de las vías de señalización celular que juegan un papel importante en la patogénesis del subgrupo. La biología del Grupo 3 y Grupo 4 es más desconocida, por consiguiente se han nombrado de forma genérica hasta que no se defina la biología subyacente a su comportamiento clínico⁹⁶.

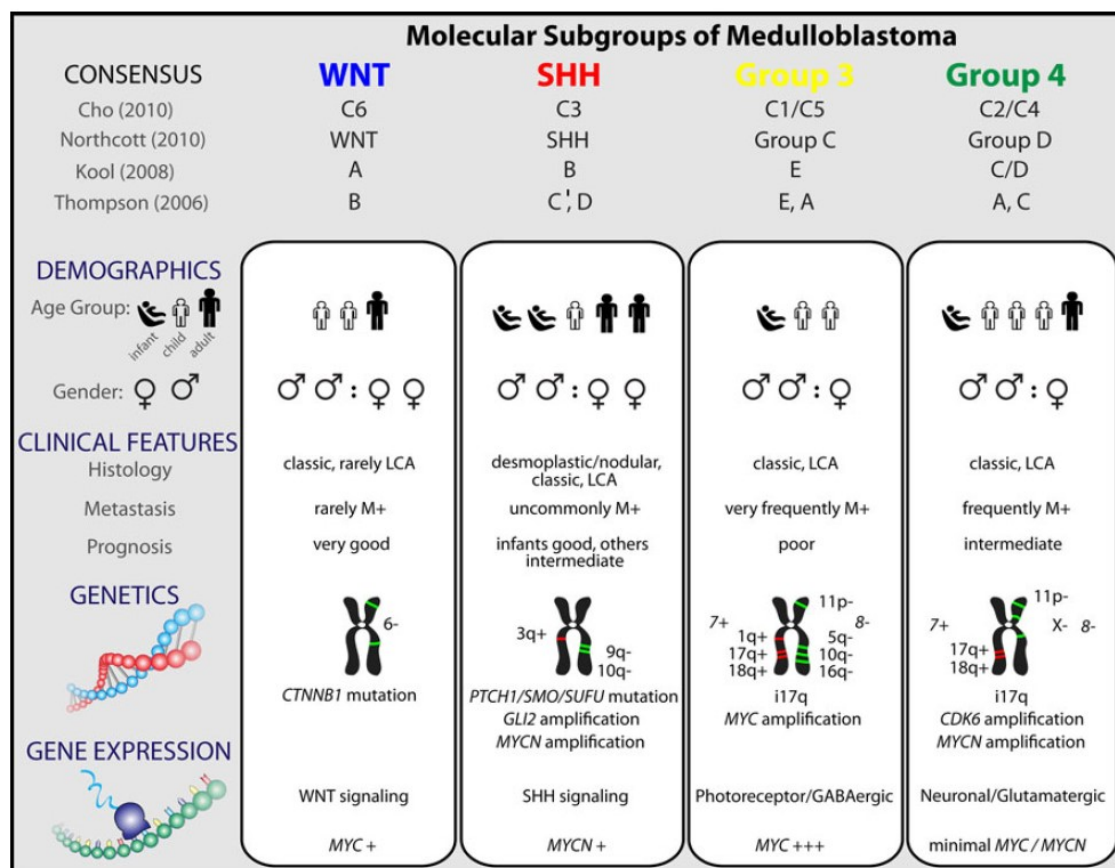


Figura 3: Comparación de los diversos subgrupos moleculares de meduloblastoma, incluyendo sus afiliaciones previamente publicadas (Taylor *et al.* Acta Neuropathol. 2012⁹⁶).

Subgrupo WNT

El subgrupo de meduloblastomas más conocido es el subgrupo WNT debido a su pronóstico excelente en comparación con el resto de subgrupos. Los índices de supervivencia global de los meduloblastomas WNT pueden superar el 90%, donde aquellos pacientes que fallecen es mayoritariamente debido a complicaciones asociadas al tratamiento o neoplasias secundarias⁹⁶. Este subgrupo representa aproximadamente el 10% de los pacientes con meduloblastomas. Normalmente afecta a pacientes mayores con una media de edad 10 años. La mayoría presentan una histología clásica y rara vez presentan metástasis. El 80-85% se asocian a presencia de monosomía del cromosoma 6⁷⁴.

El gen más recurrentemente mutado en los meduloblastomas WNT es *CTNNB1* (del inglés *catenin beta 1*), que se identifica en un 85% de los tumores analizados. Mutaciones en el gen *DDX3* se ven enriquecidas en el subgrupo WNT, pero el subgrupo SHH y Grupo 3 también pueden presentar estas mutaciones. Aproximadamente un 15% de los tumores WNT tienen mutaciones en el gen *TP53* no asociadas con el síndrome de Li-Fraumeni (mutación en *TP53* en línea germinal) o con pronóstico desfavorable^{74, 96}.

Subgrupo SHH

El subgrupo SHH representa aproximadamente el 25% de los meduloblastomas. Este subgrupo se caracteriza por aberraciones en la vía de señalización de SHH y se encuentra frecuentemente asociado a mutaciones en los genes *PTCH1* (Protein patched homolog 1), *SUFU* y *SMO*^{83, 86}. La histología mayoritaria en este subgrupo de meduloblastomas es la desmoplásica nodular o LCA. Este subtipo tiende a presentarse en niños muy pequeños. El pronóstico es bastante variable y dependiente de la edad del paciente: niños pequeños con SHH tratados exclusivamente con quimioterapia tienen pronóstico excelente, mientras pacientes mayores con SHH asociado a mutaciones en *TP53* tienen pronóstico desfavorable, especialmente si presentan amplificación de los genes *MYCN* y *GLI2*⁷⁴.

Subgrupos 3 y 4

El Grupo 3 y Grupo 4 constituyen el 25% y 35% de los meduloblastomas, respectivamente. Aun siendo genéticamente distintos, estos dos subgrupos presentan numerosas alteraciones genéticas comunes. Hasta la fecha, no se ha hallado un patrón específico que los distinga en Grupo 3 y Grupo 4 de forma concluyente. Ambos grupos son más frecuentes en niños, y el isocromosoma 17q solo se presenta en estos tumores, siendo más frecuente en el Grupo 4 (80%) que en el Grupo 3 (26%). Los meduloblastomas del Grupo 3 y Grupo 4 muestran una frecuencia baja de mutaciones recurrentes. Se ha descrito la activación de la expresión de la familia de proto-oncogenes *GFI1* (Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor) y *GFI1B* (Growth Factor Independent 1B Transcriptional Repressor) mediante un mecanismo de “hijacking” (secuestro) de “enhancers” (potenciadores)⁷⁹. Esta alteración genética *GFI1/GFI1B* está activa en aproximadamente un 40% y 10% de los tumores del Grupo 3 y Grupo 4, respectivamente. Los meduloblastomas Grupo 3 se asocian a histología LCA y diseminación metastásica (50%). También se caracterizan por sobre-expresión de *MYC* (17% presenta amplificación de *MYC*). La presencia de enfermedad metastásica, isocromosoma 17q y amplificación de *MYC* confiere al Grupo 3 un pronóstico desfavorable. Los tumores del Grupo 4 habitualmente poseen una histología clásica, y en ocasiones histología LCA. Los pacientes tienen un pronóstico intermedio. La amplificación del oncogén *MYCN* en estos tumores, a diferencia de los SHH, no se asocia a pronóstico desfavorable. Pacientes con enfermedad metastásica tienen mayor riesgo de recaída, excepto si el tumor pierde el cromosoma 11 y gana el cromosoma 17, que parece identificar un subgrupo de pronóstico más favorable^{74, 96}.

Los subgrupos WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4 de meduloblastoma han adquirido cada vez más relevancia tanto para definir de forma más precisa el pronóstico clínico o el tratamiento de los pacientes, como para el diseño de ensayos clínicos. Por ejemplo, dado el pronóstico favorable del subgrupo WNT, estos pacientes podrían beneficiarse de una reducción u omisión de la radioterapia o quimioterapia, limitando de esta forma los efectos neurológicos adversos y toxicidades. Por el contrario, pacientes Grupo 3 con pronóstico desfavorable podría beneficiarse de una intensificación del tratamiento de primera línea.

En 2015, la conferencia consenso de la OMS reconoció la importancia de estos grupos biológicos e introdujo las siguientes entidades definidas genéticamente en la última revisión de la clasificación de los tumores del sistema nervioso central publicada en 2016: WNT, SHH-TP53 no mutado (*TP53 wild-type*); SHH-TP53 mutado, y Grupo no-WNT/no-SHH. El Grupo 3 y Grupo 4, al tener un cierto grado de similitud y al coincidir algunas de las características genéticas, han sido incluidos de forma provisional en el subgrupo de meduloblastoma no-WNT/no-SHH^{85, 89}.

Definición de subgrupos moleculares

La metodología utilizada para definir el subgrupo molecular del meduloblastoma ha cambiado a lo largo de los últimos años. Inicialmente se realizaba mediante un análisis de expresión génica basado en tecnología de *microarray*, para ello era necesario partir de muestras de tejido fresco congelado⁹³. También existen métodos para el análisis de los niveles ARN en tejido fijado e incluido en parafina, sin embargo la precisión es inferior, especialmente cuando se trata de muestras más antiguas.

También se ha propuesto utilizar como metodología alternativa un análisis de un panel de marcadores mediante técnica de inmunohistoquímica pero se ha demostrado que es difícil de estandarizar en los laboratorios de neuropatología⁹³.

Actualmente se utilizan dos estrategias para la clasificación de estos tumores: 1) tecnología basada en la cuantificación de niveles de ARN mediante el empleo del sistema *NanoString nCounter System* (NanoString Technologies, Inc.)⁹⁹ y 2) tecnología de *microarrays* de alta densidad (*Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip array* (HM450K)) para analizar el perfil de metilación del genoma completo (ADN) de los tumores¹⁰⁰.

La tecnología *NanoString nCounter System* está basada en un análisis no enzimático con sondas secuencia-específicas para la cuantificación digital de los niveles de múltiples ARN diana en una muestra. En 2012, el grupo del Dr. Taylor del *Sick Children's Hospital* de Toronto identificó 22 genes cuyos niveles de expresión permiten clasificar los meduloblastomas⁹⁹. El mismo grupo ha desarrollado un ensayo que consta de una librería de sondas para la cuantificación de ARN que permite cuantificar los niveles de expresión de los 22 genes mediante un analizador digital. Esta metodología es aplicable tanto a muestras de tejido fresco congelado como tejido fijado en formalina e incluido en parafina⁹⁹. El análisis mediante *NanoString nCounter* ha mostrado ser fiable y reproducible, pero el coste elevado del analizador digital ha limitado la aplicabilidad en la práctica clínica. Actualmente el ensayo no es comercial y el análisis de la firma de 22 genes está centralizado en el *Sick Children's Hospital* de Toronto, Canada.

El *microarray* HM450K interroga el estado de metilación de más de 450.000 citosinas a lo largo de todo el genoma. Cubre el 96% por ciento de las islas de dinucleótidos citosina-guanina (CpG) de todo el genoma, múltiples CpG "shores" (orillas) y CpGs aislados localizados en regiones tanto intragénicas como intergénicas (Ver apartado *microarrays Infinium*). Esta metodología ha demostrado ser fiable para la clasificación de los meduloblastomas en subgrupos tanto con tejido fresco congelado como fijado en formalina e incluido en parafina. Sin embargo, la utilidad del HM450K en la práctica clínica se ve limitada por el número extremadamente elevado de datos que genera el *microarray*, la dificultad del procesamiento de los datos y la dificultad del análisis masivo de grandes cantidades de datos de metilación que hacen necesario el empleo de tecnología computacional, de métodos bioinformáticos y estadísticos complejos, personal especializado y cantidades elevadas de tejido adecuado. Finalmente, la tecnología de *microarray* tiene un coste económico elevado. Por todo ello, esta estrategia de clasificación de los meduloblastomas mediante tecnología de *microarrays* HM450K está centralizada en el *German Cancer Center* de Heidelberg, Alemania.

Tratamiento

El tratamiento del meduloblastoma depende de la edad, la diseminación de la enfermedad, la variante histológica y las características moleculares del tumor. En la actualidad el tratamiento para meduloblastoma incluye resección quirúrgica, radioterapia craneoespinal en pacientes mayores de 3 años y quimioterapia adyuvante⁷⁴.

Los grupos de riesgo se definieron basándose en las tasas de supervivencia actuales: bajo riesgo (>90% de supervivencia), riesgo medio (estándar) (75-90% de supervivencia), alto riesgo (50-75% de supervivencia) y riesgo muy alto (<50% de supervivencia). El subgrupo WNT y los tumores no metastásicos del Grupo 4 con pérdida completa del cromosoma 11 o ganancia completa del cromosoma 17, se reconocieron como tumores de bajo riesgo y se está considerando aplicar terapias de intensidad reducida adaptadas al riesgo de estos pacientes mediante ensayos clínicos internacionales¹⁰³. El grupo de alto riesgo está compuesto por pacientes con tumores metastásicos de los subgrupos moleculares SHH o Grupo 4, y los meduloblastomas SHH con amplificación del oncogén *MYCN*. Los pacientes de muy alto riesgo son aquellos del Grupo 3 con metástasis o del subgrupo SHH con mutación en el gen *TP53*¹⁰⁴.

El tratamiento multimodal intensivo de los meduloblastomas ha permitido mejorar de forma significativa la supervivencia de los pacientes, con una supervivencia global a 5 años de un 80% en los casos con enfermedad de riesgo estándar y un 70% en casos de alto riesgo clínico, aunque en muchas ocasiones a expensas de secuelas severas permanentes. Estas secuelas comprenden el déficit neurocognitivo y neuroendocrino, sordera, infertilidad, problemas cardiorrespiratorios y psicosociales^{74, 98}.

Epigenética

La primera definición de epigenética (del griego epi, en o sobre, y -genética) la realizó el embriólogo y paleontólogo Conrad Hal Waddington en 1942 descrito como “la interacción casual entre genes y sus productos, que traen el genotipo a ser”^{105, 106}. Esta definición ha ido evolucionando durante los años y ha incorporado el conocimiento reciente en biología molecular hasta la actual definición de epigenética: “El estudio de los cambios de la función génica que son heredables meiótica y mitóticamente y que no suponen cambios en la secuencia del ADN”^{106, 107}.

Los mecanismos epigenéticos participan en la adquisición y mantenimiento de la identidad celular sin alterar la secuencia de ADN. La regulación epigenética se realiza mediante múltiples capas interconectadas entre sí: la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, las modificaciones de la cromatina y ARNs no codificantes tales como los miRNAs y los ARNs largos no codificantes (*long non-coding RNAs*). Todas las capas epigenéticas se encuentran finamente reguladas. Los procesos epigenéticos son esenciales tanto para el desarrollo como para la diferenciación, ya que son cruciales para establecer el linaje celular y especialización durante el desarrollo normal al regular de forma directa o indirecta la expresión génica¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

Metilación de Citosinas del ADN

En este estudio, analizamos en profundidad la metilación del ADN. El ADN en eucariotas está compuesto por cuatro bases nitrogenadas esenciales: adenina, timina, citosina y guanina. La metilación del ADN es una modificación química covalente y post-replicative basada en la adición de un grupo metilo (CH₃-) al nucleótido citosina en el quinto carbono, generando la 5-metilcitosina (Figura 4). La metilación del ADN es heredable, no altera la secuencia de ADN y es una marca estable al ser una unión covalente.

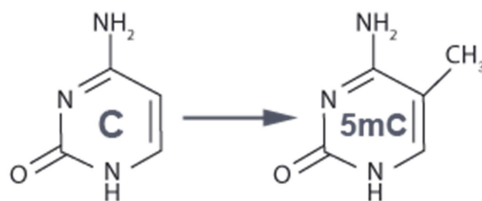


Figura 4: Adición de un grupo metilo (CH₃-) al nucleótido citosina en el quinto carbono (5-metilcitosina). Figura adaptada www.epigentek.com.

La metilación de citosinas puede darse en dos contextos, principalmente en nucleótidos de citosina seguidos por guanina conocidos como sitios CpGs y, en los últimos años, se ha empezado a describir la presencia de metilación en citosinas no-CpG, es decir seguidas por cualquier otro nucleótido (Citosina, adenina o timina).

Existen otras modificaciones covalentes del ADN, tales como la 5-hidroximetilcitosinas, 5-formilcitosina, 5-carboxilcitosina y 3-metilcitosina entre otras^{111, 112}. Aunque estas modificaciones puedan encontrarse en la naturaleza, la detección y cuantificación de estas modificaciones tiene limitaciones técnicas, lo que ha restringido el conocimiento y los efectos derivados de estas modificaciones.

Mecanismos de metilación

En vertebrados la metilación del ADN se establece y mantiene por medio de una familia de enzimas conservadas, las ADN metil transferasas (DNMT, del inglés *Mammalian DNA methyltransferase*)¹¹³. La metilación puede eliminarse de forma activa o pasiva¹¹⁴.

DNMTs

La metilación es una modificación covalente resultante de la transferencia del grupo metilo desde el sustrato S-adenosil-metionina (SAM) a la posición 5' del anillo de pirimidina de la citosina catalizado por medio de las DNMTs y generando la 5-metilcitosina¹⁰⁹. Las enzimas DNMTs son una familia altamente conservada. La DNMT1 es la más abundante, es la responsable del mantenimiento del patrón de metilación en CpGs y se encuentra activada durante el desarrollo embrionario y la replicación celular. No se ha detectado actividad en sitios no-CpG. La DNMT2 tiene una actividad poco definida aunque presenta capacidad para unirse a secuencias de ADN independientemente del estado de metilación de las mismas así como una posible actividad sobre el ARN. Se descubrió por homología a las otras metiltransferasas. La DNMT3 puede actuar sobre cadenas de ADN desmetiladas o hemimetiladas con la función de establecer metilación “*de novo*” tanto en sitios CpG como en no-CpG mediante las subunidades DNMT3A y DNMT3B¹¹⁵. Ambas subunidades presentan mayor afinidad para las citosinas en contextos CpG aunque se ha descrito actividad en sitios no-CpG. La subunidad DNMT3A presenta un papel fundamental en sitios no-CpG con patrón CAC, lo cual es importante en el establecimiento del linaje neuronal mientras que la subunidad DNMT3B tiene la función de establecer “*de novo*” el patrón de metilación del ADN en células embrionarias y células no diferenciadas (Figura 5). El cofactor DNMT3L tiene un papel ligado a la actividad de las DNMT3 y se ha descrito relacionada a la implantación del patrón de metilación de la impronta genética y la gametogénesis¹¹⁶.

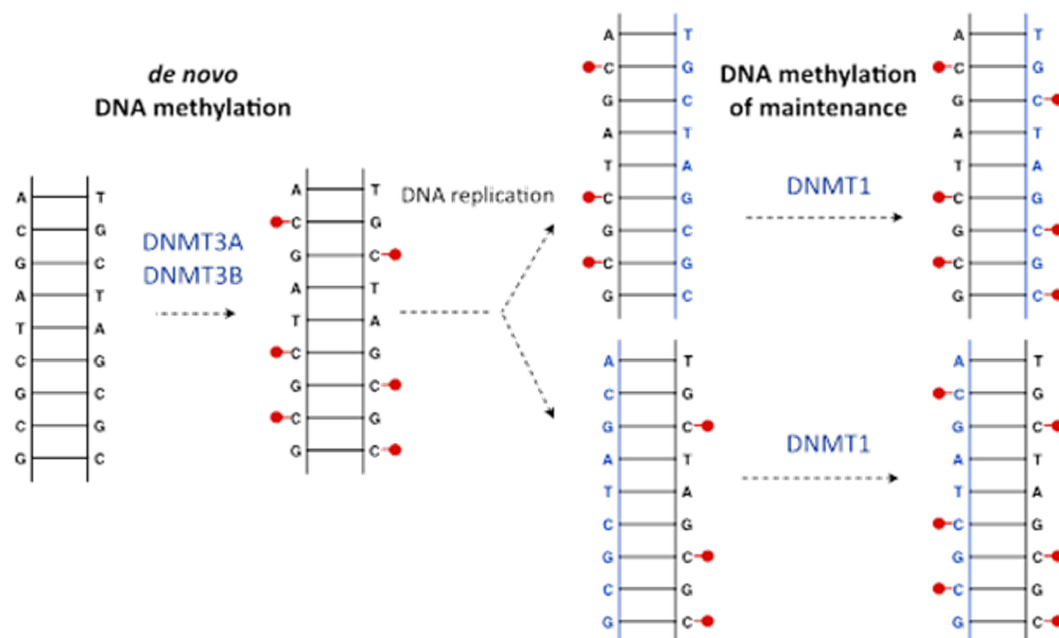


Figura 5: Diagrama de los procesos de metilación en el ADN. El grupo metilo (CH₃) se indica con un círculo rojo. DNMT: enzimas ADN metil-transferasas. Figura adaptada del Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/DNAMethylationID20127.html>).

TET

La familia de enzimas Tet (*Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*) y la enzima citosina oxigenasa 2-oxoglutarato dependiente son las responsables de la desmetilación activa de las citosinas metiladas. Las 3 isoformas que componen la familia de enzimas TET tienen diferentes papeles durante el desarrollo, siendo la más importante la TET3^{117, 118}. La cascada oxidativa con la que se lleva a cabo este proceso se inicia con la oxidación de la posición 5' del anillo de pirimidina de la citosina de la 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina llevada a cabo por acción de las enzimas TET1-3 (Figura 6: #2). La 5-hidroximetilcitosina puede seguir siendo oxidada a las formas 5-formilmetilcitosina (Figura 6: #3) y posteriormente a 5-carboxilcitosina (Figura 6: #4). Mediante la enzima timina ADN glicosilasa se elimina el grupo carboxilo de la forma oxidada 5-carboxilcitosina y mediante la vía de reparación por escisión de base es transformada en una citosina no modificada (Figura 6: #5)¹¹⁷⁻¹¹⁹.

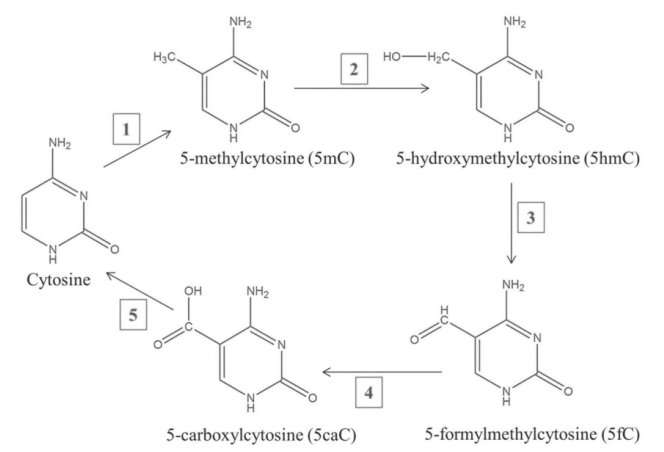


Figura 6: Modificación del residuo de citosina. Las citosinas presentes en el ADN pueden metilarse en el carbono 5 mediante la acción de las DNMTs para dar lugar a la forma 5-metilcitosina (#1) (Biswas y Rao. Pharmacol Ther. 2017¹¹⁸).

Metilación en Citosinas CpG

La metilación del ADN en citosinas de ambas hebras de los dinucleótidos C-G (CpG) ha sido extensamente estudiada en las últimas décadas al ser la forma predominante de metilación del ADN en mamíferos. La metilación en CpG es una metilación simétrica, ya que sucede en las citosinas del dinucleótido C-G en ambas hebras de la cadena de ADN en dirección 3'-5'¹²⁰.

Las citosinas no se encuentran uniformemente distribuidas por el genoma humano, de hecho las CpG se encuentran menos representadas de lo esperado en el genoma de vertebrados. Sin embargo en determinadas regiones del genoma existen regiones enriquecidas en CpG. Estas regiones de alta densidad de CpG, si son regiones más grandes de 200pb, con un contenido de guanina-citosina por encima del 50% y un índice de observado/esperado mayor de 0.6 de dinucleótidos citosina-guanina, se las define como Islas Citosina-Guanina o Islas CpG (CGI)^{121, 122}. Las regiones adyacentes a las CGI (*shores* y *shelves*), se encuentran definidas según su localización relativa a la CGI, como *CGI shore*, de 0-2 kb desde el límite de la CGI, y *CGI shelf*, desde 2001 bp a 4 kb desde el límite de la CGI (Figura 7). El estado de metilación en las CGI, y en menor medida sus regiones adyacentes, ha demostrado tener implicaciones en la regulación de la expresión génica^{123, 124}. La localización de las CGI se encuentra altamente conservada a lo largo del genoma^{125, 126}.

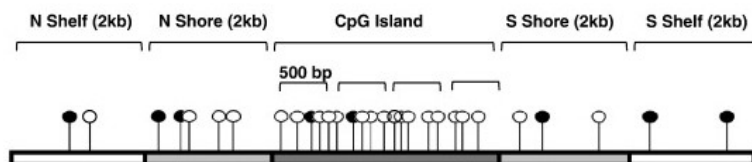


Figura 7: Diagrama de distribución de los sitios de metilación analizados mediante el HM450K relativo a Islas CpG y regiones adyacentes (*shores* y *shelves*). (Bibikova *et al.* Genomics, 2011¹²⁷).

Estas CGI corresponden en un 60-70% a sitios de inicio de transcripción (TSS) de genes en humanos y la mayoría de estas CGI asociadas al TSS no encuentran metiladas¹²⁸⁻¹³⁰. De forma opuesta, los sitios de baja densidad de CGI frecuentemente se encuentran fuera de las regiones TSS. Las CGI localizadas fuera de TSS y dentro del cuerpo del gen frecuentemente presentan un patrón de metilación tejido específico^{129, 131}. Durante las últimas décadas se ha estudiado extensamente el efecto inhibitorio de la expresión génica de la metilación en CGI localizadas en el promotor de genes. Esta inhibición se realiza de forma directa al impedir mediante la metilación del ADN, la unión física de los factores de transcripción al TSS de los genes y se encuentra frecuentemente asociada a inhibiciones persistentes¹²⁹. Existen también formas de modulación indirecta de la expresión génica mediada por proteínas que contienen dominios de unión a CpGs metiladas (*methyl-CpG binding domain* (MBD)). La unión de las proteínas a los MBDs desencadena el reclutamiento de las histonas deacetilasas que compactan la cromatina haciéndola inaccesible, lo cual produce un silenciamiento génico indirecto^{113, 132-136}.

Sin embargo, se ha observado recientemente en múltiples estudios genómicos una correlación positiva entre la expresión génica y la metilación en regiones intragénicas fuera de CGI y TSS¹³². Los mecanismos por los cuales este fenómeno puede suceder son varios, tales como la regulación de promotores intragénicos alternativos, la regulación de ARNs no codificantes intragénicos y elementos transponibles, el procesamiento del ARN mediante la alteración de los sitios de *splicing* y la regulación de los *enhancers*^{125, 126, 129, 132}.

La metilación del ADN tiene otras funciones importantes en el organismo como el mantenimiento de la impronta genética, la estabilidad genómica mediante metilación de elementos repetitivos, la inactivación del cromosoma X, la represión de los elementos transponibles y juega un papel fundamental durante la embriogénesis y la diferenciación celular^{137, 138}. La metilación del ADN está implicada en la regulación epigenética del desarrollo embrionario en mamíferos, momento en el que ocurre la mayor reconfiguración de metilación del ADN^{139, 140}. La metilación en CpGs se establece post mitóticamente y se mantiene estable. Los niveles de metilación global del ADN son variables según el tejido y tipo celular¹⁴¹. La metilación del ADN en sitios CpG sufre una amplia reconfiguración preimplantacional en mamíferos. Durante la embriogénesis, las células germinales primordiales pierden su patrón de metilación, siendo la desmetilación del genoma paterno más rápida que la del genoma materno, para después establecer el patrón de metilación en CpGs de forma ordenada, específica y con finalidad concreta en el embrión^{112, 138, 142, 143}.

Metilación en Citosinas no-CpGs

Recientemente se ha descubierto la presencia de metilación fuera de sitios CpG en contextos no-CpG (CHG y CHH donde H= A, T o C). Esta metilación fue primeramente descrita en

Arabidopsis Thaliana y desde entonces se ha descrito en múltiples estudios relacionados mayoritariamente a su acumulación en células embrionarias y tejidos derivados del neuroectodermo^{112, 116, 144-148}.

La metilación en sitios no-CpG, al contrario que en sitios CpG, se establece únicamente en una de las dos hebras de la cadena de ADN^{112, 119}. Esta característica hace que los niveles de metilación en este contexto sean mucho menores que en sitios no-CpG. Además, esta metilación es susceptible a una rápida regulación dinámica, ya que ha demostrado que puede cambiar de estado de metilación con rapidez.

La abundancia de metilación en contexto no-CpG en tejidos y células humanas es variable^{119, 148}. Mientras que en la mayoría de tejidos es indetectable, en células embrionarias es abundante pero alcanza niveles mayores al diferenciarse en neuronas adultas^{116, 148, 149}.

Las células embrionarias humanas presentan altos niveles de metilación en sitios no-CpGs¹⁴⁵. Diferentes estudios han descrito que las hESC sufren una amplia reconfiguración del patrón de metilación en contexto no-CpG durante la diferenciación, pasando por un estado prácticamente indetectable y reinstaurándose generalmente de forma exclusiva en células derivadas del neuroectodermo^{112, 139, 143}. De forma opuesta a la metilación en sitios no-CpG, la metilación en sitios CpG tanto en neuronas como en otros tejidos se mantiene estable desde su establecimiento que se inicia de forma prenatal una vez se ha implantado el embrión¹⁴⁷.

Las marcas de metilación en sitios no-CpG se encuentran conservadas entre distintos individuos de distintas especies, lo que sostiene la existencia de un papel funcional este tipo de metilación¹¹². La metilación en sitios no-CpG en contexto de células embrionarias y en motivos CAG se ha descrito enriquecida fuera de promotores, en regiones intragénicas y relacionada con la activación de la transcripción^{119, 143, 148}. Sin embargo de forma opuesta, en células diferenciadas la metilación en contexto no-CpG está correlacionada con un efecto de silenciamiento de la expresión génica. El motivo más frecuente de metilación del ADN en neuronas es el motivo CAC, asociado a represión¹⁴⁸. La dualidad de la función de la metilación en sitios no-CpG dependiente de motivo indica una vía diferente de acción a la metilación de las non-CpGs.

Metilación y Cáncer

Estudios recientes están poniendo de manifiesto el papel fundamental que juegan las alteraciones epigenéticas en múltiples neoplasias^{137, 145}.

La primera modificación epigenética descrita en cáncer fue la alteración del patrón de metilación del ADN con una marcada pérdida de metilación (hipometilación) del patrón global y una ganancia de metilación (hipermetilación) focal en genes supresores de tumores y especialmente asociado a CGI^{118, 150-154}. Esta desregulación contribuye a la inestabilidad genómica, la cual está considerada un sello identificativo (*hallmark*) del cáncer, y tiene repercusión en la expresión génica^{155, 156}.

La hipometilación global juega un papel fundamental en la formación tumoral y se ha encontrado asociada a múltiples localizaciones genómicas incluidos retrotrasposones, promotores de bajo contenido en CpG, secuencias repetitivas y múltiples sitios más¹¹⁸. El fenómeno más común asociado a la hipometilación en cáncer es la sobreexpresión de los protooncogenes y los factores de crecimiento que son responsables de múltiples sellos identificativos (*hallmarks*) del cáncer. La activación de los retrotrasposones al desmetilarse así como la desmetilación de las secuencias repetitivas genera inestabilidad genómica, lo cual es

beneficioso para el proceso tumorigénico. La hipometilación en células neoplásicas, tanto en promotores génicos como en el cuerpo del gen, se ha descrito asociada a la producción de proteínas aberrantes y de función alterada¹¹⁸.

El aumento de metilación ha sido ampliamente estudiado en genes supresores de tumores con especial profundidad en las CGIs localizadas en las regiones promotoras de estos genes. Esta hipermetilación localizada se ha relacionado con la inhibición directa de la expresión génica, sin embargo se han descrito vías por las cuales la hipermetilación es capaz de silenciar genes de forma indirecta en el contexto de la tumorigénesis¹¹⁸. Estos mecanismos incluyen el silenciamiento de los genes de reparación del ADN así como de varios factores de transcripción de forma que se desencadena la acumulación de daño en el ADN lo cual fomenta el desarrollo neoplásico¹¹⁸.

Se ha observado, mediante análisis genómicos, que algunos tumores acumulan metilación en los subgrupos tumorales con clínica más agresiva. Al analizar estos tumores de peor pronóstico en mayor detalle se observó que el aumento de metilación se establecía de forma simultánea en múltiples CGI. Así es como se identificó el Fenotipo Metilador de Islas CpG (CpG island methylator phenotype (CIMP)). Este fenotipo fue descrito en 1999 por Dr. Minoru Toyota y colaboradores en el contexto de cáncer colorectal¹⁵⁷. El patrón de metilación CIMP en asociación a tumores de clínica agresiva se ha identificado en múltiples neoplasias tanto del adulto como en tumores pediátricos, y entre ellos en neuroblastoma¹⁵⁸.

En neuroblastoma se ha identificado un fenotipo CIMP asociado al neuroblastoma de alto riesgo con peor pronóstico¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Este patrón CIMP está compuesto de forma más representativa por el estado metilado de las CGIs asociadas a la familia génica *PCDHB*, que conlleva una disminución de la expresión génica de estos genes. La metilación de la familia *PCDHB* ha sido considerada hasta el momento un marcador subrogado de eventos de metilación sincronizada que afectan a otros genes que contribuyen al desarrollo del neuroblastoma en vez de tener un rol regulatorio directo¹⁶².

En meduloblastoma aunque se ha tratado de identificar un patrón CIMP asociado a los subtipos de peor pronóstico, no se ha identificado de forma concreta. El fenotipo CIMP supone la identificación de múltiples islas CpG metiladas de forma simultánea en el subgrupo tumoral más agresivo y de forma diferencial a los subgrupos tumorales de menor agresividad. En el caso del meduloblastoma la frecuencia y niveles de metilación de las CGI es muy similar entre los subgrupos analizados¹⁶³.

La desregulación del patrón de metilación del ADN normal está íntimamente asociada con la iniciación y progresión del cáncer^{118, 137}. Esta desregulación adquiere mayor importancia cuando la tasa de mutaciones somáticas recurrentes es baja, tal y como sucede en los tumores del desarrollo (Figura 8)^{67, 155}. Esta característica recalca la relevancia de la desregulación de los mecanismos epigenéticos en la patogénesis de estos tumores^{68, 69, 74, 79, 100, 118, 164}.

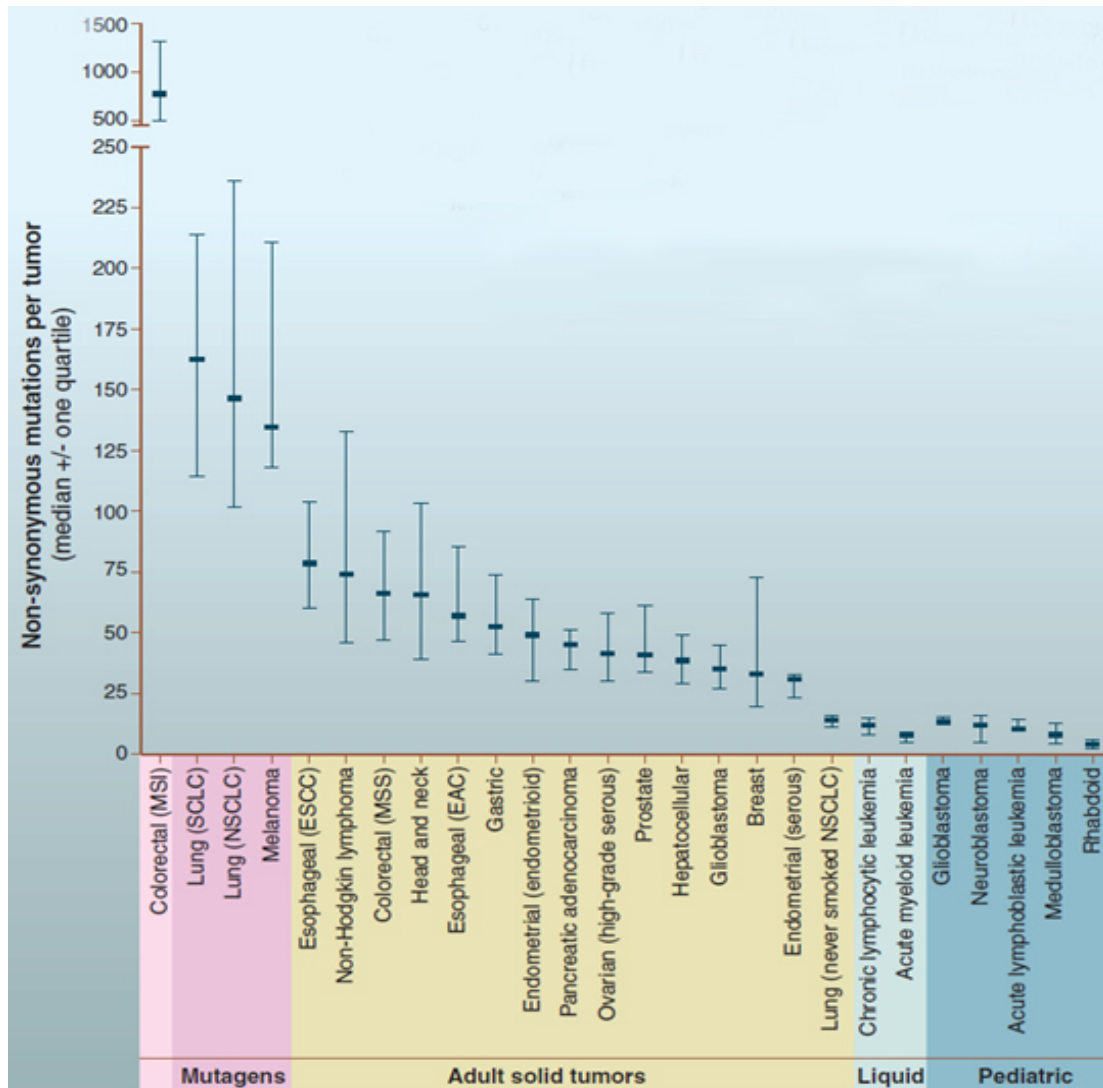


Figura 8: Número de mutaciones somáticas en cánceres humanos representativos detectadas mediante estudios masivos de secuenciación. Imagen adaptada de Vogelstein *et al.* Science. 2013⁶⁷.

Técnicas de detección

La metilación del ADN se puede analizar mediante digestión de enzimas de restricción sensibles a la metilación, técnicas basadas en el ADN convertido por bisulfito o técnicas basadas en el enriquecimiento por afinidad al ADN metilado¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Hasta hace poco, las técnicas estaban basadas en PCR o *microarrays* con la finalidad de analizar una única o múltiples regiones de interés, respectivamente¹⁶⁹⁻¹⁷². La cobertura de estas técnicas estaba limitada a regiones pequeñas del genoma asociadas a CGIs y regiones promotoras, por ello la principal consecuencia del uso de estas técnicas en la gran mayoría de estudios que se han diseñado para investigar la dinámica de metilación del ADN es que la cobertura de análisis estaba sesgada a esas regiones. En la actualidad, los estudios emplean *microarrays* de alta densidad, por ejemplo, los *arrays* exhaustivos de alta densidad para el análisis de metilación relativa (comprehensive high-throughput *arrays* for relative methylation (CHARM)) e Infinium (Illumina Inc.)^{127, 173}, y análisis de metilación del ADN basada en la secuenciación de nueva generación, como por ejemplo, la inmunoprecipitación de ADN metilado seguido de

secuenciación masiva (MeDIP-seq), la purificación por afinidad a CXXC seguido de secuenciación profunda (CAP-seq), la representación reducida de secuenciación de bisulfito (RRBS) y secuenciación del genoma completo convertido por bisulfito (WGBS)^{125, 145, 174, 175}. Todos ellos permiten obtener una representación no sesgada del patrón de metilación del ADN a lo largo de todo el genoma. El uso de estas técnicas ha comenzado a revelar que la metilación del ADN tiene una función aún más amplia de lo previsto en estudios anteriores y que sus funciones pueden variar dependiendo del contexto¹²⁹.

En este estudio concreto hemos empleado técnicas basadas en conversión del ADN por bisulfito de sodio: *microarrays* de alta densidad Infinium de Illumina, secuenciación directa de ADN convertido por bisulfito y pirosecuenciación.

Bisulfito

La técnica de conversión mediante bisulfito de sodio (NaHSO₃) es una reacción química que deamina las citosinas no metiladas del ADN, transformándolas en uracilos y estas al traducirse pasan a ser timinas. Las citosinas metiladas se encuentran químicamente protegidas y se traducen a guaninas (Figura 9). Así, una modificación epigenética se transforma en una modificación genética fácilmente detectable^{168, 176-178}.



Figura 9: Diagrama de conversión mediante bisulfito de sodio. Imagen adaptada de <https://www.epigentek.com/>.

Secuenciación Sanger de productos de PCR obtenidos a partir de ADN convertido por bisulfito (BSP)

Gracias al tratamiento de bisulfito realizado sobre el ADN, la metilación puede analizarse como si fuera una alteración de la secuencia de ADN. Esto permite analizar el ADN convertido por bisulfito mediante las técnicas convencionales como la secuenciación Sanger de productos de PCR (*bisulfite sequencing* PCR (BSP))¹⁶⁸.

El análisis del estado de metilación de ADN convertido por bisulfito mediante secuenciación directa de productos de PCR se emplea para analizar el estado de metilación de sitios concretos del genoma^{168, 169, 179}. En esta técnica las muestras son tratadas con bisulfito de sodio y posteriormente amplificadas mediante PCR utilizando cebadores específicos para la región que contiene las citosinas de interés. Hay que tener en cuenta a la hora de diseñar cebadores para llevar a cabo la PCR de ADN convertido por bisulfito que la secuencia original

ha sido modificada y que cuantos más sitios convertidos se incluyan en el cebador, más específico serán a la hora de amplificar.

Los productos de PCR se secuencian según el método de Sanger por electroforesis capilar. Este método se emplea para determinar el orden de los nucleótidos en un fragmento de ADN basado en la utilización de dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3' ¹⁸⁰. Estos ddNTPs al carecer del grupo hidroxilo del carbono 3' impiden la reacción de elongación de ADN al incorporarse a la cadena y de este modo se producen varios fragmentos de ADN truncados de longitud variable. El nucleótido que finaliza cada fragmento truncado puede identificarse realizando cuatro reacciones por separado empleando en cada una de ellas un ddNTP distinto: ddATP, ddCTP, ddTTP o ddGTP ¹⁸¹. Actualmente de forma automatizada se utilizan cuatro ddNTPs fluorescentes marcados cada uno de ellos con un fluoróforo distinto, lo que permite realizar una única reacción de secuencia que incluye todos los ddNTPs ¹⁸¹. Para determinar la secuencia de ADN se carga la mezcla de síntesis en una máquina de secuenciación automatizada basada en electroforesis capilar. Estas máquinas utilizan un sistema capilar para la separación rápida de los fragmentos y un detector óptico que registra la emisión fluorescente. Esta lectura óptica se traduce en un gráfico llamado cromatograma o electroferograma que grafica en forma de picos de colores los nucleótidos que componen la secuencia de ADN analizado de la siguiente manera: Timina en rojo, Guanina en negro, Citosina en azul y Adenina en verde. De este modo puede leerse la sucesión de picos que componen la secuencia que ha pasado por el capilar (Figura 10) ¹⁷⁷.

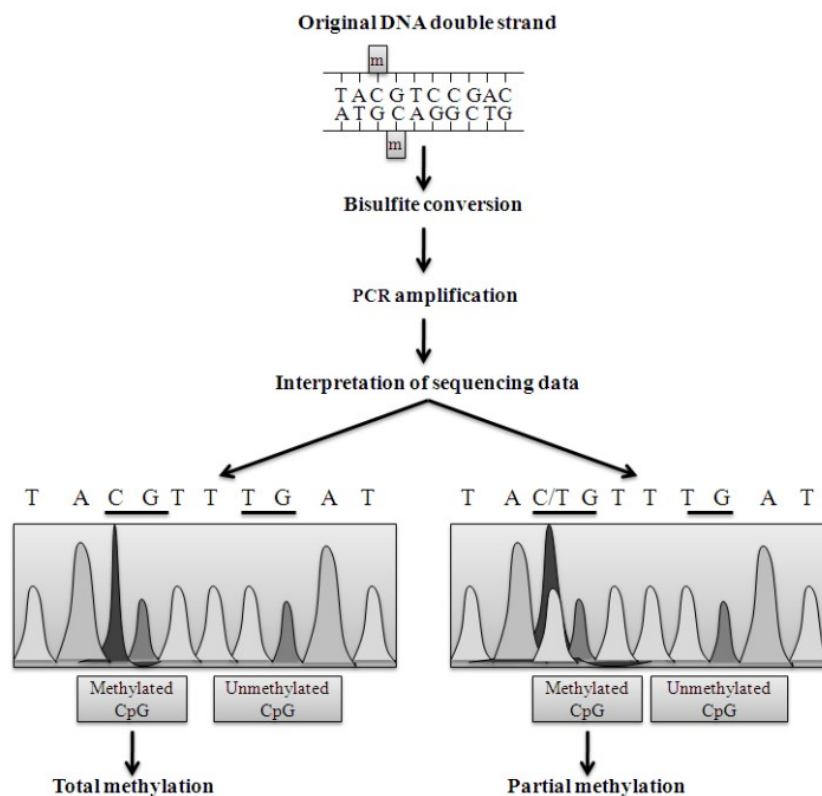


Figura 10: Diagrama de secuenciación Sanger de productos de PCR obtenidos a partir de ADN convertido por bisulfito (BSP). Imagen adaptada de Li y Tollesfsbal. MetMolBio 2011 ¹⁷⁷.

Pirosecuenciación

Esta técnica es una aplicación combinada de la PCR y la secuenciación en tiempo real para la cuantificación de los niveles de metilación de citosinas concretas en secuencias cortas y específicas.

La combinación de cuatro enzimas genera una cascada bioluminiscente que es la base de la pirosecuenciación: ADN polimerasa, ATP sulforilasa, luciferasa y apirasa. Esta cascada bioluminiscente es detectada y cuantificada durante el proceso de secuenciación¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Una vez se han obtenido los productos de PCR descritos en el apartado anterior se procede a secuenciarlos en tiempo real. Esta secuenciación se realiza en presencia de adenosina-5'-fosfosulfato (APS), luciferina, y las enzimas ADN polimerasa, adenosina trifosfato sulforilasa (ATP, del inglés *Adenosine TriPhosphate*), luciferasa y apirasa.

El procedimiento se basa en la adición un deoxi-nucleótido fosfato (dNTP, del inglés *Deoxyribonucleotide triphosphate*) que si es complementario al del producto de PCR se une a la cadena de ADN en formación mediante la ADN polimerasa y libera pirofosfato en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótidos incorporados. Posteriormente la enzima ATP sulfurilasa transforma el pirofosfato liberado en ATP empleando como sustrato la APS. Este ATP se emplea en la reacción de la luciferasa que convierte la luciferina en oxiluciferina generando una señal lumínica proporcional a la cantidad de ATP producido. Esta señal lumínica se detecta y se cuantifica siendo proporcional a la cantidad de dNTP incorporados.

Una vez ha terminado la cascada de reacciones, la aspirasa degrada las moléculas de ATP y los dNTPs sobrantes, permitiendo reanudar una nueva reacción cada vez que se añade un dNTP nuevo. Finalmente se obtiene la secuencia completa analizada y se cuantifica el número de nucleótidos añadidos en cada posición, obteniendo un valor cuantitativo de la metilación para la región estudiada. La pirosecuenciación permite una cuantificación precisa de varias citosinas en regiones comprendidas entre 25-30pb. Este hecho limita el número de citosinas a evaluar por región¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Microarrays Infinium

Un chip o *microarray* es una superficie sólida de vidrio o silicona sobre la cual se inmovilizan de forma ordenada una colección de moléculas llamadas sondas de ADN formando una matriz o *array* estructurado¹⁸⁵.

La tecnología de *microarrays* permite analizar miles de citosinas preseleccionadas de localización conocida de forma simultánea de una muestra. Este análisis se puede realizar de forma simultánea en múltiples muestras diferentes¹⁸⁵.

Las muestras se hibridan al *microarray* por complementariedad de bases con las sondas inmovilizadas al soporte y en este proceso generan señales lumínicas. La tecnología de la compañía Illumina Inc. para el análisis de metilación del ADN mediante la tecnología de *microarrays* se ha consolidado en los últimos años y su química se basa en el uso de diminutas cuentas (*beads*), inmovilizadas sobre la superficie del *array*. En la superficie de estos *beads* se encuentran unidas las sondas que reconocen las diferentes citosinas a lo largo del genoma convertido por bisulfito. El final 3' de la sonda está diseñado para reconocer de forma diferencial la citosina protegida y por tanto metilada o bien la timina resultante de la conversión por bisulfito. La química para la detección de las citosinas metiladas y no metiladas ha ido

cambiando. Inicialmente se empleaban dos tipos de sondas por locus de citosinas unidas a diferentes *beads* para reconocer las citosinas metiladas (M) y no metiladas (U) en base a la química “Infinium I methylation-specific assay design” generando señales lumínicas monocromas. Actualmente las dos sondas por locus de CpG se unen a una única *bead* (U+M) en base a la química “Infinium II methylation-specific assay design” que genera señales lumínicas en dos canales diferentes al tener unidos dos fluorocromos diferentes, lo cual permite distinguir las hibridaciones de secuencias metiladas y las no metiladas (Figura 11)^{127, 186}.

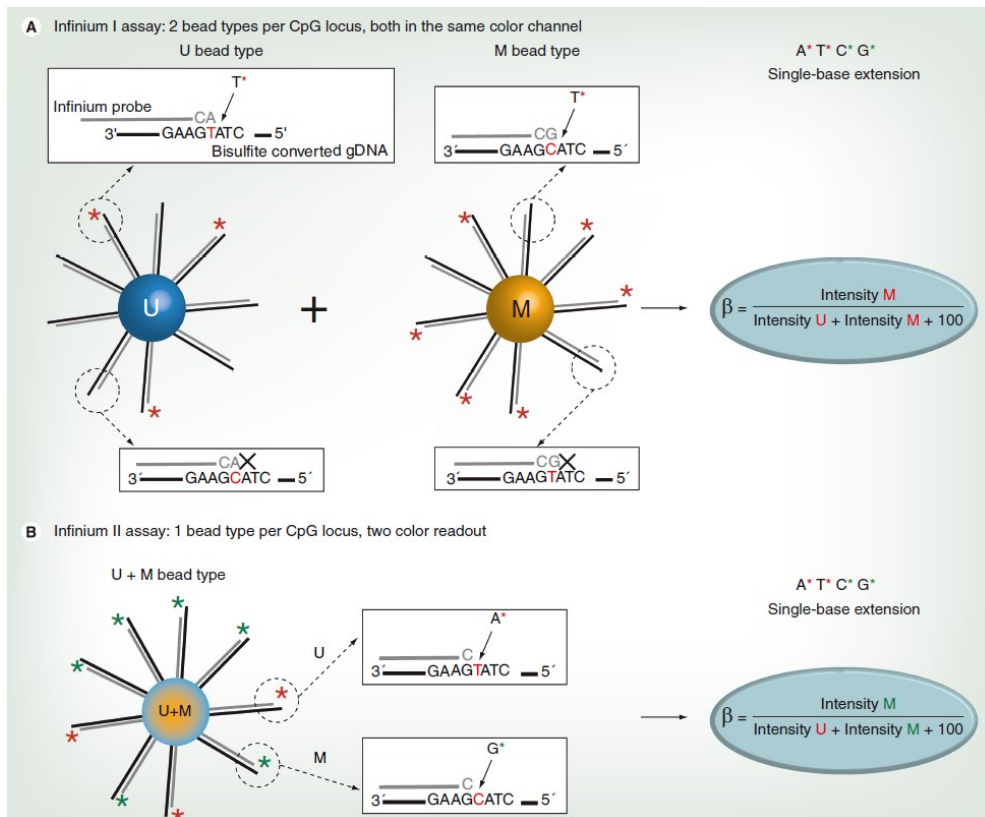


Figura 11: Visión general de la química Infinium I e Infinium II. (A) Infinium I y (B) Infinium II. M: Metilado; U: No metilado. Figura adaptada de Dedeurwaerder *et al.* Epigenomics. 2011¹⁸⁶.

El nivel de metilación del ADN para cada locus analizado se puede calcular según el ratio de señales lumínicas obtenidas entre las dos sondas ya que si la muestra de estudio se encuentra metilada hibridará con mayor afinidad con la sonda complementaria a la secuencia metilada. La fórmula empleada para calcular los niveles de metilación es el llamado valor Beta (β)^{127, 186}:

$$\beta = \frac{\text{Intensidad del Alelo Metilado}(M)}{\text{Intensidad del Alelo Desmetilado}(U) + \text{Intensidad del Alelo Metilado}(M) + 100}$$

La intensidad lumínica así como la localización dentro del *microarray* es escaneada por sistemas de detección que la identifican y traducen mediante diversos algoritmos y programas informáticos a niveles numéricos cuantificables de las citosinas preseleccionadas. Esto permite extraer los datos numéricos a partir la intensidad de señal y evaluar la calidad de los mismos. Esta calidad puede ser analizada para descartar aquellas señales de baja calidad, productos de hibridación no específica y eliminar los datos erróneos derivados de fallos técnicos. Posteriormente los datos crudos de intensidad lumínica se analizan bioinformáticamente

mediante diferentes programas y algoritmos para llevar a cabo la normalización y cuantificación de los datos. Posteriormente se ha de realizar un control de calidad. Este control tiene en cuenta múltiples parámetros tales como la calidad de la hibridación de los fragmentos de ADN al *microarray*, el control de la robustez de la señal de dichas secuencias, la corrección de la señal debida a hibridación determina el estándar para poder filtrar y eliminar del estudio aquellos datos que no cumplan criterios de significancia estadística y biológica¹⁷⁶.

Una vez se han filtrado las citosinas que no cumplen criterios de calidad y se obtiene una matriz de datos se aplican diversas técnicas de programación y algoritmos analíticos para realizar minería de datos (del inglés *Data mining*), clasificación de los mismos y visualización empleando potencia computacional y fuerza estadística¹⁶⁸.

Al obtenerse estos datos mediante una técnica de alto rendimiento puede dar lugar a diferentes sesgos, como el efecto de lote, y posibles falsos, por ello los datos obtenidos de los estudios deben ser validados por una técnica independiente¹⁸⁷.

La primera parte del proyecto de tesis la realizamos en el *microarray Infinium HumanMethylation 27BeadChip*. Este *microarray* emplea la química Infinium I para analizar 27,578 sitios en contexto CpGs. Estas CpGs se localizan mayoritariamente en regiones próximas a regiones promotoras que comprenden 10,00pb por encima y 500pb por debajo de los inicios de transcripción de 14,475 genes conocidos (Versión del Genoma GRCh36/hg18, UCSC Genome Browser)¹⁸⁸. Además de analizar las citosinas en el contexto de regiones promotoras, también se analizan entre 5 y 20 citosinas CpG fuera de las regiones promotoras de más de 200 genes concretos relevantes en cáncer así como genes marcados por la impronta génica^{188, 189}.

Sin embargo la mayoría de los resultados presentados en esta tesis están basados en el análisis del *microarray Infinium Human Methylation 450K BeadChip* (HM450K).

Infinium Human Methylation 450K BeadChip

El HM450K emplea la tecnología Infinium II para interrogar el estado de metilación de 482,733 citosinas en el contexto CpG y 3,091 en el contexto no-CpG a lo largo de todo el genoma. Cubre el 96% de las CGI así como sus regiones adyacentes: *shores* y *shells*^{127, 190}. El HM450K analiza el estado de metilación de citosinas localizadas no solo en regiones promotoras (41.2% del total de citosinas analizadas) sino también en regiones fuera de promotores en contexto intragénico (34.3% del total de citosinas analizadas) e intergénico (24.5% del total de citosinas analizadas) (Figuras 12 y 13)^{127, 190}.

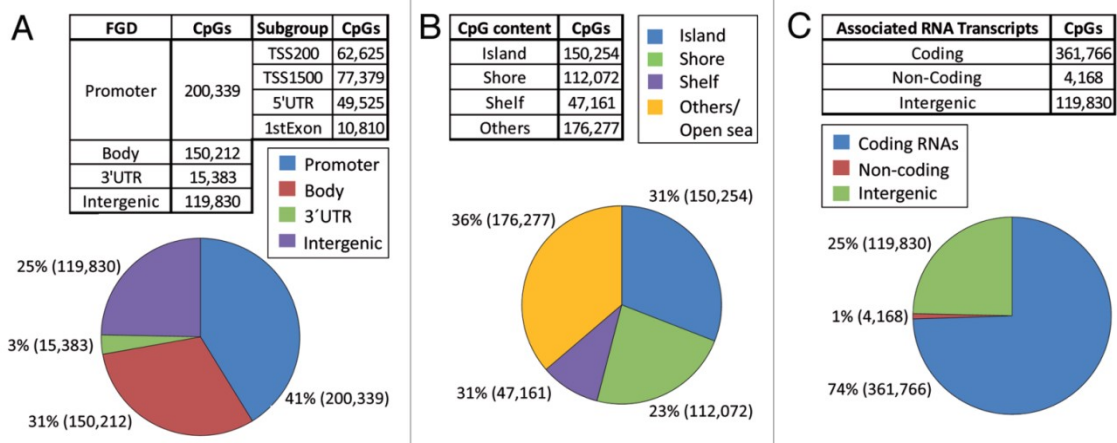


Figura 12: Descripción del *microarray* HM450K. Distribución de las citosinas incluidas en el HM450K según posición relativa a (A) genes, (B) Islas CpG y (C) regiones codificantes del ADN. Imagen adaptada de Sandoval *et al.* Epigenetics. 2011¹⁹⁰.

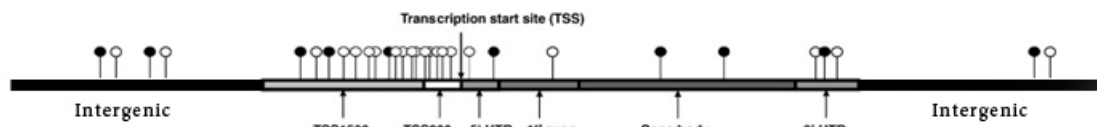


Figura 13: Diagrama de distribución de las citosinas incluidas en el HM450K según su posición relativa a genes. Figura adaptada de Bibikova *et al.* Genomics. 2011¹²⁷.

Anotación Genómica de las Citosinas incluidas en el HM450K

Para obtener mayor información asociada a la localización de las citosinas incluidas en el HM450K ampliamos la información recogida en la anotación en base a las posiciones relativas al genoma versión GRCh37/hg19 de la base de datos del Navegador Genómico de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC Genome Browser - <https://genome.ucsc.edu/>)¹⁹¹. Esta ampliación de la anotación de las citosinas incluidas en el HM450K la realizamos gracias a la información recogida en el UCSC Genome Browser y caracterizamos las citosinas desde el punto de vista genómico, transcripcional y epigenómico. Anotamos las citosinas según su posición relativa a los genes más cercanos según los siguientes criterios:

- TSS 10Kb: Desde 1,500pb hasta 10Kb por delante del TSS.
- TSS 1,5Kb: Desde 201pb hasta 1,500pb por delante del TSS.
- TSS 200: Desde 1pb hasta 200pb por delante del TSS.
- 5' UTR: Región 5'-UTR.
- Primer Exón
- Cuerpo del gen: desde el primer intrón al último exón.
- 3' UTR: Región 3'-UTR.
- 1,5Kb-3 prime: Desde 1pb hasta 1,500pb desde el final del 3'-UTR.
- 10 Kb-3 prime: Desde 1,501pb hasta 10Kb desde el final del 3'-UTR.
- Regiones intergénicas.

Otro parámetro por el cual anotamos las citosinas fue según su distancia relativa a las CGI más cercanas en base a los siguientes criterios:

- Dentro de la isla CpG
- En el *shore* de la CGI: De 1pb a 2 Kb desde el límite de la CGI.
- En el *shelf* de la CGI: De 2001pb a 4 Kb desde el límite de la CGI.
- Fuera de contexto de CGI.

El consorcio “Roadmap Epigenomics” del Instituto Nacional de Salud Americano (*National Institutes of Health* (NIH)) ha generado e integrado la mayor colección una amplia colección de 111 epigenomas de células y tejidos primarios humanos. Como parte del programa el consorcio ha generado en 111 tejidos y células humanas patrones de modificación de histonas, accesibilidad de ADN, metilación de ADN y expresión de ARN. De este modo establecieron mapas globales de elementos reguladores, activadores y represores¹⁹². De entre todos los análisis integrativos, incluimos en la anotación de las citosinas la información, según la localización genómica en donde se hallaban las citosinas, de los estados funcionales y transcripcionales de la cromatina. La categorización de las localizaciones genómicas según los perfiles de la cromatina se basa en el análisis mediante ChIP-Seq de múltiples marcas de histonas (H3K27me3, H3K36me3, H3K4me1, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me3 y H3K27ac) analizadas en diferentes células y tejidos de referencia e integradas mediante el método de Hidden Markov Model (HMM)^{192, 193}. De este modo las combinaciones de las marcas de histonas se agrupan en 15 diferentes estados funcionales y transcripcionales de la cromatina en base a su correlación con regulación, iniciación transcripcional, elongación, actividad potenciadora de enhancers y represión:

- Estado 1 – TssA: Promotor Activo
- Estado 2 – TssAFlnk: Flanqueando Promotor Activo
- Estado 3 - TxFlnk: Transcripción en regiones 3'-UTR y 5'-UTR
- Estado 4 – Tx: Transcripción fuerte
- Estado 5 - TxWk: Transcripción débil
- Estado 6 - EnhG: Potenciadores intragénicos
- Estado 7 - Enh: Potenciadores o Enhancers
- Estado 8 - ZNF/Rpts: Dedos de Zinc “Zinc-fingers” y repeticiones
- Estado 9 - Het: Heterochromatina
- Estado 10 – TssBiv: Promotor Bivalente
- Estado 11 - BivFlnk: Flanqueando promotor/Enhancer bivalente
- Estado 12 - EnhBiv: Enhancer Bivalente
- Estado 13 - ReprPC: Reprimido por PolyComb
- Estado 14 - ReprPCWk: Débilmente reprimido por PolyComb
- Estado 15 - Quies: Quiescente

El proyecto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) ha generado y continúa creando un catálogo completo de elementos genéticos y elementos funcionales en los genomas humanos y de ratón midiendo los niveles de expresión de ARN, identificando proteínas que interactúan con ARN y ADN, como las histonas modificadas, factores de transcripción y proteínas de unión a ARN; los niveles de metilación del ADN e identificando regiones de hipersensibilidad del ADN¹⁹⁴. En la ampliación de la anotación de las citosinas incluidas en el HM450K incluimos la información de las localizaciones genómicas hipersensibles del ADN (Sitios de digestión del ADN por acción de la DNasa I) analizadas en 125 tipos celulares diferentes. Del proyecto ENCODE también incluimos en la ampliación de la anotación la asociación de la localización de las citosinas con sitios de unión a 161 factores de transcripción analizados mediante ChIP-seq en 91 tipos celulares diferentes.

Herramientas Bioinformáticas

Tanto la integración de diferentes bases de datos para la ampliación de la anotación del HM450K como los análisis dirigidos de genes asociados a las citosinas seleccionadas, los llevamos a cabo mediante herramientas bioinformáticas en base a la programación en lenguaje R (<https://cran.r-project.org/>). R es un lenguaje basado en lenguaje S de libre acceso. Es un lenguaje informático adaptado a los análisis estadísticos y la generación de gráficos. Además este lenguaje cuenta con el repositorio Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>)¹⁹⁵ que proporciona herramientas para el análisis e interpretación de datos genómicos obtenido mediante plataformas de alta densidad en formato de paquetes de R. Integramos diferentes paquetes de Bioconductor con un conjunto completo de herramientas de anotación funcional, tales como ontologías génicas y vías moleculares, para llevar a cabo análisis de enriquecimiento funcional y así aportar significado biológico a grandes listas de genes.

La Ontología Génica es un marco para modelar la biología definido por el consorcio de Ontología Génica (<http://www.geneontology.org/>)¹⁹⁶. Esta define y clasifica las funciones de los genes analizándolos en base a tres aspectos: la Función Molecular (actividades moleculares de los productos génicos), Componente Celular (región celular donde los productos génicos están activos) y Procesos Biológicos (vías y procesos complejos compuestos por múltiples productos génicos). Las vías moleculares son una colección de mapas de cascadas moleculares que representan el conocimiento existente sobre la interacción molecular y las redes de reacción de un proceso biológico concreto.

miRNAs

Los miRNAs (del inglés *microRNA*) son moléculas de ARN cuya longitud se haya comprendida entre los 19 y los 25 nucleótidos de cadena simple. Los miRNAs son secuencias evolutivamente conservadas y en el ser humano se encuentran aproximadamente unos 2500 miRNAs diferentes¹⁹⁷.

Estas moléculas de ARN sufren una maduración desde su transcripción en el núcleo celular desde el ADN a la versión inmadura del miRNA, llamado pri-miRNA. Este pri-miRNA de 60-70 nucleótidos puede ser policistrónico y por acción de la enzima Drosha y Pasha (DGCR8) pasa a la versión inmadura pre-miRNA. El pre-miRNA contiene la información genética para un único miRNA maduro y tiene una estructura muy concreta de horquilla de doble cadena de la que sobresalen dos nucleótidos. Este pri-miRNA se exporta al citoplasma mediante la Exportina 5 donde sufre el corte de Dicer que transforma el pre-miRNA en un miRNA maduro que puede ejercer su función sobre los ARN mensajeros (Figura 13)¹⁹⁷.

Desde su descubrimiento en 1994, se ha demostrado que los miRNAs presentan una nueva capa de regulación transcripcional. Ejercen su función mediante complementariedad de bases parcial o total a regiones mayoritariamente 3'UTR de los ARN mensajeros (ARNm)^{198, 199}. La región del miRNA que se une al ARNm se conoce como semilla y son los nucleótidos 2-7 del extremo 5' del miRNA. Las familias de miRNAs comparten la misma secuencia semilla mientras que el resto de la secuencia del miRNA es variable. La unión miRNA-ARNm también puede suceder en las regiones 5'UTR y en las regiones codificantes del ARNm, sin embargo esta unión es rara e ineficiente. Dependiendo del grado de complementariedad entre el sitio de unión del miRNA con el ARNm (llamado MRE, del inglés *microRNA response elements*) y el miRNA puede darse una represión transcripcional, mediante complementariedad parcial, o la degradación del ARNm mediante complementariedad total. La unión de los miRNAs a las

regiones MRE de los ARNm está regulada de forma termodinámica, estructural y por complementariedad de bases (Figura 14)^{197, 198}.

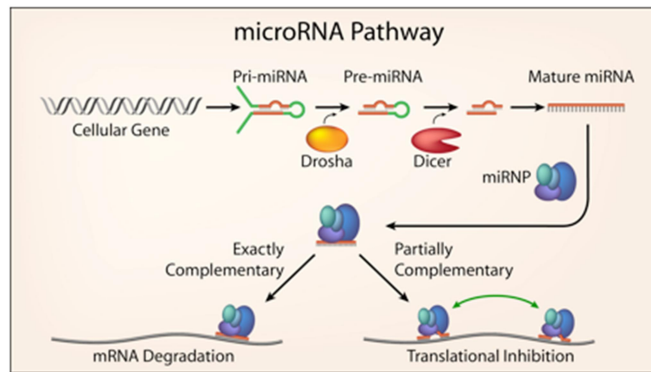


Figura 14: Diagrama esquemático de la maduración y función de los miRNAs. Imagen adaptada de Dr. PA Sharp (https://biology.mit.edu/people/phillip_sharp).

Cada miRNA tiene múltiples mRNA diana posibles, y a su vez cada mRNA puede ser regulado por múltiples miRNAs. Por lo que todos los mRNAs que contienen sitios de unión para los mismos miRNAs pueden comunicarse y regularse entre ellos para competir específicamente por el conjunto de miRNAs compartidos, actuando así como ARNs competidores endógenos (ceRNAs). De este modo, un gen altamente expresado actuará como esponja del conjunto de miRNAs compartidos con los demás mRNAs y evitará su inhibición transcripcional. Esta relación da como resultado una red compleja y sofisticada de regulación génica (Figura 14)²⁰⁰.

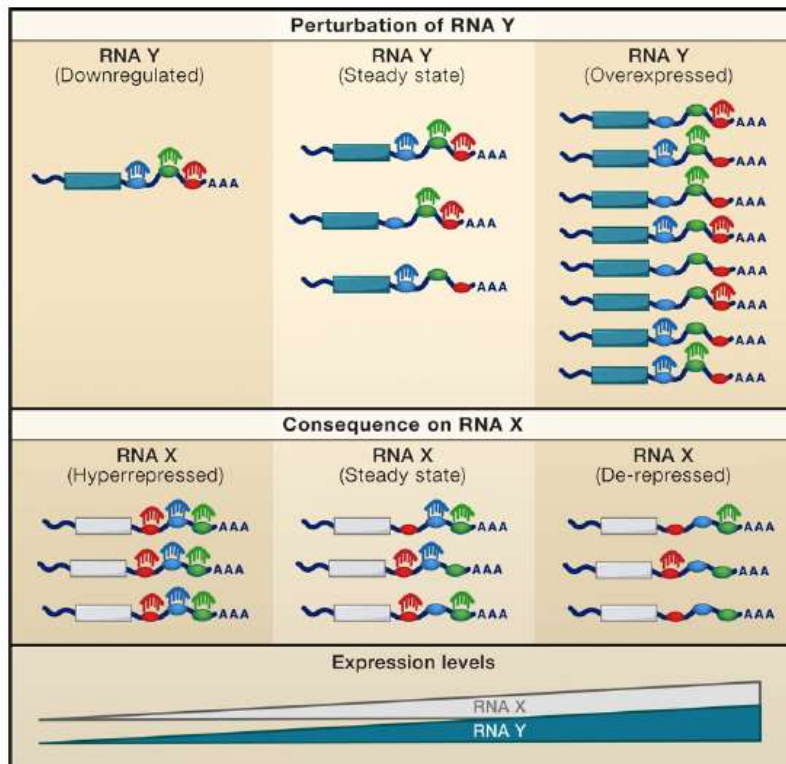


Figura 15: La eficacia de los miRNAs se ve influenciada por la concentración celular de sus MRE. Los múltiples transcritos de ARNm pueden contener MREs para el mismo miRNA. Según lo propuesto por la hipótesis ceRNA, la sobreexpresión de ARN Y aumenta las concentraciones celulares de MREs concretos y puede dar lugar a la de-represión de otros transcritos (por ejemplo, ARN X) que contienen los mismos MREs. De forma opuesta, la represión del ARN Y daría lugar a una disminución de los niveles de MREs concretos y por tanto a la hiper-represión del ARN X. Figura adaptada de Salmena *et al.* Cell. 2011²⁰⁰.

miRNA y Cáncer

Además de las amplificaciones genómicas, supresiones, mutaciones y modificaciones epigenéticas que desregulan la función genética crucial y dan como resultado la patogénesis de la enfermedad, los cambios aberrantes en la regulación de los miRNAs también pueden contribuir a la iniciación y progresión de diferentes enfermedades. La expresión aberrante de miRNAs está relacionada con la iniciación de múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer^{201, 202}. La expresión alterada de los miRNAs puede ser causada por múltiples mecanismos incluyendo defectos en las proteínas relacionadas con la biogénesis y expresión de los miRNAs, alteraciones en el número de copias, alteraciones transcripcionales de activadores y/o represores y la metilación aberrante del ADN.

Múltiples miRNAs se han descrito asociado en distintas neoplasias con función oncogénica o supresora de tumores. En el caso concreto del neuroblastoma, la lista de miRNAs específicos potencialmente implicados en la patogénesis está expandiéndose²⁰³⁻²⁰⁷. En neuroblastoma se han encontrado múltiples miRNAs asociados con el pronóstico de la enfermedad, la diferenciación, los procesos metastásicos y la apoptosis^{25, 204, 207-212}. El perfil global de los cambios de miRNAs en neuroblastoma no se ha descrito hasta el momento. Así mismo, los mecanismos por los cuales los miRNAs se encuentran desregulados en neuroblastoma siguen sin conocerse.

ARNm como ceRNAs en Cáncer

En el contexto de cáncer, los ARNm pueden promover el cáncer mediante la regulación de genes supresores de tumores y oncogenes mediante la regulación de la expresión de forma dependiente al conjunto de miRNAs compartidos como competidores endógenos (ceRNAs)²¹³.

Este mecanismo ha sido descrito en glioblastoma²¹⁴ y cáncer de próstata²¹⁵ en relación a la sobreexpresión del ARNm de *PTEN*.

Análisis computacionales sugieren que la expresión aberrante de numerosos ARNm tiene actividad potencial como esponja de miRNAs en cáncer²¹⁶. Sin embargo, tanto su capacidad para absorber miRNAs como su potencial papel en cáncer aún deben ser validados experimentalmente.

Técnicas de detección de miRNAs

Existen múltiples métodos para el análisis de los niveles globales de expresión de miRNAs. Estos incluyen la detección directa mediante RT-qPCR, secuenciación masiva de librerías de moléculas pequeñas de ARN de alto rendimiento y el análisis mediante *microarrays*²¹⁷.

En este estudio concreto hemos empleado el análisis de expresión de miRNAs basándonos en el *microarray* Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0, miRNA4.0 (Affymetrix Inc.), de este modo pudimos analizar la totalidad de miRNAs, tanto maduros como inmaduros (pre-miRNAs) descritos hasta el momento (Versión 20 mirbase; <http://www.mirbase.org/>) de forma simultánea en múltiples muestras en un único experimento.

El *microarray* Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 (miRNA4.0) es un array multiespecie que comprende 36,353 sondas de las cuales 6,631 sondas corresponden a humano y están compuestas por los siguientes elementos:

Sequence.Type		
miRNA	2578	Human mature miRNA
CDBox	319	C/D box snoRNAs contain two short conserved sequence motifs, C (RUGAUGA) and D (CUGA), located near the 5' and 3' ends of the snoRNA, respectively.
HAcabox	155	H/ACA box snoRNAs have a common secondary structure consisting of a two hairpins and two single-stranded regions termed a hairpin-hinge-hairpin-tail structure.
scaRna	31	Small Cajal body-specific RNAs (scaRNAs) are a class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) that specifically localise to the Cajal body, a nuclear organelle involved in the biogenesis of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs or snurps).
snoRNA	1491	Small nucleolar RNAs (snoRNAs) are a class of small RNA molecules that primarily guide chemical modifications of other RNAs, mainly ribosomal RNAs, transfer RNAs and small nuclear RNAs. There are two main classes of snoRNA, the C/D box snoRNAs, which are associated with methylation, and the H/ACA box snoRNAs, which are associated with pseudouridylation.
stem-loop	2025	Human pre-miRNA
Spike-in controls	22	Affymetrix arrays include spike-in hybridization controls: 4 targets are spiked before the labeling step with 4 different concentrations
5.8s rRNA	10	probes de idénticas secuencias. La media puede emplearse como control.

En general es un *microarray* poco estudiado y tiene un limitado número de publicaciones asociadas. En neuroblastoma no existe ningún estudio asociado y en cáncer únicamente se ha empleado en el análisis de los perfiles de expresión tumores colon-recto, tumores gástricos y en sarcoma sinovial²¹⁸⁻²²⁰.

Objetivos

Objetivo Global

Estudiar los cambios epigenéticos que afectan a dos tumores neurales pediátricos prototípicos, Neuroblastoma y Meduloblastoma. Estudiar los cambios a nivel genómico de la metilación del ADN, miRNAs y expresión génica así como alteraciones del número de copias del ADN para identificar cambios genéticos y epigenéticos que podrían subyacer las bases moleculares de la patogénesis de estos tumores pediátricos, y podrían tener implicación clínica en la evolución de estos tumores neurales. El objetivo principal es identificar marcadores moleculares y potenciales dianas de interés para desarrollar nuevas terapias terapéuticas.

Objetivos Específicos

- 1. Estudiar del Patrón de Metilación del ADN específico del Neuroblastoma**
 - 1.1. Estudiar el metiloma del ADN del neuroblastoma empleando *microarrays* de alta densidad (*Illumina Infinium Human Methylation-27 BeadChip* e *Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip*). Caracterizar transcripcional y epigenética de los cambios de metilación. Analizar el enriquecimiento funcional de los cambios de metilación.
 - 1.2. Analizar del patrón de expresión génica mediante datos de *microarray* (*Affymetrix Human Genome U219 Array*).
 - 1.3. Analizar las alteraciones cromosómicas del neuroblastoma empleando tecnología CGH en combinación con *microarrays* de SNP (*Affymetrix CytoScan™ HD Array*).
 - 1.4. Validar los resultados de los *arrays* de metilación del ADN, expresión génica y de variación de número de copias.
 - 1.5. Investigar la asociación de los perfiles alterados de metilación, de miRNAs y de variaciones cromosómicas con la expresión génica.
- 2. Identificar Biomarcadores para la Evaluación de la Evolución Clínica del Neuroblastoma**
 - 2.1. Analizar las variaciones de la metilación del ADN y los cambios de expresión asociados a los diferentes subgrupos clínico-biológicos en neuroblastoma (alteraciones cromosómicas específicas, estado de amplificación de *MYCN* amplificación status, ploidía del ADN, edad del paciente al diagnóstico, Estadio según el *International Neuroblastoma Staging System* (INSS)).
 - 2.2. Validación de los perfiles de metilación del ADN como potenciales biomarcadores de pronóstico, predicción de evolución clínica y respuesta a tratamiento.
- 3. Identificar Biomarcadores para la Clasificación Molecular de los Meduloblastomas**
 - 3.1. Estudiar el metiloma del ADN del meduloblastoma empleando *microarrays* de alta densidad (*Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip*).
 - 3.2. Identificar perfiles diferenciales de metilación del ADN entre los subgrupos moleculares del meduloblastoma.
 - 3.3. Desarrollar un método novedoso basado en biomarcadores epigenéticos para clasificar los subgrupos moleculares del meduloblastoma.
 - 3.4. Validar los perfiles de metilación de los biomarcadores epigenéticos de los subgrupos moleculares del meduloblastoma *in-silico*.
 - 3.5. Validar los perfiles de metilación de los biomarcadores epigenéticos de los subgrupos moleculares del meduloblastoma mediante diversas técnicas moleculares.

Resultados

La hipometilación del ADN afecta a funciones biológicas relacionadas con cáncer y a genes relevantes para la patogénesis del neuroblastoma

Gemma Mayol, José I. Martín-Subero, José Ríos, Ana Queiros, Marta Kulis, Mariona Suñol, Manel Esteller, **Soledad Gómez**, Idoia Garcia, Carmen de Torres, Eva Rodríguez, Patricia Galván, Jaume Mora y Cinzia Lavarino.

Publicado en la revista *PLoS ONE* 7(11): e48401.

FI: 4.092, Q1.

Resumen

Durante los últimos años nuestro grupo ha desarrollado una línea de investigación enfocada en el estudio de las distintas alteraciones genéticas y epigenéticas que puedan estar subyacentes al comportamiento clínico-patológico del neuroblastoma y, potencialmente, a otros tumores embrionarios. Para ello hemos realizado diversos estudios genómicos aplicando tecnología de *microarray*.

Nuestra primera aproximación se basó en el análisis del estado de metilación del ADN mediante el array *Illumina Infinium Human Methylation-27k BeadChip* de 22 neuroblastomas primarios, dos ganglioneuromas y un ganglioneuroblastoma así como muestras de referencia normales (cerebro fetal y glándula suprarrenal). Esta plataforma se encontraba especialmente enfocada en las citosinas localizadas en regiones promotoras de genes y las regiones relacionadas con las Islas CpG. Los resultados obtenidos se validaron en una cohorte independiente de 15 neuroblastomas mediante análisis de pirosecuenciación de bisulfito. Aproximaciones bioinformáticas tales como la ontología génica y la asociación con la expresión génica permitieron estudiar las implicaciones funcionales de la metilación en neuroblastoma.

El análisis no supervisado de los datos mostró como el patrón de metilación del ADN del neuroblastoma era específico y claramente diferencial tanto de muestras referencia como de tumores neuroblásticos menos agresivos (ganglioneuroma y ganglioneuroblastoma). El patrón de metilación del genoma en neuroblastoma se encontraba caracterizado por una extensa hipometilación global y una hipermetilación focal. Estos resultados presentaron evidencias, por primera vez en neuroblastoma, de la existencia de perfiles globales de metilación del ADN característicos de este tumor pediátrico.

Con el fin de analizar en detalle el patrón de metilación del ADN en neuroblastoma, aplicamos análisis estrictos de metilación diferencial que revelaron que los patrones de hipometilación e hipermetilación se asociaban con subgrupos clínico-biológicos de neuroblastoma. Identificamos cambios específicos de metilación del ADN en neuroblastoma asociados con características genéticas (estado de amplificación de *MYCN*) y clínicas (subgrupos de riesgo clínico, presencia de metástasis, edad del paciente al diagnóstico), lo que sugería que los patrones alterados de metilación del ADN pueden ser un factor crítico en la patogénesis del neuroblastoma.

En líneas generales, observamos que en neuroblastoma la pérdida de metilación del ADN es más significativa que la hipermetilación en regiones promotoras. Esto reafirmaba la hipometilación global previamente identificada en cáncer, descrita principalmente asociada a secuencias repetitivas del ADN. Sin embargo nuestros resultados sugerían que la hipometilación es una alteración epigenética que afecta también a genes específicos relevantes en la patogénesis del neuroblastoma y a genes descritos en relación con cáncer, tales como *CCND1* (Cyclin D1), *SPRR3* (Small proline-rich protein 3), *EGF* (Epidermal growth factor) y *FGF6* (Fibroblast growth factor 6) entre otros. El gen *CCND1* es una quinasa dependiente de

ciclina que se encuentra altamente expresada en neuroblastoma. En nuestro estudio observamos que el gen *CCND1* presentaba una extensa pérdida de metilación en una región evolutivamente conservada y funcionalmente relevante localizada en la región 3'-UTR. La hipometilación de la región 3'-UTR en *CCND1* se observó concomitantemente a la ausencia de alteraciones de metilación del ADN en la región promotora del gen. Esta región no promotora mostraba implicaciones regulatorias extensas ya que se encontraba potencialmente asociada a factores de transcripción. Además, observamos que la hipermetilación identificada en neuroblastoma se encontraba asociada a las regiones promotoras de genes tales como *RASSF1A* (*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1*), *POU2F2* (*POU class 2 homeobox2*) y *HOXD3* (*Homeobox D3*) entre otros, que están relacionados con desarrollo y regulación de la proliferación celular.

Nuestros resultados sugerían que las alteraciones en la metilación del ADN podían contribuir de manera significativa a la patogénesis del neuroblastoma. Asimismo sugerían que la metilación fuera de regiones promotoras podría desempeñar un papel importante en la biología del neuroblastoma.

DNA Hypomethylation Affects Cancer-Related Biological Functions and Genes Relevant in Neuroblastoma Pathogenesis

Gemma Mayol¹, José I. Martín-Subero², José Ríos^{3,4}, Ana Queiros², Marta Kulis⁵, Mariona Suñol⁶, Manel Esteller^{7,8,9}, Soledad Gómez¹, Idoia Garcia¹, Carmen de Torres¹, Eva Rodríguez¹, Patricia Galván¹, Jaume Mora¹, Cinzia Lavarino^{1*}

1 Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, **2** Department of Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Laboratory of Biostatistics and Epidemiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Clinical Pharmacology Service, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, **5** Hematopathology Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, **6** Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, **7** Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet, Barcelona, Spain, **8** Department of Physiological Sciences II, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **9** Institutíó Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

Abstract

Neuroblastoma (NB) pathogenesis has been reported to be closely associated with numerous genetic alterations. However, underlying DNA methylation patterns have not been extensively studied in this developmental malignancy. Here, we generated microarray-based DNA methylation profiles of primary neuroblastic tumors. Stringent supervised differential methylation analyses allowed us to identify epigenetic changes characteristic for NB tumors as well as for clinical and biological subtypes of NB. We observed that gene-specific loss of DNA methylation is more prevalent than promoter hypermethylation. Remarkably, such hypomethylation affected cancer-related biological functions and genes relevant to NB pathogenesis such as *CCND1*, *SPRR3*, *BTC*, *EGF* and *FGF6*. In particular, differential methylation in *CCND1* affected mostly an evolutionary conserved functionally relevant 3' untranslated region, suggesting that hypomethylation outside promoter regions may play a role in NB pathogenesis. Hypermethylation targeted genes involved in cell development and proliferation such as *RASSF1A*, *POU2F2* or *HOXD3*, among others. The results derived from this study provide new candidate epigenetic biomarkers associated with NB as well as insights into the molecular pathogenesis of this tumor, which involves a marked gene-specific hypomethylation.

Citation: Mayol G, Martín-Subero JI, Ríos J, Queiros A, Kulis M, et al. (2012) DNA Hypomethylation Affects Cancer-Related Biological Functions and Genes Relevant in Neuroblastoma Pathogenesis. PLoS ONE 7(11): e48401. doi:10.1371/journal.pone.0048401

Editor: Javier S. Castresana, University of Navarra, Spain

Received: August 7, 2012; **Accepted:** October 1, 2012; **Published:** November 7, 2012

Copyright: © 2012 Mayol et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, 2007; PI070286) and Spanish Society against Cancer (Asociación Española Contra el Cáncer, 2007). G.M. is supported by a grant of Hospital Sant Joan de Déu of Barcelona (Grant BR201102), S.G. by a donation from the NEN association and J.I.M.-S. studies on epigenomics are supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (RyC contract and SAF2009-08663).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: clavarino@fsjd.org

Introduction

Neuroblastoma (NB), the most common extracranial tumor of childhood, is a complex developmental malignancy characterized by numerous biologically significant genetic alterations that are intimately associated with the clinical outcome of patients [1]. In addition to genetic changes, the complex and heterogeneous clinical evolution of NB greatly depends on patient's age at diagnosis, as well as clinical stage and histopathologic features of the tumor [1].

Altered DNA methylation patterns have been widely reported to be a critical factor in cancer development and progression. In particular, regional DNA hypermethylation (hyperM) of CpG islands in promoter regions of tumor suppressor genes as well as global hypomethylation (hypoM) affecting DNA repeats are considered to be the most frequent cancer-related epigenetic changes [2,3]. So far, most studies have focused their attention on the role and mechanisms of promoter hyperM, since loss of global

DNA methylation was believed to affect DNA repeats and to be mainly involved in structural-nuclear functions such as chromosomal instability [2].

Although the genomic profile of NB is well-characterized, DNA methylation changes have not been extensively studied in these tumors. Several genes have been reported as being methylated in NB [4–9], nevertheless the genome-wide DNA methylation pattern of NB is still greatly unknown. The aim of the present study was to investigate the pattern of epigenetic changes in NB at the genome-wide level using DNA methylation-specific microarrays. Besides identifying changes globally associated with NB, we characterized DNA methylation patterns associated with distinct clinical and biological subtypes of the disease. Interestingly, we observed that gene-specific loss of DNA methylation is more prevalent than promoter hyperM. Such hypoM affected cancer-related biological functions and genes relevant to NB pathogenesis such as *CCND1* [10].

Materials and Methods

Patients and samples

A total of 25 primary neuroblastic tumors (NT) including 22 NBs, 2 ganglioneuromas (GN) and 1 ganglioneuroblastoma (GNB) were used for genome wide methylation analysis. Additionally, an independent cohort of 13 NBs and 2 GN was used for bisulfite pyrosequencing, mRNA gene expression and DNA copy number variation analyses (Table 1 and Table S1A). GN and GNB as well as normal human fetal brain (FB) and adrenal gland (AG) tissues were used as reference samples. NB risk assessment was defined by the International Neuroblastoma Staging System (INSS) [11]. Tumor samples were assessed by a pathologist (M.S.), only tumors with >70% viable tumor cell content were included in the study. DNA was isolated from snap-frozen samples using Cell Lysis Solution (Promega, USA) and proteinase K (Sigma, USA) following manufacturers' protocols.

Ethics statement: The study was approved by the Institutional Research Ethics Committee (Comité Ético de Investigación Clínica, Fundación Sant Joan de Déu – CEIC-FSJD). Patients/parents/guardians signed an informed consent before collection of samples.

Genome-wide DNA methylation profiling

DNA methylation profiling was performed using the Infinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina, USA). Genomic DNA bisulfite conversion and hybridization to the platform was performed at the Human Genotyping Unit at the Spanish National Cancer Center (CEGEN-CNIO, Madrid, Spain), as previously described. Data were analyzed using the BeadStudio software (version 3, Illumina Inc, USA) [12,13]. For each CpG site we calculated the beta-value (β value), which is a quantitative measure of DNA methylation levels ranging from 0 for completely unmethylated to 1 for completely methylated cytosines. Possible sources of biological and technical biases that could affect our results such as gender-specific and low quality CpGs were excluded from the study [14–16]. Methylation microarray data have been deposited at Gene Expression Omnibus data repository (GSE39626).

Differential DNA methylation analysis

Since there is no consensus strategy for differential methylation analysis, we used three different approaches. First, CpG sites were categorized as hyperM when β values were <0.25 in the reference samples and >0.75 in at least 10% of NB samples, and hypoM when β values were >0.75 in the reference samples and <0.25 in at least 10% of NB samples. Second, differential methylation was defined as mean β values between NB and reference samples showing an absolute difference greater than 0.25 [17]. Finally, an unpaired t-test was performed using Step Down Permutation (SDP) [18] and False Discovery Rate (FDR) analyses [19]. Venn diagrams were used to compare lists of differentially methylated CpGs (<http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>) and only those concomitantly identified by all three classification criteria were defined as differentially methylated.

Hierarchical clustering and principal component analysis

Unsupervised and supervised agglomerative hierarchical clustering were performed using the Cluster Analysis tool from Bead Studio (version 3, Illumina Inc, USA). Principal Component Analysis (PCA) was performed with R (www.r-project.org) using the FactoMineR package available through Bioconductor.

Bisulfite pyrosequencing

To validate DNA methylation data, bisulfite pyrosequencing (BPS) analysis was performed as previously described [20]. Briefly, genomic DNA was bisulfite converted using EpiTect Plus Bisulfite Conversion Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. A subsequent PCR amplification was performed using biotinylated primers (Table S1B). Pyrosequencing and data analysis were performed with the pyrosequencer analyzer PyroMark Q96 (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions.

Gene expression analysis

To assess expression levels of differentially methylated genes, publicly-available expression microarray data sets [21–23] with representative NB tumor spectra were analyzed. Raw data was normalized to a z-score transformation. Unpaired t-test analysis adjusted by SDP and FDR was performed. Genes with a

Table 1. Patients' clinical and biological characteristics.

Characteristics	Methylation Array Samples (n = 22)	Independent Sample Set (n = 13)
Age, months		
Median	28,9	32,6
Range	0–120	0–216
INSS, n (%)		
Stage 1–3	11 (50)	5 (38,5)
Stage 4	7 (31,8)	6 (46,2)
Stage 4S	4 (18,2)	2 (15,3)
MYCN status, n (%)		
Amplified	5 (22,7)	10 (76,9)
Non-amplified	16 (72,8)	3 (23,1)
Undetermined	1 (4,5)	0

The NB cohort used for genome-wide methylation analysis (Methylation Array Sample Set) as well as the NB cohort used for bisulfite pyrosequencing, mRNA gene expression and DNA copy number variation analyses (Independent Sample Set) are reported in the table.

doi:10.1371/journal.pone.0048401.t001

statistically significant differential expression ($p < 0.01$), z-score > 1 in $> 50\%$ of samples, were considered differentially expressed.

For candidate genes, total RNA isolation and gene expression quantification was performed for 10 cases included in the methylation array and an independent set of 13 NB samples using quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) as previously described [22] (Table S1B).

Bioinformatic annotation of differentially methylated genes

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) was used for gene-annotation enrichment analysis and biological pathway mapping [24]. Probability (Benjamini-Hochberg correction) lower than 0.05 was considered statistically significant.

Differentially methylated genes were classified according to their chromosomal localization. Probability distribution analysis was performed to determine potential chromosome enrichment. P -value < 0.05 was considered statistically significant.

Promoter classification of differentially methylated genes into promoters with high (HCP), intermediate (ICP), low (LCP) and mixed CpG content, as well as the identification of Polycomb (PcG) target genes was performed as previously reported [14].

Hypergeometric probability distribution analysis with a probability cut-off < 0.05 , was performed to determine hyperM or hypoM chromosome enrichment and to determine promoter type and PcG-mark enrichment in differentially methylated genes. Analyses were performed with SPSS version 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL).

Results

DNA methylation profiling and identification of differentially methylated genes in NB

In order to investigate the pattern of DNA methylation in NB, we analyzed 22 primary NB tumors using the Infinium HumanMethylation27 BeadChip microarray. Two GN, 1 GNB, as well as, normal human FB and AG tissues were used as reference samples to identify differentially methylated genes specific for NB.

We initially performed a quality control of the data obtained from the microarray analysis and excluded 3337 gender-specific and low quality CpGs. Additionally, one NB sample (NT18, Table S1A) was excluded because of poor detection p -values.

Unsupervised Principal Component Analysis (PCA) performed on all the samples included in the study, showed that NBs display a clearly distinct DNA methylation profile as compared to normal reference samples (FB and AG) and the clinically less aggressive GNB and benign GN (Figure 1A), being these two entities epigenetically undistinguishable from normal reference samples. In order to identify differentially methylated genes in NB, supervised analyses were performed using independently three different reference samples (FB, AG and 2 GN with 1 GNB). By comparing gene lists generated by these analyses we were able to identify a common set of 351 genes, being 23 hyperM and 328 hypoM, in NB (Figure 1B, Table S2A). This set of genes will be hereafter referred as NB-specific genes. We then performed a supervised hierarchical cluster and a PCA using the hyperM and hypoM gene sets separately. Remarkably, the DNA methylation pattern of hyperM genes allowed us to differentiate NBs with diverse *MYCN* amplification status. Interestingly, hypoM genes segregated NBs by their age at diagnosis, clustering those with 5 or more years separately from younger patients (Figure 1C and 1D).

The NB-specific genes were ranked according to the percentage of samples found differentially methylated and the level of β value changes. The most clearly hyperM genes in our series were *EMP1*, *RASSF1A*, *ACTC*, *GNG12*, *HOXD3*, *PAMR1*, *IL17RC*, *CARD11*, *POU2F2* and *P2RY6* (Table S2B). Among these, *RASSF1A* and *POU2F2* have previously been described methylated in NB tumors and cell lines. Here, both genes showed clearly increased methylation levels in $\geq 80\%$ of the NB samples, which is consistent with prior reports [5,7,25]. Besides, to our knowledge only *HOXD3* has previously been described hyperM in cancer, specifically in prostate carcinoma [26,27].

Applying the same strategy, 69 genes were clearly hypoM in NB (Table S2B). Notably, among these we identified *CCND1*. This gene has been reported to be highly expressed in a significant portion ($> 75\%$) of NB tumors and cell lines [10,28]. The 17 CpGs analyzed across the length of the *CCND1* locus revealed a complex epigenetic pattern in NB cases and control samples (Figure 2A). In NB, we observed a reduction of DNA methylation levels at 12 of 17 CpG sites and a significant hypomethylation, using stringent criteria, only at two CpGs (Target IDs cg04717045 and cg02723533). Unexpectedly, DNA methylation loss was observed outside the 5' region of *CCND1*, which was unmethylated in NB cases and control samples. Hypomethylation within the gene-body was not considered significant due to epigenetic heterogeneity in the reference samples (Figure 2A). The 3' untranslated region (3'-UTR), in contrast, was consistently methylated in reference samples and hypomethylated in a large fraction of NBs. At the two significantly hypoM sites, 17 of 21 NB lose methylation as compared to all the reference samples (β value > 0.90), being 11 of them markedly hypoM (Figure 2A).

DNA methylation changes in clinically and biologically relevant NB subgroups

A supervised approach was used to analyze differential DNA methylation profiles between clinical and biologically relevant NB subgroups.

High-risk (HR) NBs ($n = 9$), defined as stage 4 and *MYCN* amplified (*MYCN* A) tumors, were compared with low-risk (LR) NBs ($n = 8$), which include stage 1 to 3 *MYCN* non-amplified (*MYCN* NA) tumors. A total of 19 clearly differentially methylated genes were identified. Five genes were hyperM in HR with respect to LR NB and reference samples, whereas no hypoM gene was observed in this clinical subgroup. In contrast, hyperM was not observed in LR NBs whilst 14 genes exhibited *de novo* loss of methylation in this clinically favorable subgroup (Table S2C).

We next compared the two clinically relevant metastatic NB subgroups, i.e. stage 4 ($n = 6$) and stage 4S ($n = 4$) NBs. We identified a total of 9 differentially methylated genes. Of these, 2 genes were hyperM in at least 3 of 4 stage 4S NBs and no hyperM was detected in stage 4 NBs. With regard to hypoM, 5 and 2 genes were observed in stage 4S and 4 NBs, respectively (Table S2C).

Comparing *MYCN* A ($n = 5$) and NA ($n = 15$) tumors, we identified 23 differentially methylated genes (7 hyperM and 16 hypoM) in *MYCN* amplified with respect to non-amplified tumors and reference samples (Table S2C).

Finally, we compared NBs based on patient's age at diagnosis using the clinically-established 18 month age cut-off, i.e. < 18 months ($n = 11$) and ≥ 18 months ($n = 10$). According to our selection criteria, no consistently differentially methylated genes were identified, most likely due to the high heterogeneity in both subgroups. Based on the supervised PCA analysis shown in Figure 1D, we observed that patients with 5 or more years of age segregated separately from the younger patients, suggesting different underlying methylation patterns. A supervised analysis

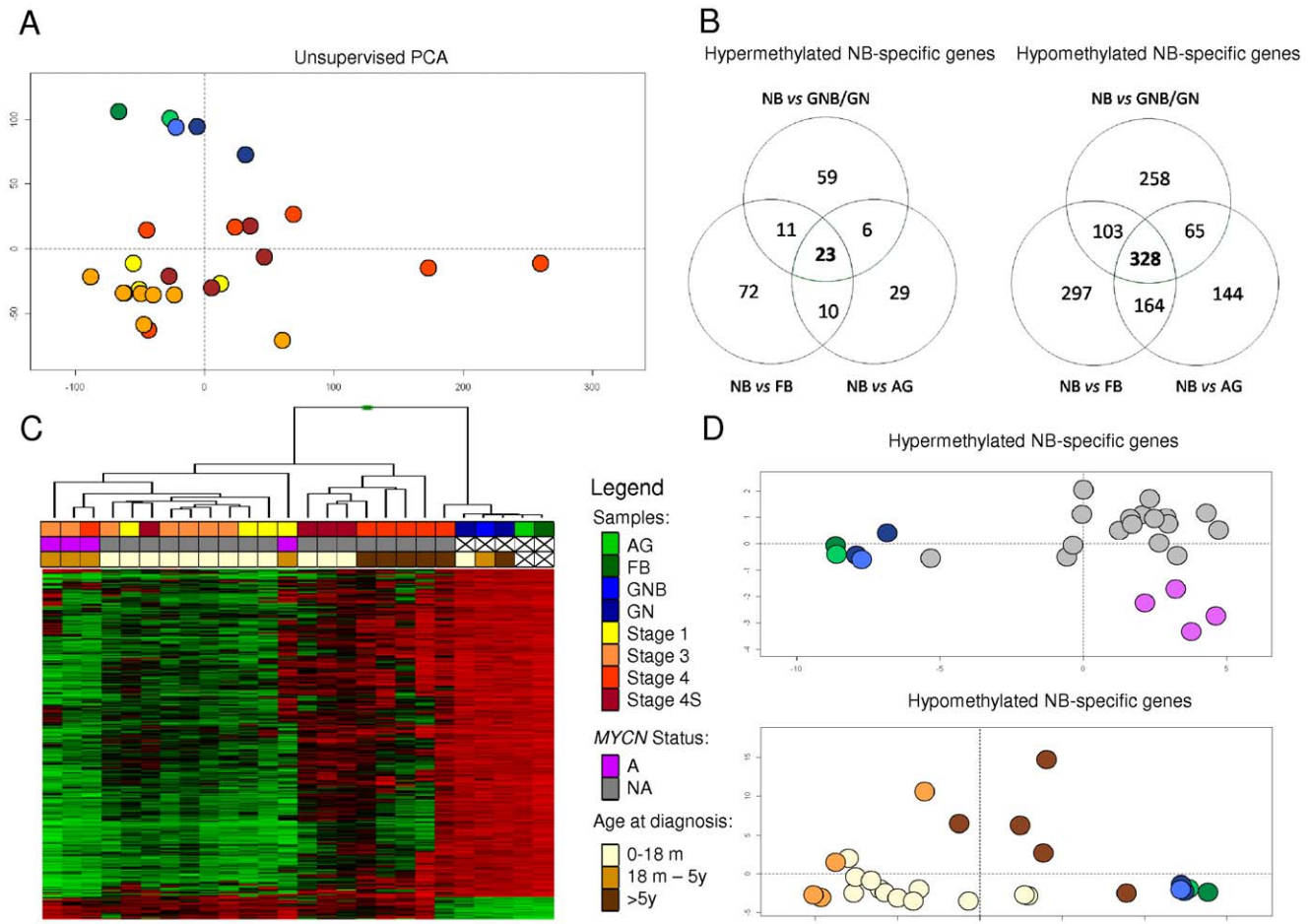


Figure 1. DNA methylation profiling and identification of differentially methylated genes in NB. **A:** Unsupervised Principal Component Analysis (PCA) of array-based DNA methylation data in 21 neuroblastomas (NB) (classified according to INSS Stage), 2 ganglioneuroma (GN), 1 ganglioneuroblastoma (GNB); and normal reference samples: fetal brain (FB) and adrenal gland (AG). **B:** Venn diagram showing the strategy used to identify NB-Specific genes. Hypermethylated and hypomethylated genes in NB were determined using three different supervised analyses with distinct reference samples (FB, AG and GN/GNB). **C:** Supervised hierarchical cluster analysis of DNA methylation data from NB-specific genes in 21 NB samples, 2 GN, 1 GNB; and 2 normal reference samples: FB and AG. **D:** Supervised Principal Component Analysis (PCA) in 21 NB samples, 2 GN, 1 GNB; and normal reference samples: FB and AG for NB-specific genes. doi:10.1371/journal.pone.0048401.g001

was thus performed using two age cut-offs, 18 months and 5 years (i.e. 0 to <18 months ($n = 12$), ≥ 18 months to <5 years ($n = 4$), ≥ 5 years ($n = 5$)). Differences between the methylation patterns of the three age subgroups were observed. However, methylation was heterogeneous in patients younger than 5 years, but clearly distinct from the older NB patients (Table S2C). Applying only a 5 year age cut-off (<5 years, $n = 16$ and ≥ 5 years, $n = 5$), we identified a clear DNA methylation pattern characterized by a set of genes with a consistent loss of DNA methylation in patients younger than 5 years of age compared with the older patients, the latter being similar to reference samples (Table S2C).

Technical and clinical validation of candidate genes by pyrosequencing

DNA bisulfite pyrosequencing of 3 NB-specific candidate genes (*EMPI*, *GNGI2* and *CCND1*) as well as of *EPSTII*, which is differentially methylated in clinically relevant NB subgroups, was performed to validate DNA methylation array data. Two NB tumors included in the microarray as well as an independent cohort of 13 NB and 2 GN samples were used for this aim. First,

the degree of correlation between microarray DNA methylation and BPS data was tested and found to be significantly high ($r = 0.958$, $p < 0.001$) (Figure S1).

Consistent with the array results, *EMPI* and *GNGI2* NB-specific genes showed high methylation levels compared to reference samples in all the NB cases of the validation set ($n = 13$) (Figure S2B and S2C). *CCND1* showed a clear loss of methylation in 10 of the 13 independent NBs tested, which is in line with the proportion of hypoM cases identified by the methylation array (Figure 2A, 2B and 2C, Figure S2A). *EPSTII* methylation analysis in the validation series also confirmed the array data (Figure S2D).

Association between DNA methylation and gene expression

To investigate whether differential DNA methylation in NB is associated with gene expression, we analyzed published gene expression data of independent and representative NB tumor sets [21–23]. Expression data was available for 13 of 23 hyperM and 136 of 328 hypoM NB-specific genes (Table S3A). Five of thirteen (38.4%) hyperM genes showed lower expression levels as

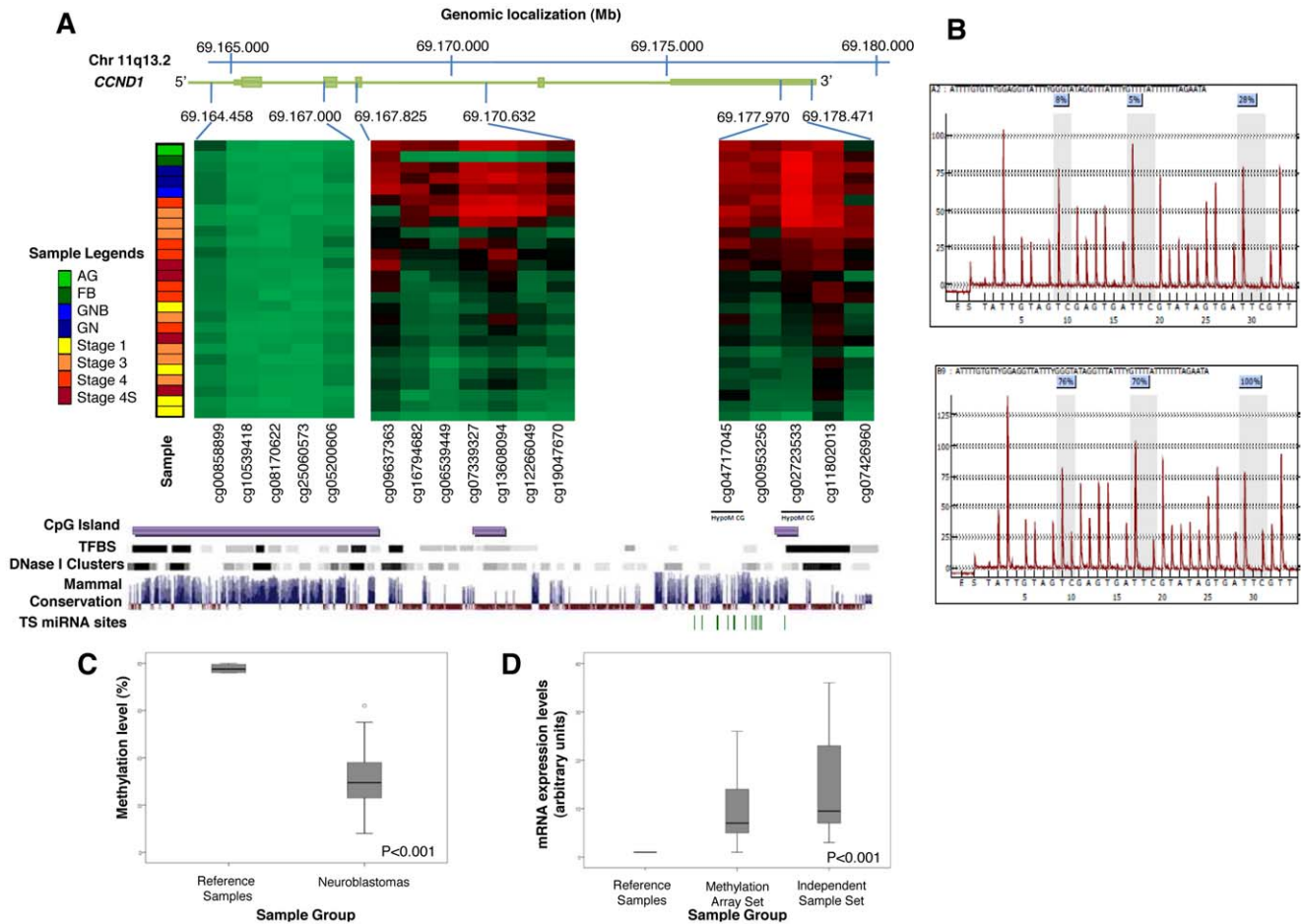


Figure 2. Methylation and expression data of *CCND1*. **A:** Graphical display of the DNA methylation levels of the 17 CpGs measured across the *CCND1* length. The heatmap shows the data from 21 neuroblastoma (NB) and reference samples (2 GN, 1 GNB; 1 FB and 1 AG). Below the heatmap we show some genomic features of the *CCND1* locus (UCSC Genome Browser, data from the hg19 adapted to the hg18) including Transcription Factor binding sites (TFBS), evolutionary conserved DNaseI hypersensitive domain (DNaseI cluster) and Vertebrate Multiz Alignment, PhastCons Conservation (Mammal Conservation) and miRNA target sites (TS). **B:** DNA methylation-specific pyrograms for *CCND1*. The pyrogram above corresponds to a neuroblastoma sample whereas the pyrogram below corresponds to a reference sample (FB). Grey shading shows the percentage of methylation observed for the CpGs analyzed. **C:** Box-plot for DNA methylation data of *CCND1* obtained by bisulfite pyrosequencing in an independent cohort of 13 NB and 2 GN samples and reference samples. **D:** mRNA expression levels of *CCND1* analyzed by qRT-PCR in two NB independent cohorts. doi:10.1371/journal.pone.0048401.g002

compared to reference samples. In contrast, 10 of 136 genes (7.3%) with lower methylation levels were highly expressed in NB as compared to reference samples. These results are in line with previous studies reporting that only a fraction of genes with promoter hypomethylation show a significant increase in gene expression, being, possibly, conditioned to specific activation [29–30].

To validate if differential DNA methylation in NB is associated with gene expression changes, we analyzed 5 candidate genes by qRT-PCR in 23 NBs with available RNA (10 cases included in the methylation array and an independent set of 13 NB samples). In general, hyperM genes showed lower expression levels in NB samples compared to reference samples. Likewise, most hypoM genes showed higher expression levels in the NB tumors with respect to reference samples, confirming microarray data (data not shown). *CCND1* was found to be highly expressed in all NB samples, consistent with previous reports [10,31] (Figure 2D).

Biological and functional features of differentially methylated genes in NB

Differentially methylated genes were functionally characterized using bioinformatic approaches. A gene ontology (GO) analysis of genes hypoM in NB allowed the identification of significantly enriched ($p < 0.05$) functions such as defense response, immune response, immune system process, response to stimulus and epidermis development (Table S3B). Due to the small sample size, gene sets derived from other comparisons did not result in any significantly enriched GO term.

Most studies in adult tumors have reported that hyperM genes are enriched in promoters with high CpG content (HCP) and PRC2 target genes in embryonic stem cell (ESC) [17]. Remarkably, in our series, the group of hyperM genes showed a loss for HCP promoters (21.7% vs. 53.5% in the background, $p = 0.072$) and an enrichment for ICP promoters (34.78% vs. 11.68% in the background, $p = 0.012$). No significant enrichment for PRC2 targets was observed (13% vs. 9.6% in the background, $p = 0.49$). In contrast, hypoM genes showed the previously reported pattern [17], i.e. they were associated with an increase for low CpG

content promoters (LCP) (68.3% vs. 22.6% in the background, $p < 0.001$) and a decrease of PRC2 targets (3.3% vs. 9.6% in the background, $p < 0.001$) (Table S3C).

To determine if differential methylation in NB occurs homogeneously throughout the genome, the chromosome distribution of NB-specific genes was analyzed. Given the small number of hyperM genes no significant enrichment or grouped tendency was observed (Table S3D). Conversely, a significant portion of hypoM genes mapped to chromosomes 1 (48 genes), 17 (25 genes), 19 (58 genes) and 21 (9 genes) ($p < 0.05$ for all) and showed chromosome specific localization. These genes mapped to specific chromosome regions 1p36 (20%) and 1q21 (25%), chromosome 17p13 and 17q21 (both 27%), whereas the majority of genes identified on chromosome 19 were restricted to 19p13 (>70%; 43 of 58), and all chromosome 21 hypoM genes mapped to 21q22 (9/9).

Discussion

In the present study, we have analyzed the pattern of differential methylation in primary NB samples using microarray-based DNA methylation analysis. Unsupervised PCA showed that DNA methylation profiles in NB are clearly distinct from those of the clinically less aggressive GNB and benign GN and the normal reference samples used in this study (Figure 1A). Differential DNA methylation analysis using stringent criteria enabled us to identify DNA methylation changes characteristic of NB tumors. Interestingly, the pattern of hyperM and hypoM was found to be associated with clinic-biologically relevant subgroups of NB tumors. Specifically, the DNA methylation pattern of hyperM genes allowed us to differentiate NBs with diverse *MTCN* amplification status. HypoM genes segregated cases according to age at diagnosis, clustering those with 5 or more years separately from younger patients (Figure 1D). Supervised DNA methylation analysis comparing well-known NB clinical subgroups confirmed the existence of differentially methylated genes between high and low risk tumors, *MTCNA* from NA tumors as well as stage 4 from stage 4S NB. Previous reports analyzing specific candidate genes have identified hypermethylated genes associated with *MTCN* amplification status in NB cell lines and tumors [4], thus corroborating the existence of subgroup-specific DNA methylation patterns in NB. However, no consistent DNA methylation differences were identified when comparing subgroups using the clinically established prognostic age cut-off of 18 months. In contrast, in line with the analysis shown in Figure 1D, a consistent loss of DNA methylation was observed in patients younger than 5 years as compared to older patients and reference samples (Table S2C). In NB, age at time of diagnosis is a powerful marker of tumor behavior, and is thus critical in the prognostic evaluation of this developmental malignancy [32]. Traditionally, patient's age has been analyzed as a binary function, with a cut-off point initially established at 12 months and recently set at a more optimal prognostic age cut-off of 18 months [32]. However, the International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system) evaluates the prognostic impact of the histological features of the tumor considering two age cut-offs at time of diagnosis: 18 months and 5 years [33]. Interestingly, although we observed age-related DNA methylation patterns recalling these two age cut-offs, they were more consistent using the 5 years cut-off.

Overall, we observed that loss of DNA methylation is more prevalent than promoter hyperM in NB. This is in line with the well known global hypomethylation of cancer cell DNA, generally believed to affect repetitive sequences and satellite DNA and to contribute to the generation of chromosomal instability [2].

Therefore, gene-specific hypomethylation has not been extensively studied. Interestingly, we observed that hypoM affected genes relevant to NB pathogenesis such as *CCND1*. Cyclin D1 is a regulator subunit of cyclin-dependent kinases required for cell cycle G1/S transition that has been described highly expressed in various types of solid tumors as well as in more than 75% of NBs. The cause of *CCND1* overexpression in these tumors is greatly unknown. High-level amplifications of *CCND1* have been reported only in a small percentage (2%) of NB tumors [10]. Therefore, mechanisms other than gene amplification seem to be responsible for increased *CCND1* expression [34]. Recently, *GATA3*, a transcription factor overexpressed in NB, has been reported to be implicated in *CCND1* overexpression [35]. In this study, we observed loss of *CCND1* gene methylation in more than 70% of the NB tumors analyzed, associated with high *CCND1* expression levels and absence of gene amplification (data not shown). Differentially methylated CpGs were not localized in the promoter region but in the 3' untranslated region (Figure 2A). Interestingly, based on the data available in the UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19), the 3'-UTR of *CCND1* is an evolutionary conserved DNaseI hypersensitive domain highly enriched for microRNA target sites and Transcription Factor binding sites, including *GATA3*, *MYC*, *FOXA1/2* and *JUND*, among others. Experimental data supporting the functional role of the 3'-UTR region in the expression of *CCND1* have been reported in mantle cell lymphomas (MCL), where in addition to the fusion of *CCND1* gene on chromosome 11 to the immunoglobulin heavy chain enhancer, the loss of the 3'-UTR has been linked to hyperproliferative MCL [36]. However, *CCND1* rearrangements leading to loss of the 3'-UTR have been observed only in a very small percentage of NBs [10]. Noteworthy, in our series *CCND1* hypoM occurs in the presence of *RASSF1A* promoter hyperM. Selective epigenetic silencing of *RASSF1A* is a common event in human cancer, including NB where it has been reported hypermethylated in >75% of tumors [5,25]. Ras association domain family 1 isoform A is a tumor suppressor that negatively regulates cell proliferation by inhibiting cyclin D1 protein accumulation through posttranscriptional mechanisms [37]. *RASSF1A* hyperM has previously been inversely associated with cyclin D1 expression and tumor cell proliferation [38]. It is thus tempting to speculate that loss of *CCND1* gene methylation in the 3'-UTR regulatory region and concomitant hypermethylation of *RASSF1A* could represent a potential mechanism underlying *CCND1* gene overexpression in NB.

Loss of methylation also affected genes with cancer-related biological functions i.e. *SPRR3*, previously reported as hypomethylated in cancer, specifically in hepatocellular carcinoma [39]. Overexpression of *SPRR3* has been reported to promote breast and colon cancer proliferation by enhancing p53 degradation via the *AKT* and *MAPK* pathways [40,41]. HypoM also affected genes reported to stimulate cell proliferation, i.e. *BTC*, *EGF* and *FGF6*. Betacellulin, member of the EGF family, has recently been reported to induce proliferation of neural stem cells and prevent spontaneous differentiation in cell culture via both the EGF receptor (*EGFR*) located in NSCs and *ErbB4* on neuroblasts [42]. The epidermal growth factor also acts via the EGFR to stimulate cell proliferation and neoplastic transformation. Fibroblast growth factor 6, a FGF family member, is implicated in self-renewal and maintenance of pluripotency of ES and iPS cells [43].

On the other hand, epigenetically suppressed genes included genes involved in tissue development and differentiation. Among these, *POU2F2*, previously described as being hypermethylated in NB tumors and cell lines, encodes a transcription factor involved in neuronal differentiation [7,44]. Homeobox D3, member of the

Hox gene family, has been described associated with the modulation of cell-adhesive properties during embryonic development [45]. Aberrant methylation of *HOXD3* has not been described previously in NB, but has recently been reported as a novel biomarker of prostate cancer progression together with *RASSF1A*, *TGF- β* and *APC* [27]. Differentiation-related genes included *IRF6*, which encodes a transcription factor that regulates craniofacial development and epidermal proliferation. *IRF6* downregulation has been correlated with promoter methylation in invasive squamous cell carcinomas [46]. Epithelial membrane protein-1, a member of the peripheral myelin protein 22 family expressed in first differentiating neurons, has been described involved in neural differentiation [47]. Downregulation of *EMPI1* has been described in squamous cell lung carcinoma suggesting a potential tumor suppressor function [48].

The functional characterization of differentially methylated genes revealed that hyperM occurs predominantly at ICP promoters, while hypoM affects mostly LCP genes, regardless of the NB subgroup studied. Moreover, the vast majority of changes of DNA methylation were observed in genes that are not targets of PcG proteins in ESCs. These findings are in contrast with most other tumors in which *de novo* methylation affects predominantly genes with dense CpG island promoters highly enriched for PcG targets [14,16,17]. The epigenetic features of NB identified in this study may be related to the embryonic origin of this developmental disease, fundamentally different from that of adult cancers. Additionally, chromosome distribution of NB-specific genes showed that global DNA hypoM in NB is organized not only at the functional level but also at spatial level since it significantly affects specific chromosomes as well as chromosomal regions previously described to be recurrently altered in NB.

This study provides a genome-wide view of the DNA methylation landscape in NB. However, it is worth mentioning that our conclusions are based on a small cohort of cases which may have led to an overestimation of the data, and that the array used does not differentiate 5-methylcytosine from 5-hydroxymethylcytosine. In spite of these caveats, our findings suggest that hypoM is a prevalent epigenetic alteration in NB that affects cancer-related biological functions and specific genes relevant for NB pathogenesis, such as *CCND1*. Moreover, hypomethylation involves chromosomal regions recurrently altered in this malignancy.

References

- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106–2120.
- Esteller M (2008) Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med* 358: 1148–1159.
- Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11: 726–734.
- Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M (2004) Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 96: 1208–1219.
- Michalowski MB, de Fraipont F, Plantaz D, Michelland S, Combaret V, et al. (2008) Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors. *Pediatr Blood Cancer* 50: 29–32.
- Kamimatsuse A, Matsuura K, Moriya S, Fukuba I, Yamaoka H, et al. (2009) Detection of CpG island hypermethylation of caspase-8 in neuroblastoma using an oligonucleotide array. *Pediatr Blood Cancer* 52: 777–783.
- Carén H, Djos A, Nethander M, Sjöberg RM, Kogner P, et al. (2011) Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma. *BMC Cancer* 11: 11–66.
- Grau E, Martínez F, Orellana C, Canete A, Yañez Y, et al. (2011) Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. *Mol Carcinog* 50: 153–162.
- Buckley PG, Das S, Bryan K, Watters KM, Alcock L, et al. (2011) Genome-wide DNA methylation analysis of neuroblastic tumors reveals clinically relevant epigenetic events and large-scale epigenomic alterations localized to telomeric regions. *Int J Cancer* 128: 2296–2305.
- Molenaar JJ, van Sluis P, Boon K, Versteeg R, Caron HN (2003) Rearrangements and increased expression of cyclin D1 (*CCND1*) in neuroblastoma. *Genes Chromosomes & Cancer* 36: 242–249.
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, et al. (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11: 1466–1477.
- Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, et al. (2009) Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. *Epigenomics* 1: 177–200.
- Kanduri M, Cahill N, Göransson H, Enström C, Ryan F, et al. (2010) Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115: 296–305.
- Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, et al. (2009) New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood* 113: 2488–2497.
- Martinez R, Martin-Subero JI, Rohde V, Kirsch M, Alaminos M, et al. (2009) A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics* 4: 255–264.
- Richter J, Ammerpohl O, Martín-Subero JI, Montesinos-Rongen M, Bibikova M, et al. (2009) Array-based DNA methylation profiling of primary lymphomas of the central nervous system. *BMC Cancer* 9: 455.
- Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Agirre X, et al. (2009) A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One* 4: e6986.

Our findings also provide evidence for the existence of DNA methylation profiles characteristic of NB. We identified specific DNA methylation changes associated with clinical and genetic features of NB tumors, suggesting altered DNA methylation patterns as a critical factor for NB tumorigenesis.

Supporting Information

Figure S1 Technical validation of methylation analysis. (TIFF)

Figure S2 Biological validation of methylation analysis. (TIFF)

Table S1 Table S1A: Clinical and biological data of samples. Table S1B: Primer information. (XLSX)

Table S2 Table S2A: Methylation status of the CpG dinucleotide analyzed to identify NB-specific genes. Table S2B: NB-specific ranked genes. Table S2C: Differentially methylated genes in NB subgroups. (XLSX)

Table S3 Table S3A: Gene expression data from microarrays of NB-specific genes. Table S3B: Gene-ontology terms enrichment for differentially methylated genes. Table S3C: Polycomb Repressive Complex 2 (PCR2) target genes and promoter class distribution of NB-specific genes. Table S3D: Chromosomal distribution of NB-specific genes. (XLSX)

Acknowledgments

Authors would like to thank Gloria Garcia Castellvi and Mercè Tura for their remarkable fund raising support and Nuria Russiñol for her excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CL GM JIM-S JR. Performed the experiments: CL GM JIM-S JR AQ MK SG. Analyzed the data: CL GM JIM-S JR AQ MK MS SG. Contributed reagents/materials/analysis tools: CL GM JIM-S JR AQ MK ME IG CdT ER PG JM. Wrote the paper: CL GM JIM-S JR JM.

18. Westfall PH and Young SS (1993) Resampling-based Multiple Testing: Examples and Methods for p-values Adjustment. New York: John Wiley & Sons Inc.
19. Benjamini Y and Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 57: 289–300.
20. Tost J and Gut I (2007) DNA methylation analysis by Pyrosequencing. *Nat Protoc* 2: 2265–2275.
21. Wang Q, Diskin S, Rappaport E, Attiyeh E, Mosse Y, et al. (2006) Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. *Cancer Res* 66: 6050–6062.
22. Lavarino C, Garcia I, Mackintosh C, Cheung NK, Domenech G, et al. (2008) Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status. *BMC Med Genomics* 1: 36.
23. Lavarino C, Cheung NK, Garcia I, Domenech G, de Torres C, et al. (2009) Specific gene expression profiles and chromosomal abnormalities are associated with infant disseminated neuroblastoma. *BMC Cancer* 9: 44.
24. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, et al. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4: P3.
25. Hesson LB, Cooper WN, Latif F (2007) The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers* 23: 73–87.
26. Kron K, Pethe V, Briollais L, Sadikovic B, Ozcelik H, et al. (2009) Discovery of novel hypermethylated genes in prostate cancer using genomic CpG island microarrays. *PLoS One* 4: e4830.
27. Liu L, Kron KJ, Pethe W, Demetrashvili N, Nesbitt ME, et al. (2011) Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGF β 2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression. *Int J Cancer* 129: 2454–2462.
28. van Noesel MM, Versteeg R (2004) Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene* 325: 1–15.
29. Stefanska B, Huang J, Bhattacharyya B, Suderman M, Hallett M, et al. (2011) Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer. *Cancer Res* 71: 5891–5903.
30. Calvanese V, Fernández AF, Urduingio RG, Suárez-Alvarez B, Mangas C, et al. (2012) A promoter DNA demethylation landscape of human hematopoietic differentiation. *Nucleic Acids Res* 40: 116–131.
31. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJ, et al. (2008) Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* 68: 2599–2609.
32. Sano H, Bonadio J, Gerbing RB, London WB, Matthay KK, et al. (2006) International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *Eur J Cancer* 42: 1113–1119.
33. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, et al. (1999) The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86: 364–372.
34. Donnellan R, Chetty R (1998) Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol* 51: 1–7.
35. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, Santo E, Geerts D, et al. (2010) Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells. *Oncogene* 29: 2739–2745.
36. Deshpande A, Pastore A, Deshpande AJ, Zimmermann Y, Hutter G, et al. (2009) 3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene. *Cell Cycle* 8: 3584–3592.
37. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA (2002) The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 22: 4309–4318.
38. Pizzi S, Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, D'Adda T, et al. (2005) RASSF1A promoter methylation and 3p21.3 loss of heterozygosity are features of foregut, but not midgut and hindgut, malignant endocrine tumors. *J Pathol* 206: 409–416.
39. Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C, Haake A, Faber W, et al. (2012) Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 130: 1319–1328.
40. Kim JC, Yu JH, Cho YK, Jung CS, Ahn SH, et al. (2011) Expression of SPRR3 is associated with tumor cell proliferation in less advanced stages of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 133: 909–916.
41. Cho DH, Jo YK, Roh SA, Na YS, Kim TW, et al. (2010) Upregulation of SPRR3 promotes colorectal tumorigenesis. *Mol Med* 16: 271–277.
42. Gómez-Gaviró MV, Scott CE, Sesay AK, Matheu A, Booth S, et al. (2012) Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 1317–1322.
43. Chen G, Gulbranson DR, Yu P, Hou Z, Thomson JA (2012) Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30: 623–630.
44. Theodorou E, Dalembert G, Heffelfinger C, White E, Weissman S, et al. (2009) A high throughput embryonic stem cell screen identifies Oct-2 as bifunctional regulator of neuronal differentiation. *Genes Dev* 23: 575–588.
45. Taniguchi Y, Tanaka O, Sekiguchi M, Takekoshi S, Tsukamoto H, et al. (2011) Enforced expression of the transcription factor HOXD3 under the control of the Wnt1 regulatory element modulates cell adhesion properties in the developing mouse neural tube. *J Anat* 219: 589–600.
46. Botti E, Spallone G, Moretti F, Marinari B, Pinetti V, et al. (2011) Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 13710–13715.
47. Wulf P and Suter U (1999) Embryonic expression of epithelial membrane protein 1 in early neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 116: 169–180.
48. Zhang J, Cao W, Xu Q, Chen WT (2011) The expression of EMP1 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and possibly associated with tumor metastasis. *J Clin Pathol* 64: 25–29.

Supporting Information to:

DNA Hypomethylation Affects Cancer-Related Biological Functions and Genes Relevant in Neuroblastoma Pathogenesis. Gemma Mayol, José I. Martín-Subero, José Ríos, Ana Queiros, Marta Kulis, Mariona Suñol, Manel Esteller, Soledad Gómez, Idoia García, Carmen de Torres, Eva Rodríguez, Patricia Galván, Jaume Mora and Cinzia Lavarino.

1. Figure S1. Technical validation of methylation analysis.
2. Figure S2. Biological validation of methylation analysis.
3. Table S1. Table S1A: Clinical and biological data of samples. Table S1B: Primer information.
4. Table S2. Table S2A: Methylation status of the CpG dinucleotide analyzed to identify NB-specific genes. Table S2B: NB- specific ranked genes. Table S2C: Differentially methylated genes in NB subgroups.
5. Table S3. Table S3A: Gene expression data from microarrays of NB-specific genes. Table S3B: Gene-ontology terms enrichment for differentially methylated genes. Table S3C: Polycomb Repressive Complex 2 (PCR2) target genes and promoter class distribution of NB-specific genes. Table S3D: Chromosomal distribution of NB-specific genes.

Todas las tablas (S1, S2 y S3) no se encuentran impresas a continuación, se encuentran en formato digital en el CD que acompaña esta tesis.

Figure S1

Scatter plot of bisulfite pyrosequencing and β values obtained on Infinium HumanMethylation27 BeadChip methylation levels, for 4 genes (*CCND1*, *GNG12*, *EMP1* and *EPST11*) in 4 samples (1 fetal brain, 1 adrenal gland and 2 neuroblastomas).

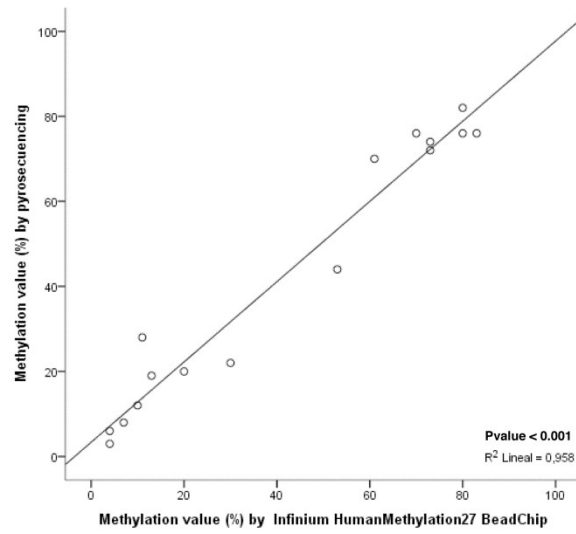
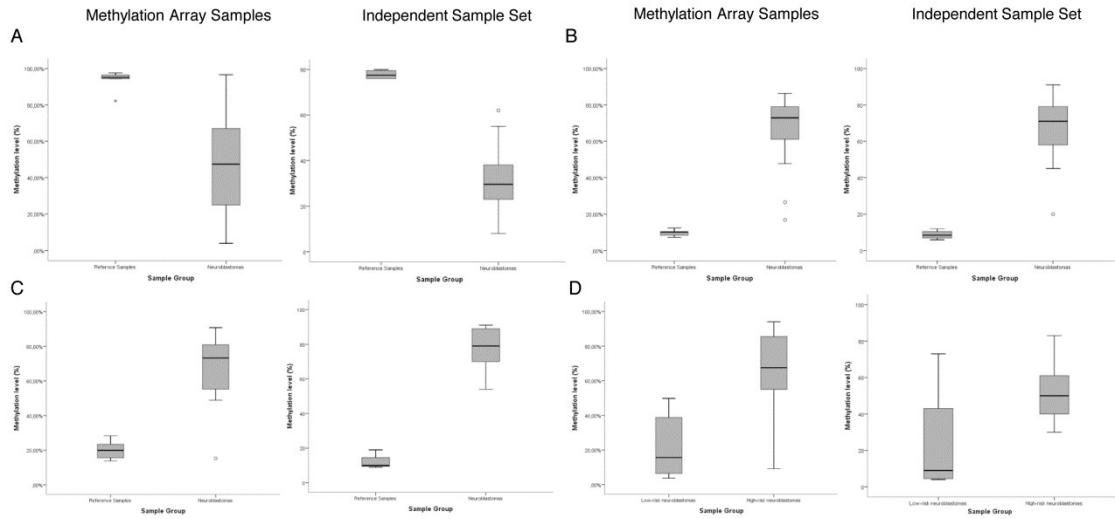


Figure S2

Box plots of β values obtained by Infinium HumanMethylation27 BeadChip (methylation array samples) and Bisulfite Pyrosequencing methylation levels (independent sample set), for A) *CCND1*, B) *EMP1*, C) *GNG12* and D) *EPST11*.



El patrón de metilación específico del neuroblastoma revela nuevos conocimientos biológicos y clínicos

Soledad Gómez, Giancarlo Castellano, Gemma Mayol, Ana Queiros, Marina Bibikova, Kristopher L Nazor, Jeanne F Loring, Isadora Lemos, Eva Rodríguez, Carmen de Torres, Jaume Mora, José I. Martín-Subero y Cinzia Lavarino

Publicado en la revista *Epigenomics* 7(7): 1137-53 doi: 10.2217/epi.15.49

FI: 5.21, Q1.

Soledad Gómez, Giancarlo Castellano, Gemma Mayol, Ana Queiros, José I. Martín-Subero y Cinzia Lavarino

Publicado en la revista *Genomics Data* 5: 360-3 doi: 10.1016/j.gdata.2015.07.016

FI: 0.22

Basándonos en nuestra experiencia anterior, procedimos a ahondar en el análisis del metiloma del ADN del neuroblastoma. Al haber observado en nuestro estudio previo la presencia de alteraciones importantes fuera del promotor, decidimos estudiar los patrones de metilación del neuroblastoma mediante el array *Illumina HumanMethylation BeadChip450K* (HM450K), ya que analiza más de 450.000 sitios de metilación situados no solo a lo largo del promotor, sino también en regiones fuera del promotor: 5'-UTR, cuerpo del gen, 3'-UTR y las regiones intergénicas del genoma. Adicionalmente, el array HM450K incluye 3.091 citosinas en contexto no-CpG (mCHG y mCHH, donde H = A, C o T). Anotamos la localización de las citosinas de forma relativa a múltiples características genómicas tales como la relación con las islas CpG (CGIs) y sus regiones adyacentes (*shores* y *shelves*), la localización genómica, los estados funcionales de la cromatina¹⁹² y la afinidad de los sitios de unión a factores de transcripción. Analizamos mediante el HM450K el estado de metilación del ADN de 35 neuroblastomas primarios y 8 muestras de referencia (n=2 cerebros fetales, n=2 glándulas suprarrenales y n=4 células madre embrionarias humanas). Tras los controles de calidad y el filtrado de los datos nos quedamos con las citosinas que cumplían con nuestros estándares: 475.077 CpGs y 3.091 non-CpGs.

Nuestro estudio mostraba que en neuroblastoma los cambios de metilación del ADN afectan con frecuencia a regiones intragénicas e intergénicas fuera del contexto de promotores. Tal como observamos anteriormente, los neuroblastomas, en comparación con las muestras referencia (11,620 CpGs), exhibían una extensa hipometilación global en combinación con una hipermetilación focal y este patrón se encontraba asociado con parámetros clínico-biológicos establecidos, tales como los grupos de riesgo clínico y el estatus de amplificación del oncogén *MYCN*. El grado de correlación de la metilación del ADN con la expresión génica obtenida de la misma cohorte de neuroblastomas analizada mediante el array *Affymetrix Human Genome U219*, se situaba por debajo del 5%, acorde con publicaciones previas.

Al analizar la metilación diferencial entre los neuroblastomas de distinto riesgo clínico (n=2,695 CpG) observamos que los neuroblastomas de alto riesgo se caracterizaban por una hipermetilación generalizada en comparación a los tumores de bajo riesgo. Estas citosinas diferencialmente metiladas se distribuían de forma no aleatoria y afectaban mayoritariamente a regiones fuera del promotor y fuera del contexto de islas CpG, principalmente en regiones intergénicas y en el cuerpo del gen, concretamente en intrones. En líneas generales, las citosinas asociadas al patrón de metilación de los neuroblastomas de alto riesgo afectaban a genes asociados con cáncer mientras que los tumores de bajo riesgo afectaban a genes asociados con desarrollo. A nivel funcional los cambios de metilación se asociaban mayoritariamente a regiones activas de la cromatina típicas de potenciadores o *enhancers*

(H3K4me1, H3K4me2 y H3K27ac) y de dominios reprimidos por *Polycomb* (H3K27me3), así como a regiones de heterocromatina.

Observamos cambios en la metilación del ADN en una porción significativa de genes previamente descritos con mutaciones o alteraciones genéticas recurrentes en neuroblastoma y relacionados con desarrollo y cáncer, tal como *CCND1*. *CCND1* es un gen relevante en neuroblastoma ya que se encuentra altamente sobreexpresado, sin embargo, la causa de esta sobreexpresión no ha sido plenamente elucidada. En nuestra cohorte, *CCND1* mostraba extensa pérdida de metilación en el cuerpo del gen y en la región 3'-UTR, sin mostrar alteraciones en la región promotora. Estos resultados validan y amplían nuestros hallazgos previos. Una gran proporción de las CpGs identificadas diferencialmente metiladas en *CCND1* mostraban una correlación significativa, mayormente negativa, con la expresión génica. Las alteraciones de metilación en *CCND1* no se encontraban asociadas con ningún evento de amplificación o mutación en el gen. De forma similar a hallazgos previamente publicados en cáncer de mama, identificamos una región de *enhancers* distales, a 160-190kb por delante del inicio de transcripción (TSS) de *CCND1*, con cambios significativos de metilación de CpGs correlacionados significativamente con la expresión génica. En esta región reguladora observamos un enriquecimiento de sitios de unión de factores de transcripción previamente descritos involucrados en la regulación de *CCND1*, como son BHLHE40 (DEC-1) y GATA3.

De forma relevante y en contraste con publicaciones previas en cáncer, hemos identificado la presencia de metilación del ADN de forma significativa en sitios no-CpG en neuroblastoma. La metilación en sitios no-CpG se encontraba mayormente asociada a los tumores clínicamente más favorables y prácticamente ausente en los tumores de clínica desfavorable. Esta metilación se localizaba en regiones intergénicas y en regiones intragénicas, concretamente en intrones de genes relacionados con la diferenciación celular y el desarrollo embrionario tales como *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (ALK)*. El gen *ALK* mostraba extensa metilación en el cuerpo del gen en contexto CpG y no-CpG, sin embargo el promotor del gen se hallaba desmetilado tanto en las muestras referencia como en los neuroblastomas. La pérdida de metilación en CpG no mostró efecto sobre los niveles de expresión de *ALK*, mientras que la metilación intragénica en contexto no-CpG mostraba correlación inversa y significativa con la expresión del gen. Los tumores de alto riesgo carecían de metilación en sitios no-CpG y mostraban niveles de expresión elevados del gen, mientras que los tumores clínicamente favorables mostraban metilación en sitios no-CpG en asociación con bajos niveles de expresión de *ALK*.

Este estudio fue la primera descripción de cambios de metilación en contexto CpG y no-CpG fuera de promotores e islas CpG en neuroblastoma. Con el fin de analizar la potencial asociación de estos cambios de metilación con el curso clínico del neuroblastoma, seleccionamos un grupo reducido de sitios CpG y no-CpG con metilación diferencial entre los tumores con distinto riesgo clínico. Al realizar análisis de supervivencia empleando las citosinas que cumplían nuestros criterios observamos una correlación significativa de las citosinas seleccionadas con la supervivencia libre de evento ($P < 0.001$) y la supervivencia global ($P < 0.005$). Estas observaciones sugieren que los cambios de metilación del ADN en sitios CpG y no-CpG tanto dentro como fuera de CGI y localizados en el cuerpo del gen pueden estar asociados con el comportamiento clínico del neuroblastoma.

Estos hallazgos amplían nuestro conocimiento del rol de la metilación en neuroblastoma y justifican la evaluación exhaustiva de estas modificaciones epigenéticas como fuente novedosa de biomarcadores epigenéticos y dianas terapéuticas para este y, potencialmente, otros tumores del desarrollo. Actualmente hemos analizado y validado parte de los biomarcadores propuestos como parte de un esfuerzo colaborativo con el Dr. F. Westermann del Grupo de Investigación Genómica del neuroblastoma del centro DKFZ de Heidelberg, Alemania.



DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights

Aim: To define the DNA methylation landscape of neuroblastoma and its clinicopathological impact. **Materials & methods:** Microarray DNA methylation data were analyzed and associated with functional/regulatory genome annotation data, transcriptional profiles and clinicobiological parameters. **Results:** DNA methylation changes in neuroblastoma affect not only promoters but also intragenic and intergenic regions at cytosine-phosphate-guanine (CpG) and non-CpG sites, and target functional chromatin domains of development and cancer-related genes such as *CCND1*. Tumors with diverse clinical risk showed differences affecting CpG and, remarkably, non-CpG sites. Non-CpG methylation observed essentially in clinically favorable cases was associated with the differentiation status of neuroblastoma and expression of key genes such as *ALK*. **Conclusion:** This epigenetic fingerprint of neuroblastoma provides new insights into the pathogenesis and clinical behavior of this pediatric tumor.

Keywords: *ALK* • *CCND1* • development • DNA methylome • neuroblastoma • non-CpG sites • nonpromoter methylation

Neuroblastoma, the most frequently occurring solid tumor of childhood, originates from embryonal precursor cells committed to the development of the sympathetic nervous system [1,2]. The clinical behavior of this pediatric malignancy is heterogeneous, whereby spontaneous regression or maturation occurs generally in infants, and aggressive progression is frequently observed in older children with disseminated disease [1–3]. The complex and heterogeneous clinical evolution of neuroblastoma is strongly associated with the patient's age at diagnosis, the extent of the disease as well as with histology and genetic features of the tumor [1]. Specific recurrent chromosomal aberrations, the amplification status of the *MYCN* oncogene as well as DNA ploidy alterations are generally predictive of neuroblastoma behavior; however, these alterations do not fully define the causes of this aggressive pediatric tumor [4–7].

Recent evidence has shown that pediatric solid tumors, including neuroblastoma, har-

bor a paucity of recurrent genetic mutations as compared with other tumors from adults, suggesting that additional mechanisms such as epigenetic alterations may play an important role in the molecular pathogenesis of these developmental tumors [4–7].

DNA methylation of cytosines in the context of CpG dinucleotides is a major regulatory mechanism implicated in cellular processes that are critical for mammalian development [8]. During development, the DNA methylome undergoes genome-wide epigenetic modifications that determine developmental decisions and define the cellular identity [8]. This process sets the basis of cell-specific DNA methylation patterns that persist throughout the lifetime of postmitotic cells [8]. Genome-wide studies have reported extensive disruption of CpG methylation patterns in cancer cells, as a result of global hypomethylation and local hypermethylation [9].

However, cytosine methylation also occurs in sites other than CpG dinucleo-

Soledad Gómez[†], Giancarlo Castellano^{†,2}, Gemma Mayol^{†,1}, Mariona Suñol³, Ana Queiros², Marina Bibikova⁴, Kristopher L Nazor⁵, Jeanne F Loring⁵, Isadora Lemos¹, Eva Rodríguez¹, Carmen de Torres¹, Jaume Mora¹, José I Martín-Subero^{2,6} & Cinzia Lavarino^{*,1}

¹Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Edificio Docente 4th floor, C/ Santa Rosa 39–57, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, 08036, Spain

³Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, 08950, Spain

⁴Illumina, Inc., San Diego, CA 92122, USA

⁵Center for Regenerative Medicine, Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA

⁶Department of Anatomic Pathology, Pharmacology & Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, 08036, Spain

*Author for correspondence:

Tel.: +34 93 280 4000

Fax: +34 93 600 9751

clavarino@fsjd.org

[†]Authors contributed equally

tides (mCHG and mCHH, where H = A, C or T) [10]. It has recently been described that the methylome of embryonic stem cells (ESCs), adult human and mouse brain cortex are enriched for methylation at non-CpG sites [11–15]. The biological importance of this epigenetic phenomenon is still unknown. Similar to CpG methylation, non-CpG methylation undergoes a widespread reconfiguration during brain development from fetal to young adult [11]. Interestingly, non-CpG methylation levels are negligible in fetal cortex, suggesting that the non-CpG methylation detected in ESCs is largely lost upon cell differentiation and then restored in neurons at later developmental stages [11]. However, DNA methylation at non-CpG contexts has rarely been described in cancer cells [16–19].

The great majority of studies that have investigated DNA methylation in neuroblastoma covered only a small fraction of the methylome of this tumor, specifically CpG islands (CGIs) and promoter regions, and were mainly focused on the analysis of specific genes of potential prognostic relevance [20–29]. Such studies rarely provide insights into DNA methylation changes outside these canonical sites. In our study, we have analyzed the DNA methylome of neuroblastoma, an embryonal tumor, using high-density microarrays with the aim of detecting epigenetic modifications at a genome-wide level and identifying clinicobiological associations that shed light into the molecular pathogenesis of this tumor and, potentially of other developmental cancers.

Materials & methods

Patients, samples & cell lines

In total, 35 primary neuroblastoma tumors (including six stage 1, nine stage 3, six stage 4s and 14 stage 4) and seven high-risk neuroblastoma cases with available paired diagnostic and postchemotherapy specimens were obtained from the Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona, Spain). Normal fetal brain (n = 2) and adrenal gland (n = 2) tissues as well as ganglioneuroma samples (n = 2) were used as reference samples. Neuroblastoma risk assessment was defined by the International Neuroblastoma Staging System (INSS) [30]. Patients' clinical and biological characteristics are displayed in [Supplementary Table 1](#). This study was approved by the Institutional Review Boards. Informed consent was obtained.

Neuroblastoma cell lines SK-N-AS and IMR5 were grown under standard culture conditions.

Real-time quantitative PCR, copy number variation analysis & DNA sequencing

See [Supplementary material & methods](#) (online at <http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/EPI.15.49>) and references [31–33].

DNA methylation microarrays

Genomic DNA bisulfite conversion and hybridization to Infinium Human Methylation 450k BeadChip (Illumina, Inc., CA, USA) was performed at the Human Genotyping Unit of the Spanish National Cancer Center (CEGEN-CNIO, Madrid, Spain), as described previously [34].

Data from the Infinium Human Methylation 450k BeadChip of four human embryonic stem cell (hESC) lines (hESC1–4) have been previously reported [35].

Data normalization, quality control & filtering of microarray data

Microarray data were analyzed by Minfi package available through Bioconductor (Minfi: Analyze Illumina's 450k methylation arrays. R package version 3.0.1). To exclude technical biases, we used an optimized pipeline with several filters developed at the IDIBAPS. From the initial dataset of 485,512 sites (excluding probes detecting single nucleotide polymorphisms [SNPs]), we removed those with poor detection p-values ($p > 0.01$) and those with sex-specific DNA methylation (n = 6926). The remaining sites (n = 478,169) were used for downstream analyses. Single cytosine methylation values (β -values) in each sample were calculated as the ratio of the methylated signal intensity to the sum of methylated and unmethylated signals. Methylation values ranged from 0, fully unmethylated, to 1, fully methylated cytosine. hESCs were analyzed separately using the same pipeline. [Supplementary Figure 1](#) shows a summary of this data processing.

Detection of differentially methylated CpG & non-CpG sites

For each cytosine, we computed the difference between the DNA methylation level in the two groups under comparison (e.g., neuroblastoma vs reference samples or low-risk [stages 1–3 and stage 4S, *MYCN* non-amplified; n = 19] versus high-risk tumors [stage 4 or *MYCN* amplified tumors; n = 16]). Only CpGs with homogeneous methylation in fetal brain and adrenal gland controls were considered. CpGs were considered differentially methylated (DM) when: the absolute methylation difference (Delta) between mean DNA methylation values of cases and references was >0.25 ; and when the false discovery rate (FDR)-adjusted Wilcoxon rank test for independent samples was <0.05 .

As the methylation variations affecting non-CpGs are small, non-CpGs were considered differentially methylated when Delta was more than 0.1.

Standard deviation density plots were used to determine the cut-off value for CpG and non-CpG methylation analyses ([Supplementary Figure 2A & B](#)).

Genomic annotation, transcriptional & epigenomic characterization of CpG & non-CpG sites

Microarray DNA methylation data were annotated using the UCSC Genome Browser database (hg19 version) [36]. For location relative to gene, we used the following categories: 10kb_5' (from 1501 to 10,000 bp upstream of the Transcription Start Site [TSS]), 1.5 kb_5' (from 201 to 1500 bp upstream of the TSS), TSS_200 (from TSS to 200 bp upstream of the TSS), 5'UTR, Exon_1 (first exon), Exon (all the others exons), Intron_1 (first intron) Intron (all introns), 3'UTR, 1.5kb_3' (from the transcription termination site [TTS] to 1500 bp downstream TTS), 10kb_3' (from 1501 to 10,000 bp downstream of the TTS) and intergenic regions. For the location relative to CpG Island (CGI) we used: CGI, CGI shore (0–2 kb from CGI edge), CGI shelf (from 2001 bp to 4 kb from the CGI edge) and outside the CGI categories. All CpG and non-CpG sites were annotated according to the chromatin and transcriptional state categories defined from fetal brain tissue profiles (E082) [37].

TFBS analysis

For transcription factor binding site analysis, we used the Transcription Factor ChIP-seq database (161 factors) from ENCODE with Factorbook Motifs track from the UCSC Genome Browser [37].

Functional enrichment analysis

We used the package topGO (topGO: enrichment analysis for Gene Ontology R package version 2.12.0), and PubMed database to identify enriched Gene Ontology biological processes and over-represented biological pathways.

Bisulfite pyrosequencing

To validate DNA methylation data, bisulfite pyrosequencing was performed as previously described [38]. Primer sequences are available in [Supplementary materials & methods](#).

Gene expression microarrays

Hybridization of RNA samples to Affymetrix Human Genome U219 Array Plates was performed at the Functional Genomic Unit, Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS Genomic Unit, Barcelona, Spain) according to Affymetrix standard protocols. Data from Affymetrix CEL File were normalized and processed by the robust multichip averaged (RMA) algorithm using R statistical software and the Affymetrix library available through Bioconductor [39].

Standard deviation density plots were used to determine the cut-off value for gene expression analyses ([Supplementary Figure 2C](#)).

Correlation analysis

For the analysis of correlation between methylation and gene expression, Spearman's correlation coefficients were calculated considering all Affymetrix probe set expression values and DNA methylation levels of cytosines across the corresponding ± 10 Kbp gene length. To each correlation coefficient, an adjusted p-value was assigned using p.adjust function of the R software.

Infinium Human Methylation 450k BeadChip platform publicly available databases

See [Supplementary materials & methods](#).

Survival analysis

Overall survival (OS) and event-free survival (EFS) probabilities were estimated using Kaplan–Meier method and compared by means of the log-rank test. Data were analyzed with SPSS program (version 22.0, SPSS, Inc). Relapse, progression and death from disease were considered as events. All statistical tests were two-sided. The p-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Immunohistochemical analysis

See [Supplementary materials & methods](#) and [40].

Western blot analysis

See [Supplementary materials & methods](#) and [40].

Results

Epigenetic & transcriptional fingerprint of neuroblastoma

In order to generate a global view of the DNA methylation landscape of neuroblastoma, we investigated 35 primary neuroblastoma tumors, two ganglioneuromas, four normal tissue references (two adrenal gland and two fetal brain samples) ([Supplementary Table 1](#)) and four hESC lines (hESC1 to hESC4) [35] using the Infinium Human Methylation 450k (HM450K) BeadChip (Illumina, Inc.). After quality control analysis and data filtering, the methylation status of a total of 475,077 CpGs and 3091 non-CpGs was quantified in neuroblastoma, ganglioneuroma and normal tissue reference samples ([Supplementary Figure 1](#)). One sample (NB12) was excluded due to poor detection p-values.

Principal component analysis (PCA) and unsupervised hierarchical clustering of CpGs with variable methylation levels ($SD \geq 0.25$; 11,620 CpGs, 2.4%) revealed that the genome of neuroblastoma is

epigenetically distinct, largely hypomethylated but also with a fraction of CpGs that show hypermethylation as compared with reference samples and hESCs (Figures 1A & D). Using this unsupervised approach, the majority of neuroblastoma samples clustered according to established clinicobiological parameters with prognostic value, underscoring that DNA methylation patterns are associated with distinct subtypes of the disease.

A differential methylation analysis between tumor and normal reference samples (adrenal gland and fetal brain) revealed 45,891 differentially methylated (FDR < 0.05, δ - β -value with absolute difference of > 0.25) CpG sites (41,124 hypomethylated (89.6%) and 4767 hypermethylated CpGs [10.4%]), involving 10,881 genes (Figure 2 & Supplementary Table 2). Ganglioneuroma samples showed similar methylation levels to normal references in 93.2% of these CpGs (less than 0.25 β -value difference) thus underscoring the neuroblastoma-associated differential methylation (Figure 2A).

Further analyses showed that neuroblastoma-associated methylation changes affected all chromosomes, with hypomethylated regions being enriched in chromosome 6 ($p < 0.05$), whereas hypermethylated regions were more abundant in chromosomes 1 and 5 (Figure 2B).

DNA methylation changes in neuroblastoma not only affected promoters but also intragenic and intergenic regions (Figure 2C). Hypomethylation occurred mostly outside CpG islands (CGIs) and CGI shelves, whereas, hypermethylation was enriched in CGIs ($p < 0.001$) (Figure 2D). Moreover, hypomethylation was significantly associated ($p < 0.001$) with quiescent and polycomb repressed domains (Figure 2E). Hypermethylated CpGs were preferentially associated with genomic regions showing chromatin marks typical of bivalent chromatin domains, enhancers, promoters as well as polycomb repressed regions ($p < 0.001$) (Figure 2E).

In contrast to previous reports in cancer [17,19,41], we detected significant cytosine methylation changes in non-CpG context (mCHG and mCHH, where H = A, C or T) in neuroblastoma (Figure 1B & E). Consistent with recent reports in H1 and H9 stem cells, our hESC samples showed extensive non-CpG methylation levels [12] (Figure 1B & E). Although in neuroblastoma tumors, non-CpG methylation was not as extensive as in hESCs, we observed 14% (437 of 3091) of non-CpGs included in the HM450K array with variable methylation levels ($SD \geq 0.05$) (Supplementary Figure 3A; Figure 1E). Interestingly, non-CpG methylation was mostly associated with tumors characterized by favorable clinicobiological

features (patients < 18 months of age with localized *MYCN* nonamplified tumors). In contrast, non-CpG methylation in clinically unfavorable tumors (patients > 18 months of age, stage 4 or *MYCN* amplified tumors) was generally very low or absent (Figure 1E). Among reference samples, adrenal gland showed the highest non-CpG methylation levels, similar to a portion of tumors with favorable characteristics, being, however, lower than the mean of low-risk neuroblastomas. On the other hand, fetal cortex and ganglioneuroma samples showed lower methylation levels, similar to high-risk neuroblastomas (Figure 1B & E). Bisulfite pyrosequencing analysis of differentially methylated non-CpG sites performed using a set of samples included in the microarray, showed an excellent degree of correlation ($r^2 = 0.9$; $p < 0.001$) between microarray and pyrosequencing data of tumor and normal reference samples (Supplementary Figure 4), confirming thus the validity of our microarray findings.

To further investigate this epigenetic modification, we compared non-CpG methylation profiles of neuroblastoma with diverse human normal and cancer samples ($n = 1334$) using 12 publicly available datasets obtained using Infinium Human Methylation 450K BeadChip platform (see Supplementary materials & methods). We analyzed non-CpG sites showing methylation changes in neuroblastoma ($n = 437$). We observed the highest methylation levels for hESCs and mature neurons, confirming the data reported in previous articles [11–15]. Other normal tissues showed lower (glia, adult cerebellum, adrenal gland) to nearly absent (child cerebellum, cord blood, lung) non-CpG methylation, in agreement with previously published data. The mean of non-CpG methylation levels of all neuroblastoma tumors, regardless of clinical risk subgroups, showed higher non-CpG methylation levels than other tumors included in this analysis, albeit lower than normal tissues (Supplementary Figure 3B).

Similar to DNA methylation, microarray-based gene expression analysis revealed distinct expression profiles between neuroblastoma and reference samples ($SD \geq 1$, Figure 1C). We analyzed the association between DNA methylation and gene expression levels in 19 neuroblastoma tumors with available data from both array types. We identified a significant correlation in 1341 CpGs (FDR < 0.05) (Figure 1F), corresponding to 849 genes, and in 210 non-CpGs ($p < 0.05$) (Figure 1G) corresponding to 203 genes (Supplementary Table 3). Gene-centered density plots of cytosines with a significant correlation coefficient ($p < 0.05$) showed both positive and negative correlations in the gene body, and high levels of negative and positive correlations around the Transcription Start Site (TSS; Figure 1H & I, refers to

CpGs and non-CpGs, respectively).

Distinct DNA methylation levels of CpG & non-CpG regions between high & low clinical risk neuroblastoma

We analyzed differential DNA methylation patterns between neuroblastoma clinical risk subgroups (low-risk [$n = 18$] and high-risk tumors [$n = 16$]). In the CpG context, a pairwise comparison revealed distinct DNA methylation patterns that affected 2695 CpG sites. High-risk tumors were characterized by a widespread hypermethylation compared with low-risk tumors (2477 CpGs; 91.91%) (Supplementary Table 4). DNA methylation differences were distributed throughout the genome, with autosomal chromosomes 1, 2, 12, 14, 15, 16, 19 and 22 being significantly affected with respect to background ($p < 0.001$; Supplementary Figure 5A & Supplementary Table 4).

A comparison among neuroblastoma, reference samples and hESC methylation patterns revealed four sets of *de novo* methylation changes in neuroblastoma clinical groups (Figure 3A & Supplementary Table 4). Hypermethylation in high-risk tumors (418 CpGs from 186 genes) targeted mostly enhancer (17%), bivalent enhancers (42%) and polycomb repressed regions (22%; $p \leq 0.001$; Figure 3A & Supplementary Figure 5C–E). GO analysis revealed a significant ($p < 0.05$) enrichment for genes involved in differentiation, neuron development and biosynthetic process (i.e., *SOX10*, *TFAP2*, *NEUROG3*, *ONECUT2*, *ARID5A*, *LHX3*, *FOXH1*, among others) (Figure 3A & Supplementary Figure 5C–E & Supplementary Tables 4 & 5). Low-risk tumors showed a limited number of CpGs hypermethylated *de novo* (11 CpGs; ten genes). All these CpGs were located at promoter- and enhancer-related regions of genes including *LIN28B*, *CYTL1*, *ARHGAP22* and *INSM1*.

Instead, CpG hypomethylation identified in low-risk tumors (1029 CpG; 453 genes) targeted gene-body and intergenic regions mostly outside CGIs ($p < 0.05$; Supplementary Figure 5C & D). These DNA methylation changes were clearly enriched for heterochromatic/quiescent (47%) and weak repressed polycomb (23%) regions ($p < 0.05$). On the other hand, in high-risk tumors, *de novo* CpG hypomethylation was found to be more limited (87 CpG; 52 genes) and affected mostly regions of polycomb repressed (43%), together with enhancer (32%) regions ($p < 0.0001$) (Supplementary Figure 5C–E). In general, hypomethylation in low-risk tumors significantly ($p < 0.05$) affected genes related to development (i.e., *FOXPI*, *SOX13*, *RARRES3*) and in high-risk tumors genes related to regulation of gene expression and RNA

processing (i.e., *FUBPI*, *DOM3Z* and *NHP2*, and *POLR3H*; Supplementary Tables 4 & 5).

Next, we explored DNA methylation at non-CpG sites of high- and low-risk neuroblastoma tumors. Interestingly, we identified 118 methylated non-CpG-associated preferentially with the clinically more favorable tumors whereas high-risk tumors showed very low or absent non-CpG methylation (Figure 3B). Although the number of non-CpG sites probed by the methylation array was small, we identified non-CpG methylation throughout the genome and more prevalent at chromosome 2 ($p < 0.05$) (Supplementary Figure 5B). We analyzed the sequence surrounding non-CpG methylation (± 4 bp) to determine whether enrichment of particular nucleotide combinations was evident, as previously reported [12]. We observed that non-CpG methylation took place in CpApG (53%) and CpApC trinucleotides (37%), being only the latter enriched as compared with the background (37 vs 5%, $p < 0.001$) (Supplementary Figure 5H). Non-CpG methylation targeted preponderantly intragenic regions, exclusively at introns (18%), and intergenic regions (66%) associated with heterochromatic/quiescent domains and weak transcription chromatin marks (Supplementary Figure 5F & G). Notably, genes showing non-CpG methylation were significantly ($p < 0.05$) associated with development, cell differentiation and the Wnt receptor signaling pathway (Supplementary Table 5).

This epigenetic modification was further investigated by comparing non-CpG methylation profiles of neuroblastoma clinical risk subgroups (low- and high-risk tumors) with the DNA methylation datasets of diverse human normal and cancer samples ($n = 1334$) (see Supplementary Materials & methods). All non-CpG sites showing methylation changes in neuroblastoma ($n = 437$) as well as non-CpGs differentially methylated between neuroblastoma clinical risk subgroups ($n = 118$) were used for the analysis. The analysis using the 437 non-CpGs (data not shown) was comparable and provided equivalent results to the analysis performed with 118 non-CpGs (Figure 3C). hESCs and human adult neurons showed consistently high non-CpG methylation levels whereas minor non-CpG methylation was observed in all the tumor samples (including high-risk neuroblastoma), except for low-risk neuroblastoma. In fact, low-risk neuroblastoma showed mean methylation levels similar to normal adult tissues, specifically to adult cerebellum.

DNA methylation changes at CpG & non-CpG sites are associated with the clinical course of neuroblastoma

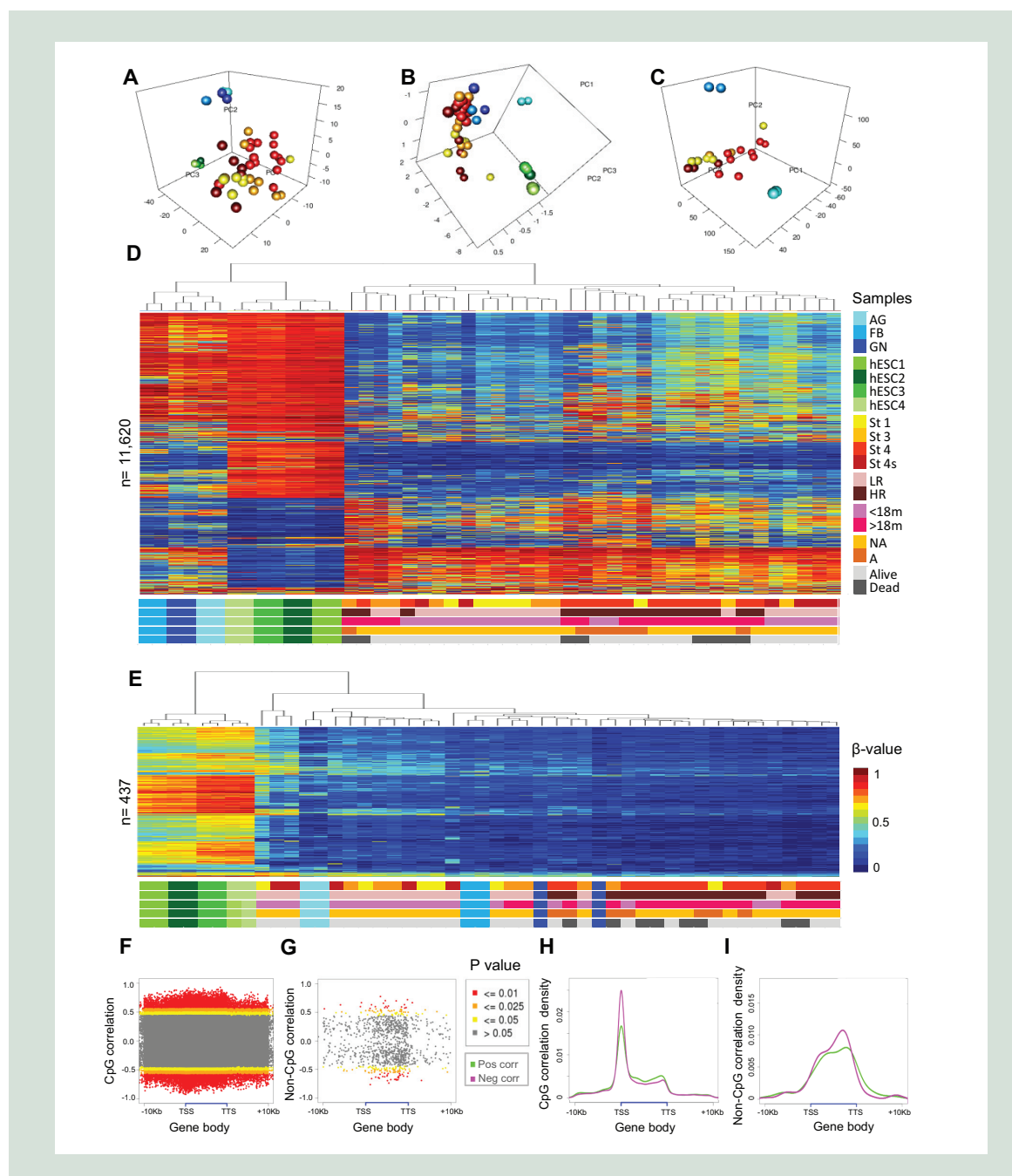


Figure 1. DNA methylation and gene expression analysis of the neuroblastoma samples included in the study. (A & B) PCA of (A) CpG ($SD \geq 0.25$) and (B) non-CpG ($SD \geq 0.05$) methylation data of neuroblastoma samples (classified according to INSS), reference samples and hESC cells. (C) PCA of gene expression data of neuroblastoma and reference samples ($SD \geq 1$). (D & E) Hierarchical cluster of (D) CpG ($SD \geq 0.25$) and (E) non-CpG ($SD \geq 0.05$) methylation levels in neuroblastoma, reference samples and hESC cells. (F & G) Correlation coefficients of gene expression and DNA methylation of single (F) CpGs and (G) non-CpGs relative to the gene-body length and 10 kb upstream and downstream regions. (H & I) Normalized density plots of significant correlation coefficients ($p \leq 0.05$) from data of panels H and I, respectively. <18m/>18m: Patients younger/older than 18 months at diagnosis; AG: Adrenal gland; Alive/dead: Survival patient status; ALL: Acute lymphoblastic leukemia; β -value: DNA methylation level (value); CLL: Chronic lymphocytic leukemia; FB: Fetal brain; GN: Ganglioneuroma; hESC: Human embryonic stem cell; HR: High-risk neuroblastoma; LR: Low-risk neuroblastoma; NA/A: *MYCN* status nonamplified/amplified; PCA: Principal component analysis; Pos/Neg corr: Positive/negative correlation between gene expression and DNA methylation; St: Stage according to the International Neuroblastoma Staging System;

Previous studies have shown that the simultaneous methylation of multiple CGIs, the CpG island methylator phenotype (CIMP), is associated with poor prognosis in neuroblastoma [21–23]. However, in neuroblastoma the CIMP is exemplified by the methylation state of the *PCDHB* gene family (32–34). Our study confirms that high-risk neuroblastomas have more CpG methylated sites (91%), a much higher extent of CGI methylation (93%) and more genes (90%) with significant CpG methylation than low-risk tumors. However, our genome-wide analysis showed that high-risk-associated methylation is extensive and targets CGIs at promoter and gene-body regions of a large number of genes ($n = 950$), but also affects cytosines at functional regions (pro-

moter and enhancer regions) outside CGIs and genes (Supplementary Table 4).

In order to identify DNA methylation changes associated with the clinical course of neuroblastoma, we selected CpG sites that exhibited increased methylation (>0.75) in most high-risk ($>80\%$) but not in low-risk tumors, and analyzed their association with neuroblastoma patient outcome. Seven CpGs fulfilled our criteria, five of these were associated with genes (*ANXA11*, *MAT1A*, *PIK3API*, *RLBP1* and *SNED1*) most of them (6/7) were located outside CGIs (Supplementary Table 6). Survival analysis showed that all seven CpGs were significantly associated with event-free (EFS; $p < 0.001$) and overall survival (OS; $p < 0.005$) (Figure 4, Supplementary Table 6).

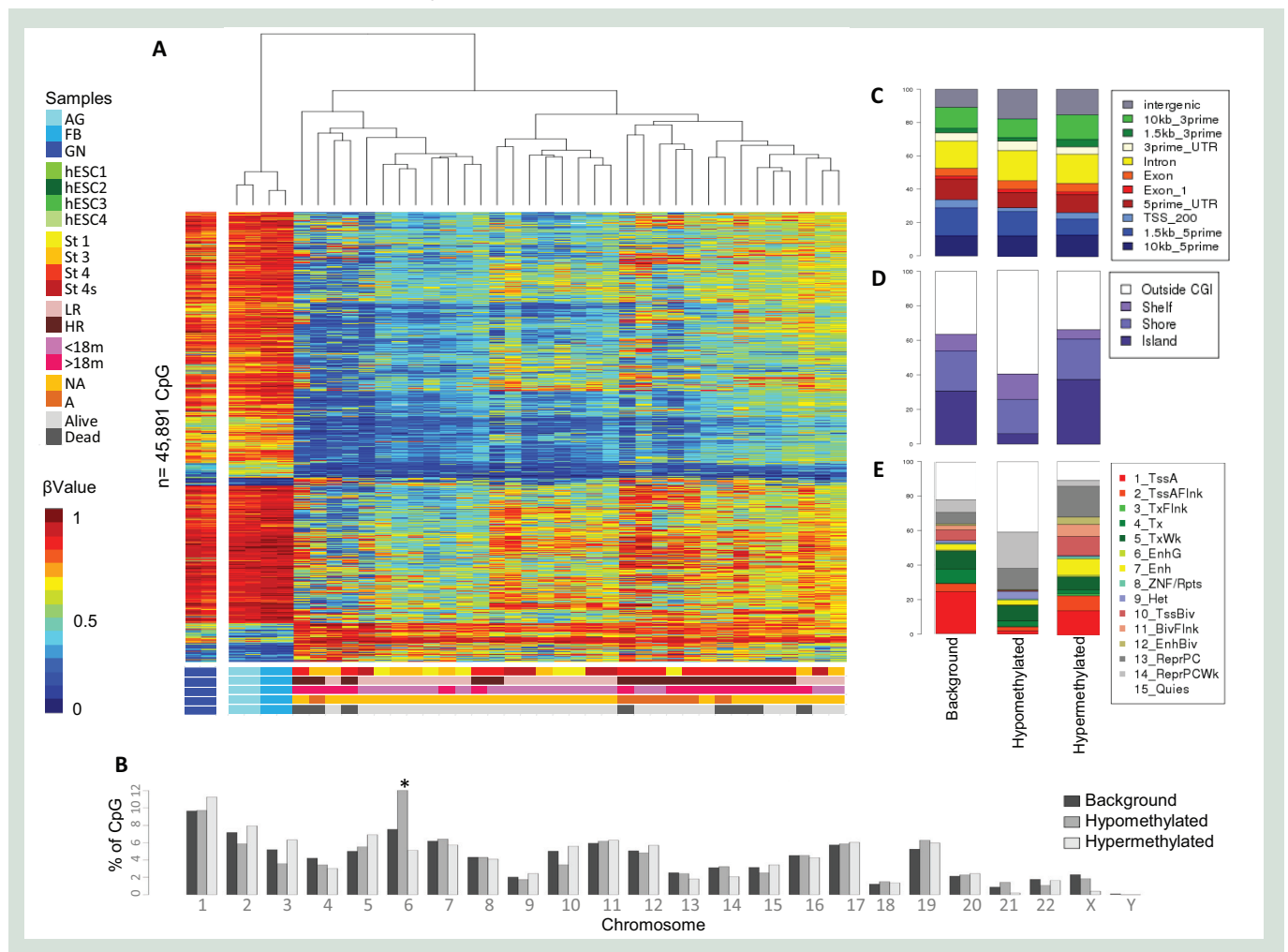


Figure 2. Differential DNA methylation between neuroblastoma and normal reference tissues. (A-left) Heatmap of hierarchical cluster analysis of CpG sites in NB with respect to reference samples. (A-right) Comparison of identified differentially methylated CpGs between NB and reference samples with GN methylation levels (B) Chromosomal distribution of differentially methylated CpG sites in neuroblastoma with respect to reference samples; (*) = $p < 0.05$, (C–E) Distribution of differentially methylated sites in (C) gene-related regions, (D) CpG island regions and (E) chromatin states. See Materials & methods section for genomic annotation, transcriptional and epigenomic characterization of CpG and non-CpG sites.

<18m/>18m: Patients younger/older than 18 months at diagnosis; AG: Adrenal gland; β -value: DNA methylation value; FB: Fetal brain; GN: Ganglioneuroma; HR: High-risk neuroblastoma; LR: Low-risk neuroblastoma; NA/A: *MYCN* status nonamplified/amplified.

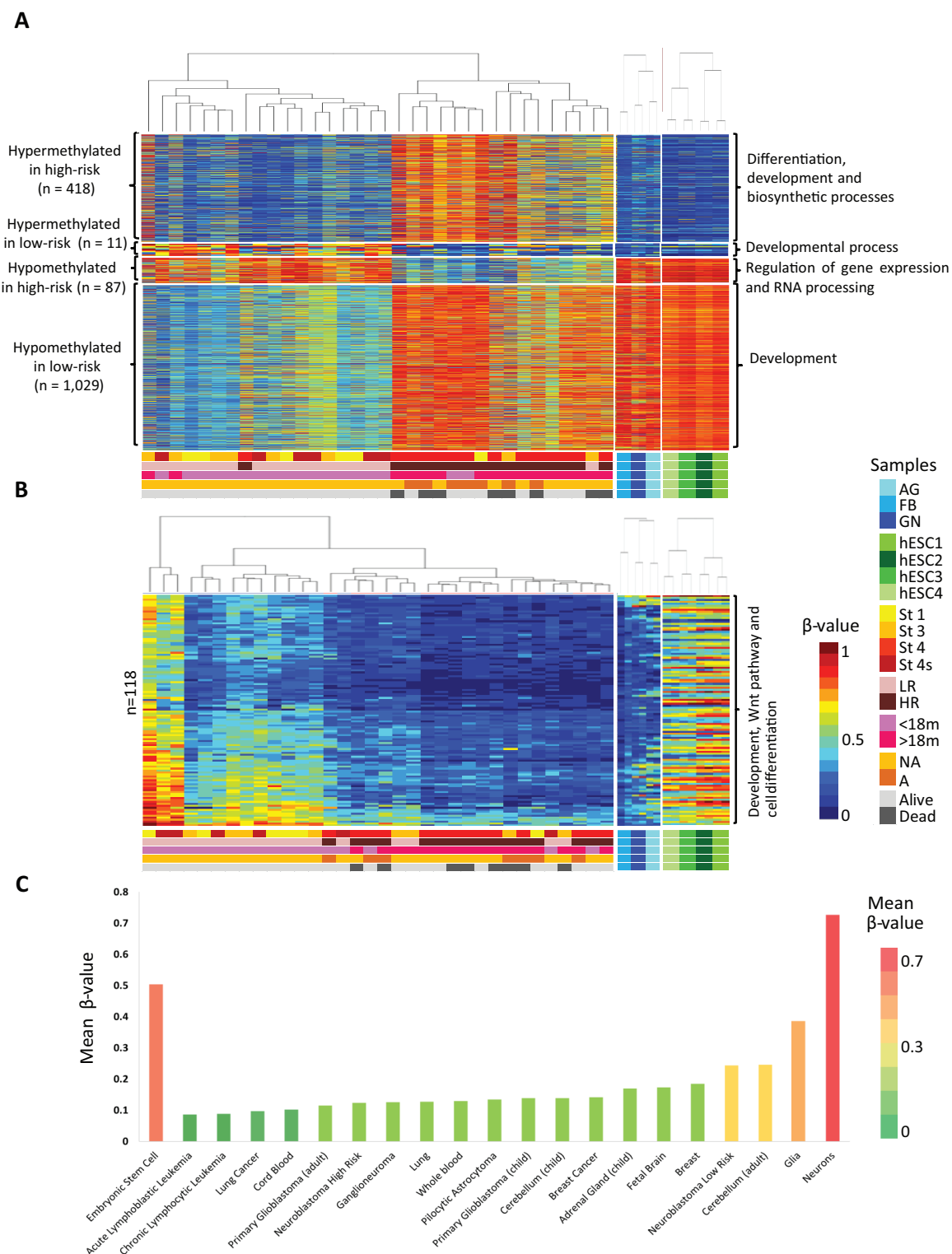


Figure 3. Distinct DNA methylation levels of CpG and non-CpG regions in neuroblastoma with different clinical courses. (A & B) Heatmap of hierarchical cluster analysis of (A) CpGs and (B) non-CpGs differentially methylated in high-risk with respect to low-risk

Figure 3. Distinct DNA methylation levels of CpG and non-CpG regions in neuroblastoma with different clinical courses (cont.). neuroblastoma. Comparing neuroblastoma, references samples and hESCs methylation patterns revealed four significant sets of *de novo* CpG methylation changes in neuroblastoma with different clinical behavior (panel A, left). Significantly enriched Gene Ontology terms related to genes acquiring *de novo* CpG and non-CpG methylation (A & B, right). (C) Mean methylation levels of non-CpG differentially methylated in high-risk with respect to low-risk neuroblastoma bar plot from normal and cancer tissues. Alive/dead: survival patient status; AG: Adrenal gland; ALL: Acute lymphoblastic leukemia; β -value: DNA methylation level (value); CLL: Chronic lymphocytic leukemia; FB: Fetal brain; GN: Ganglioneuroma; hESC: Human embryonic stem cell; HR: High-risk neuroblastoma; LR: Low-risk neuroblastoma; NA/A: *MYCN* status nonamplified/amplified; <18m/>18m: Patients younger/older than 18 months at diagnosis.

We performed similar survival analysis using clinical and biological parameters (INSS, *MYCN* status and patient's age at diagnosis) as well as differentially methylated CpGs associated with *PCDHB* genes and other genes with reported prognostic value in neuroblastoma [21–23]. INSS and age of patients performed similarly to CpGs identified in our study, being statistically significantly associated with both EFS ($p < 0.001$, for both) and OS ($p < 0.005$, for both; Figure 4 & Supplementary Figure 6). A large proportion of the *PCDHB* cluster showed higher methylation levels in high-risk tumors (mostly at CGI regions located at exon 1 of genes), although not reaching statistical significance in most cases. According to our cut-off-values for methylation analyses, *PCDHB3* and *PCDHB7* genes were significantly differentially methylated between tumors with diverse clinical risk (Supplementary Tables 4 & 6). Specifically, *PCDHB7* gene methylation targeting CpGs outside CGI region at exon 1 showed a significant ($p < 0.05$) association with overall survival in our cohort of neuroblastoma.

Next, we examined non-CpG sites that exhibited methylation (above mean non-CpG methylation levels) in most low-risk neuroblastoma (>80%) but not in high-risk tumors. We identified ten non-CpGs, five of these were associated with genes (*TLE3*, *ALK*, *PTPLAD1*, *CACUL1* and *PRKAG2*). Survival analysis showed that all these non-CpGs were significantly associated with EFS ($p \leq 0.05$) and OS ($p \leq 0.05$) (Figure 4). Interestingly, non-CpGs located outside genes were more strongly associated with the clinical outcome of neuroblastoma patients (EFS $p \leq 0.001$ and OS $p < 0.005$), similar to INSS, age of patients and the CpG sites analyzed (Figure 4 & Supplementary Table 6).

These observations suggest that DNA methylation changes at CpG and non-CpG sites both inside and outside CGIs and gene-bodies are associated with neuroblastoma clinical behavior.

DNA methylation variations target genes mutated or recurrently altered in neuroblastoma

Previous reports have suggested that genetic and epigenetic alterations in cancer may affect

the same genes and pathways [9,42]. We explored whether genes with recurrent genetic alterations in neuroblastoma acquired aberrant DNA methylation patterns (Supplementary Table 7) [4–7,24,43]. The gene set of interest includes, to the best of our knowledge, genes reported to be mutated or with recurrent genetic alterations in neuroblastoma (Supplementary Table 7) [4–7,24,43]. Genes with reported differential expression but with no reported genetic alterations have not been included in the analysis. We identified differentially methylated CpGs between neuroblastoma and reference samples in a significant portion of the genes with reported genetic alterations (21 out of 28; $p < 0.05$; Supplementary Table 7). DNA methylation changes in these genes occurred less frequently at promoters and CGIs and targeted greatly gene-body regions (Intron 52%; Supplementary Tables 2, 4 & 7). All these genes showed loss of methylation in the gene body. Aberrant hypermethylation was detected in six genes and also targeted mainly gene-body CpGs. The most extensive CpG methylation changes were observed for *CCND1*, *ALK* and *DLC1*. In the case of *DLC1*, as no correlation between DNA methylation and gene expression was observed, this gene was not further explored.

The *CCND1* gene showed extensive loss of CpG methylation (23 CpGs) in gene-body and 3'-UTR regions in the absence of alterations in the promoter region in all neuroblastoma tumors (Figure 5A & Supplementary Table 2). A large proportion of the differentially methylated CpGs targeting *CCND1* (12/23) showed a significant ($p < 0.05$) correlation, mostly negative, with gene expression in neuroblastoma (Figure 5B). Differential expression between neuroblastoma and references samples is reported in Figure 5D. We found that these CpGs were enriched for binding sites with a high degree of affinity for the POLR2A (Supplementary Table 8). The altered methylation pattern of *CCND1* was not related to the presence of gene amplification or mutation (Supplementary Table 1). Based on recent findings suggesting a close relationship between enhancer methylation upstream (CpG-TSS distance <100 kb) of *CCND1* and its expression in breast cancer [44], we

explored methylation of CpG sites in this distal region in neuroblastoma. We identified 14 differentially methylated (both hyper- and hypomethylated) CpGs located 160–190 kb upstream of the TSS of *CCND1*, which contained several potential enhancer regions that correlated (mostly positive correlation) with gene expression (Figure 5C). These enhancer-related CpG sites were enriched for binding sites of diverse transcription factors, among these BHLHE40, FOXA1, GATA3 and MAX, reported to have high affinity for these binding sites (Supplementary Table 8).

The *ALK* gene showed gene-body DNA methylation changes at both CpG and non-CpG sites. The promoter region was devoid of methylation both in tumors and reference samples (Figure 6A & Supplementary Table 4). Loss of methylation at CpG sites was preponderant in all neu-

roblastoma samples and did not have a significant impact on *ALK* expression levels. These regions were enriched for binding sites of transcription factors such as REST and CTCF (Supplementary Table 9).

Interestingly, differential methylation between high- and low-risk neuroblastoma was identified at non-CpG sites of the *ALK* gene. These intragenic non-CpG sites were located in introns and showed a significant inverse correlation ($p < 0.05$) with gene expression (Figure 6B & Supplementary Table 4). Notably, high-risk tumors lacked non-CpG methylation and showed higher *ALK* expression levels, whereas, clinically favorable neuroblastomas displayed non-CpG methylation associated with lower expression levels (Figure 6C & D). Among neuroblastoma samples, we identified one case with *ALK* mutation (NB13: c3520T>C, p.F1174L) and one with gene amplification (NB7), both samples

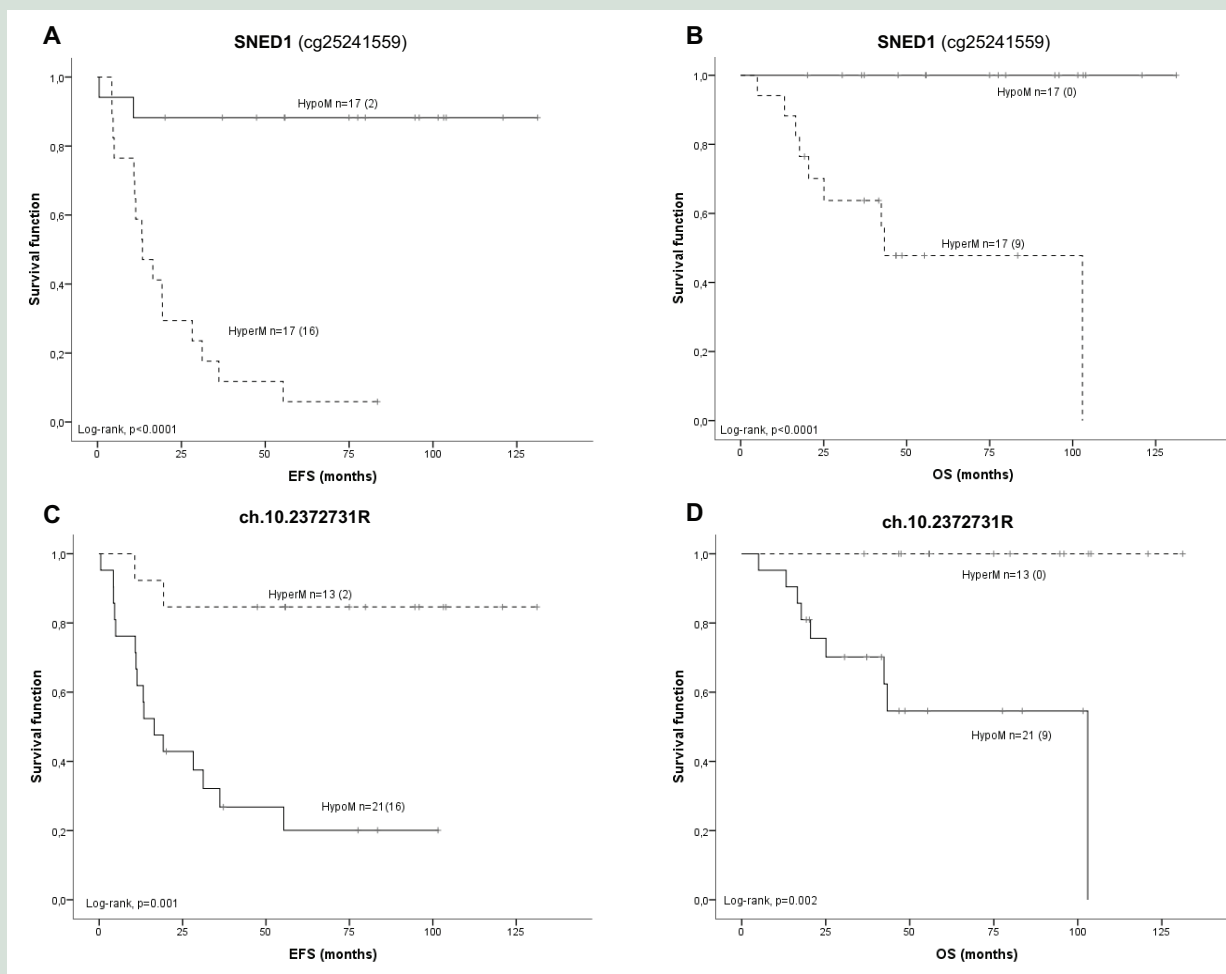


Figure 4. Kaplan–Meier survival curves and log-rank analysis. Kaplan–Meier survival curves and log-rank analysis using exemplary CpG and non-CpG sites found to be significantly differentially methylated between high- and low-risk neuroblastoma cases. (A & B) CpG (cg25241559) (A) EFS HypoM 0.88 ± 0.07 vs HyperM 0.05 ± 0.057 ; $p < 0.0001$; (B) OS HypoM 1.0 vs HyperM 0.47 ± 0.13 ; $p < 0.0001$. (C & D) Non-CpG (ch.10.2372731R) (C) EFS HypoM 0.20 ± 0.09 vs HyperM 0.84 ± 0.10 ; $p = 0.001$; (D) OS HypoM 0.54 ± 0.12 vs HyperM 1.0; $p = 0.002$. EFS: Event-free survival; OS: Overall survival.

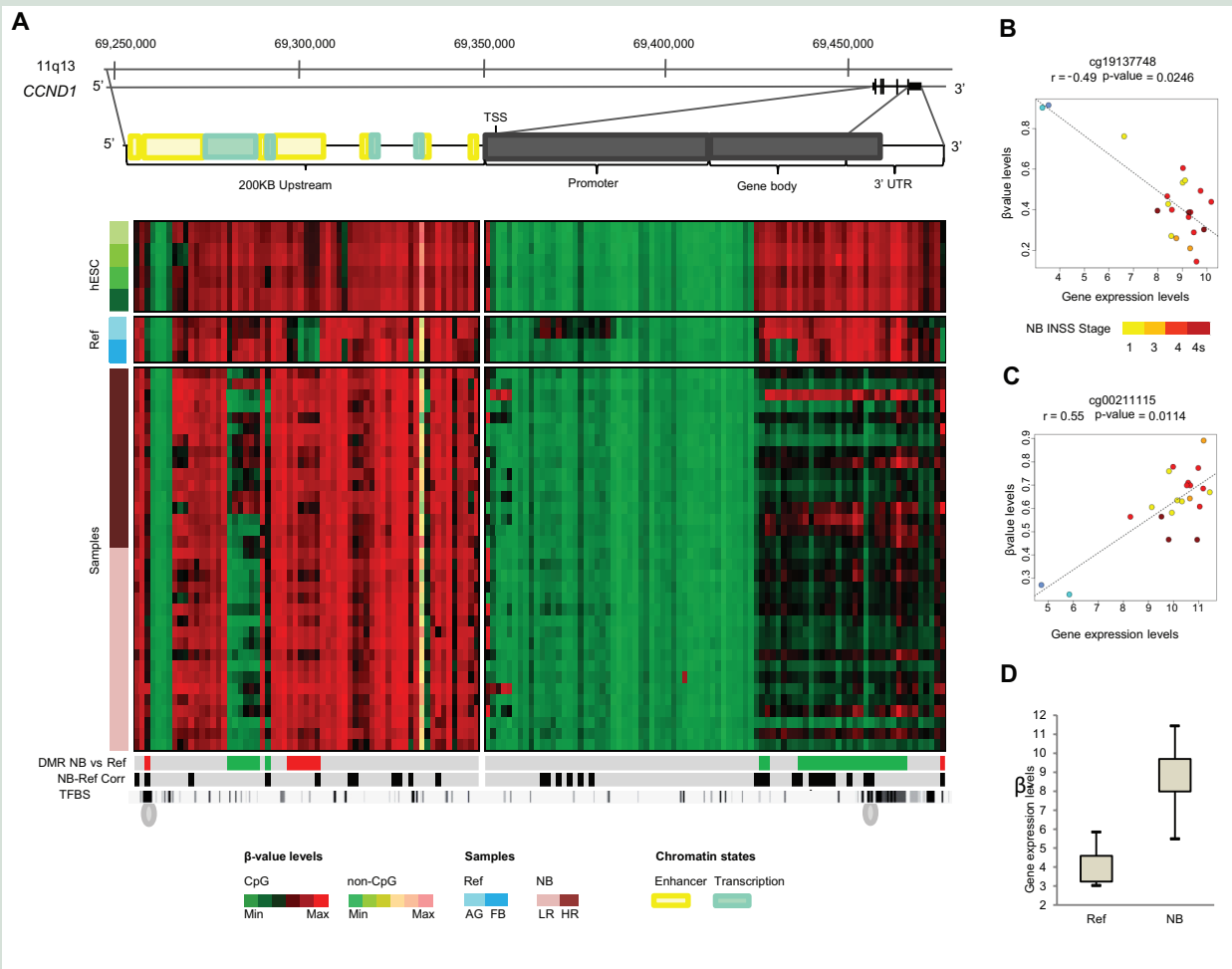


Figure 5. CCND1 gene methylation and expression analysis. (A) DNA methylation landscape of CpGs and non-CpGs associated with the *CCND1* gene. From top to bottom, we provide the following information: location and structure of the gene, chromatin and transcriptional domains, heatmap with DNA methylation levels, presence of hypomethylated (green) or hypermethylated (red) regions, presence of significant correlation between DNA methylation and gene expression levels (black) and TFBS density [37]. (B) Scatterplot with linear trend line of CpG (cg19137748) at *CCND1* gene-body representing a negative correlation with gene expression. (C) Scatterplot with linear trend line of CpG (cg00211115) located 200 KB upstream of *CCND1* TSS representing a positive correlation with gene expression. (D) Differential gene expression levels between neuroblastoma and reference samples. AG: Adrenal gland; β-value levels: DNA methylation level (value); FB: Fetal brain; hESC: Human embryonic stem cell; NB INSS Stage: Stage according to the International Neuroblastoma Staging System.

were high-risk tumors with unmethylated non-CpGs and high expression of *ALK* (Supplementary Table 1).

Recent studies have reported that non-CpG methylation is established *de novo* during neuronal differentiation [11,45]. In neuroblastoma, high-risk tumors which are mainly composed by undifferentiated or poorly differentiated neuroblasts, occasionally exhibit an increase in histologic differentiation in response to chemotherapy. We analyzed non-CpG methylation levels by bisulfite pyrosequencing of seven high-risk tumors with available matched pairs of tumor specimens obtained at diagnosis and at conclusion of the induction chemotherapy (Supplementary Table 1). All postchemotherapy tumor samples exhibited an

increase (range 4–23% of methylation increase) of non-CpG methylation levels as compared with the matched diagnosis tumor sample. These methylation changes were associated with a decrease of *ALK* gene expression and discrete signs of therapy-related differentiation as revealed by the increase of neuronal cell differentiation markers (*NEFL* and *TUBB3*) and morphological changes of neuroblastic cells (increased cytoplasm and/or ganglion-like morphology) (Figure 6E & F; Supplementary Figure 7). Post-treatment tumors with neuroblastic undifferentiated areas interspersed with differentiating foci or ganglionar-like cells showed changes in expression patterns of *ALK* protein, being immunohistochemical stain-

ing lowest in the more differentiated ganglionic cells (Figure 6G & H).

Altogether, these observations suggest that non-CpG methylation is modulated during neuroblastoma differentiation and these changes may be associated with *ALK* gene expression changes.

Discussion

Historically, DNA methylation changes in cancer have been described in CGIs and promoter regions [46]. Recent

genome-wide studies are starting to reveal a role for DNA methylation outside such genomic contexts [12,41,47–48]. However, the great majority of studies that have investigated DNA methylation in neuroblastoma were focused significantly on the analysis of CpG islands and promoter regions of genes with potential prognostic relevance [20–29]. Such studies have rarely provided insights into DNA methylation changes outside these well-described sites. Our study shows that in neuroblastoma, a developmental cancer, DNA methylation changes frequently affect

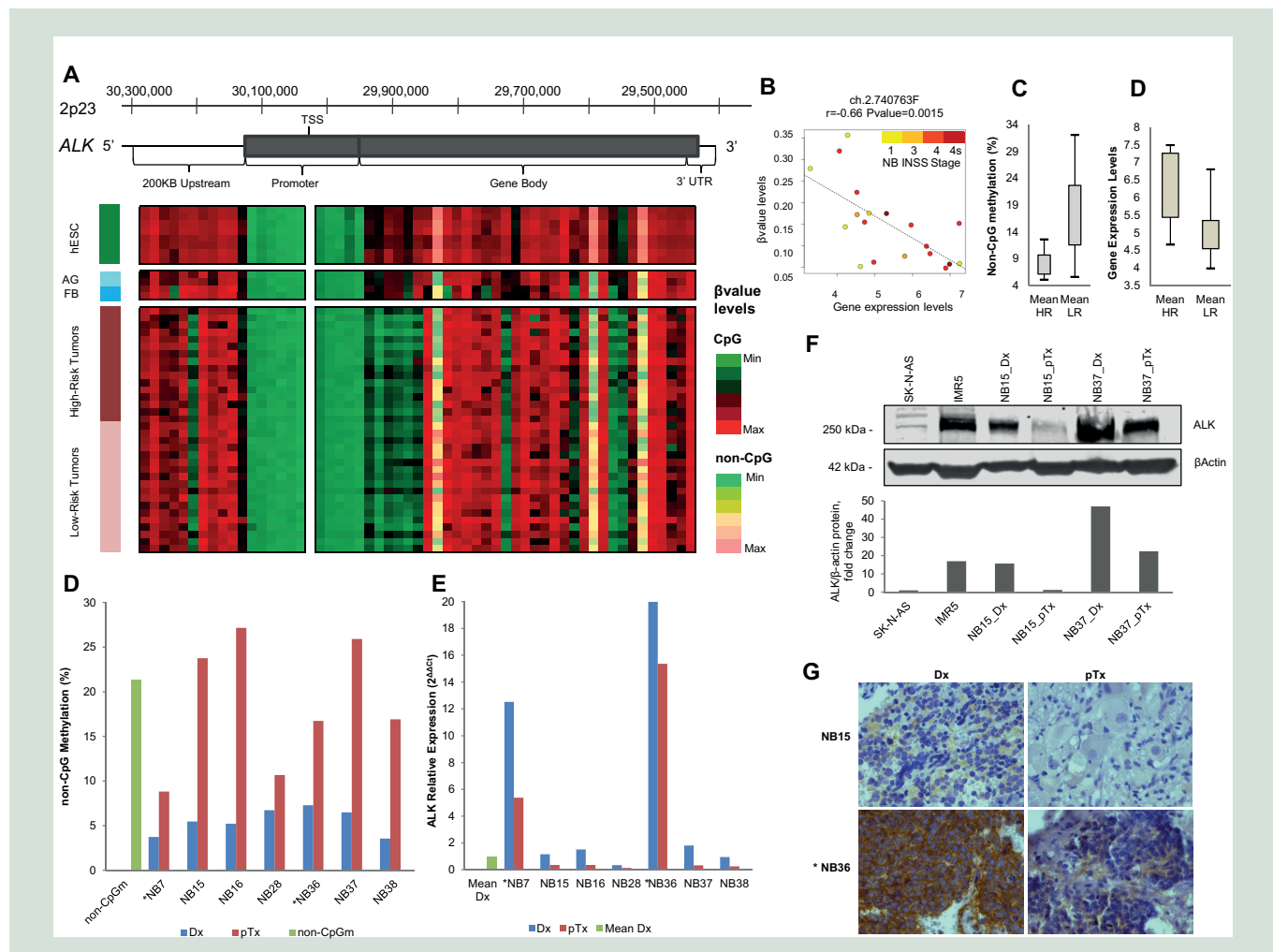


Figure 6. *ALK* gene methylation and expression analysis. (A) DNA methylation landscape of CpGs and non-CpGs in the *ALK* gene. From top to bottom: location and structure of the gene and heatmap with DNA methylation levels. (B) Scatterplot with linear trend line of non-CpG (ch.2.740763F) at *ALK* gene-body representing a negative correlation with gene expression. (C & D) *ALK* non-CpG methylation (C) and expression (D) differences between high- and low-risk neuroblastomas. (E) *ALK* non-CpG methylation levels at the moment of diagnosis and following chemotherapy. non-CpGm: reference levels of methylated tumors. (F) *ALK* therapy-induced gene expression changes. Mean Dx: mean expression levels of *ALK* non-amplified neuroblastomas. (G) Protein changes in two exemplary cases at diagnosis and following chemotherapy as compared with neuroblastoma cell lines with low (SK-N-AS) and high *ALK* protein levels (IMR5). (H) Immunohistochemical staining of *ALK* amplified and nonamplified neuroblastoma tumors at diagnosis and after chemotherapy. Neuroblastoma cells with morphological differentiation features show lowest protein staining levels. β -value levels: DNA methylation level (value); Dx: Sample obtained at diagnosis; hESC: Human embryonic stem cell; HR: High-risk neuroblastoma; LR: Low-risk neuroblastoma; NB INSS Stage: Stage according to the International Neuroblastoma Staging System; pTx: Sample obtained at conclusion of chemotherapy; Ref: Reference samples: Adrenal gland (AG) and fetal brain (FB); (*): *ALK* amplified neuroblastoma.

intragenic and intergenic regions. These changes in part affect apparently nonfunctional domains such as heterochromatin and in part regions involved in gene regulation such as enhancers, further supporting an important role for nonpromoter methylation [18,48]. However, poised promoters or polycomb repressed regions were also found to be recurrently affected by methylation changes, suggesting thus a tight control of developmental gene expression and subsequently of differentiation pathways in neuroblastoma.

One of the most relevant findings of our study is the presence of DNA methylation at non-CpG sites in neuroblastoma. Recent studies have reported the presence of non-CpG methylation in human embryonic stem cells (hESCs) and in ectoderm-derived tissues (cerebellum, brain cortex and olfactory bulb), the latter suggesting a cell-type specific epigenetic mark [11,13–15,45]. In these studies, non-CpG methylation levels were found to be negligible in fetal cortex, suggesting that the non-CpG methylation detected in ESCs is largely lost upon cell differentiation and that reconfiguration occurs during fetal to young adult neuron development [14,49]. In neurons, non-CpG methylation is well conserved and accumulates to become the main form of methylation in the human neuron genome [11,14,49]. However, the biological importance of this epigenetic phenomenon is still unclear and a matter of discussion.

Consistent with previous reports, we observed extensive non-CpG methylation in hESCs and very low levels in the fetal brain samples. In neuroblastoma, we observed non-CpG methylation mostly in the clinically more favorable neuroblastoma tumors, where it was greatly associated with genes related to cell differentiation and embryonic development. Interestingly, among genes targeted by non-CpG methylation we identified the *ALK* gene. *ALK* is predominantly expressed in the developing nervous system and its expression declines after birth [50]. Recently, *ALK* has been identified as a gene upregulated in unfavorable neuroblastoma, suggesting an oncogenic role for *ALK* in neuroblastoma pathogenesis [6,32,50–53]. Although *ALK* point mutations are one of the most critical alterations in hereditary neuroblastoma, activating mutations and gene amplification have been reported for a limited number of sporadic neuroblastoma tumors (3–11% and 3–4%, respectively) [6,52,54]. Hence, the mechanism whereby *ALK* is upregulated in clinically unfavorable neuroblastomas has not been completely elucidated. We found *ALK* non-CpG methylation to be associated with clinically favorable tumors and low expression levels, but absent in clinically unfavorable. Interestingly, high-risk tumors restored non-CpG methylation following chemotherapy. Therapy-

induced neural differentiation has been described in high-risk, poorly differentiated, neuroblastoma tumors and is characterized by rosette formation, ganglionic cells and the formation of neuropil. We observed how non-CpG methylation in post-treatment high-risk tumors was associated with a decrease in *ALK* expression and discrete therapy-induced differentiation, as revealed by the morphological changes and the expression of neuronal cell-specific differentiation markers. Thus, the detected increase of cytosine methylation outside CpG dinucleotides provides support for a potential role of this methylation event in the differentiation process of neuroblastic cells and the transcriptional regulation of developmental genes such as *ALK*. These associations require further investigation to establish the precise role of non-CpG methylation in the pathogenesis of neuroblastoma.

These results also reveal DNA methylation changes potentially induced by chemotherapy. This raises the point, however, that diagnostic and postchemotherapy neuroblastoma may be epigenetically different. Moreover, postchemotherapy DNA methylation changes may target genes with recurrent genetic alterations in neuroblastoma, and may thus affect the same genes and pathways. These findings highlight an important aspect associated with the clinical evolution of high-risk neuroblastoma and warrant a genome-wide analysis of epigenetic changes that may affect the DNA methylome of this pediatric tumor as a result of chemotherapy.

Previous reports have suggested that genetic and epigenetic alterations may target similar genes and pathways in cancer [42,55]. We observed DNA methylation changes in a significant portion ($p < 0.005$) of genes previously described mutated or with recurrent genetic alterations in neuroblastoma [4–7,24]. Overall, these genes showed a preponderant CpG loss of methylation that greatly targeted gene-body regions outside CGIs. *CCND1* was among genes with extensive CpG methylation changes, which targeted gene-body and 3'-UTR regions of the gene. Notably, *CCND1* promoter region was devoid of DNA methylation both in neuroblastoma as in all reference tissues. These results confirm and extend our previous findings, and suggest that overexpression of *CCND1* in neuroblastoma tumors is not associated with methylation abnormalities of the promoter region [38]. *CCND1* is highly expressed in various types of solid tumors and in almost all neuroblastoma tumors [56]. The cause of *CCND1* overexpression is greatly unknown. We identified expression-related methylation sites at CpGs located upstream (160–190kb) to the TSS of the *CCND1* gene, which were at regions enriched for potential regulatory elements (i.e., enhancers). At

these distal regulatory elements, we observed enrichment for binding sites of TFs recently reported to be involved in the transcriptional regulation of *CCND1* such as BHLHE40 (DEC-1) and GATA3 (negative and positive regulation, respectively) [56,57]. Recent studies in breast cancer provide experimental evidence for the presence in this distal region of functional enhancers of the *CCND1* gene. Moreover, these studies revealed a relationship between DNA methylation variations of these enhancers and *CCND1* expression [44,58]. We can thus speculate a similar mechanistic link between DNA methylation levels of distal upstream regions enriched for enhancers and *CCND1* expression in neuroblastoma.

CpG aberrant methylation has been considered a promising predictive marker in cancer. The simultaneous methylation of multiple CGIs, CpG island methylator phenotype (CIMP), has showed a strong predictive power in many cancers, including in neuroblastoma [21–23,59]. Consistent with these studies, our findings confirm a high extent of CGI methylation targeting CGIs at promoter regions in clinically unfavorable neuroblastoma tumors. In neuroblastoma, the CIMP is exemplified by the methylation state of the *PCDHB* gene cluster [21–23,59]. Consistent with previous reports, high-risk tumors in our cohort showed higher, though in most cases not statistically significant, CpG methylation levels at CpG islands of the genes [21–23,59]. However, we observed a significant ($p < 0.05$) association between methylation changes at nonpromoter CpG sites located outside CGIs of the *PCDHB7* gene and overall survival of neuroblastoma patients included in our study. Our study revealed extensive, genome-wide nonpromoter methylation changes at CpG CGIs and non-CpG sites both inside and outside CGIs and gene-body regions significantly associated with neuroblastoma clinical behavior. These findings support the rationale for further evaluation of these epigenetic changes as a novel source for novel epigenetic markers for this developmental tumor. It is worth mentioning that non-CpG methylation is asymmetrical, thus methylation variations affecting non-CpGs are small, sometimes subtle. For this reason, the identified differentially methylated CpG sites could represent a more robust source of new epigenetic biomarkers for neuroblastoma. However, our conclusions are based on a small cohort of patients and therefore warrant further investigation and validation in larger independent cohorts of neuroblastoma patients.

Conclusion

This is, to the best of our knowledge, the first DNA methylation study in neuroblastoma that uses high-density microarrays to define the epigenetic

landscape of this pediatric tumor and its potential clinicopathological impact. Our results reveal that nonpromoter methylation at both CpG and non-CpG sites may have functional and clinical implications in the pathogenesis of this pediatric tumor. Interestingly, the presence of non-CpG methylation has not been previously described in neuroblastoma and seems to be associated with the differentiation status of the neoplastic cells and the expression of some key genes such as *ALK*. This study provides new insights into the pathogenesis and clinical behavior of this pediatric tumor and provides a rationale for further evaluation of the identified epigenetic modifications as a source for novel biomarkers and therapeutic targets for this, and potentially, other developmental tumors.

Data deposition

Methylation and expression microarray data have been deposited at NCBI Gene Expression Omnibus data repository (GEO [60]) with Accession number GSE54719 and GSE54720, respectively; on Superseries record GSE54721.

Links to deposited data

Superseries record [61], methylation microarray data [62] expression microarray data [63].

Acknowledgements

Authors acknowledge G Garcia-Castellví for fundraising and the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the National Network Biobanks of ISCIII for tissue samples. Authors thank LC Laurent for her assistance in obtaining methylation data from hESCs, J Ríos for statistical advice and S Sánchez Molina for precious technical support.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by the NEN association (Association of Families and Friends of Patients with Neuroblastoma) (to S Gómez), Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain (BR201102 to G Mayol) and Spanish Government (Instituto de Salud Carlos III grant to C Lavarino and Ramon y Cajal Grant to JI Martín-Subero). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

This study was approved by the Institutional Review Boards. Informed consent was obtained.

Executive summary

- This is the first comprehensive DNA methylation study in neuroblastoma using high-density microarrays.
- Our findings revealed that DNA methylation in neuroblastoma affects not only promoters but also intragenic and intergenic regions at both CpG and non-CpG sites.
- Nonpromoter methylation changes targeted functional chromatin domains of development and cancer-related genes.
- Tumors with diverse clinical-risk showed differences affecting CpG and, remarkably, non-CpG sites.
- These epigenetic changes may have functional and clinical implications in the pathogenesis of this pediatric tumor.
- Non-CpG methylation is present in clinically favorable neuroblastoma tumors.
- Non-CpG methylation seems to be associated with the differentiation status of the neoplastic cells and the expression of some key genes such as *ALK*.
- High-risk tumors increased methylation at non-CpGs and decreased *ALK* expression following chemotherapy.
- This study provides a source for novel epigenetic markers and therapeutic targets for this, and potentially, other developmental tumors.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- 1 Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 369(9579), 2106–2120 (2007).
- 2 Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer*. 3(3), 203–216 (2003).
- 3 Cohn SL, Pearson AD, London WB *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J. Clin. Oncol.* 27(2), 289–297 (2009).
- 4 Cheung NK, Zhang J, Lu C *et al.* Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* 307(10), 1062–1071 (2012).
- 5 Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA *et al.* Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* 483(7391), 589–593 (2012).
- 6 Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF *et al.* The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat. Genet.* 45(3), 279–284 (2013).
- 7 Sausen M, Leary RJ, Jones S *et al.* Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat. Genet.* 45(1), 12–17 (2013).
- 8 Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 14(3), 204–220 (2013).
- 9 Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer*. 11(10), 726–734 (2011).
- 10 Dyachenko OV, Schevchuk TV, Kretzner L, Buryanov YI, Smith SS. Human non-CG methylation: are human stem cells plant-like? *Epigenetics* 5(7), 569–572 (2010).
- 11 Lister R, Mukamel EA, Nery JR *et al.* Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341(6146), 1237905 (2013).
- 12 Lister R, Pelizzola M, Dowen RH *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462(7271), 315–322 (2009).
- 13 Lister R, Pelizzola M, Kida YS *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336), 68–73 (2011).
- 14 Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(10), 5237–5242 (2000).
- 15 Hon GC, Rajagopal N, Shen Y *et al.* Epigenetic memory at embryonic enhancers identified in DNA methylation maps from adult mouse tissues. *Nat. Genet.* 45(10), 1198–1206 (2013).
- 16 Kreck B, Richter J, Ammerpohl O *et al.* Base-pair resolution DNA methylome of the EBV-positive Endemic Burkitt lymphoma cell line DAUDI determined by SOLiD bisulfite-sequencing. *Leukemia* 27(8), 1751–1753 (2013).
- 17 Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF *et al.* Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat. Genet.* 44(1), 40–46 (2012).
- 18 Kulis M, Queiros AC, Beekman R, Martin-Subero JJ. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1829(11), 1161–1174 (2013).
- 19 Truong M, Yang B, Wagner J, Desotelle J, Jarrard DF. Analysis of promoter non-CG methylation in prostate cancer. *Epigenomics* 5(1), 65–71 (2013).
- 20 Yang Q, Kiernan CM, Tian Y *et al.* Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin. Cancer. Res.* 13(11), 3191–3197 (2007).
- 21 Abe M, Westermann F, Nakagawara A, Takato T, Schwab M, Ushijima T. Marked and independent prognostic

- significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer. Lett.* 247(2), 253–258 (2007).
- 22 Banelli B, Brigati C, Di Vinci A *et al.* A pyrosequencing assay for the quantitative methylation analysis of the PCDHB gene cluster, the major factor in neuroblastoma methylator phenotype. *Lab. Invest.* 92(3), 458–465 (2012).
- 23 Asada K, Watanabe N, Nakamura Y *et al.* Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. *Japanese J. Clin. Oncol.* 43(6), 641–645 (2013).
- **The CpG island methylator phenotype prognostic power in neuroblastoma.**
- 24 Koyama H, Zhuang T, Light JE *et al.* Mechanisms of CHD5 Inactivation in neuroblastomas. *Clin. Cancer. Res.* 18(6), 1588–1597 (2012).
- 25 Hoebeck J, Michels E, Pattyn F *et al.* Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer. Lett.* 273(2), 336–346 (2009).
- 26 Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer. Lett.* 348(1–2), 167–176 (2014).
- 27 Teitz T, Wei T, Valentine MB *et al.* Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat. Med.* 6(5), 529–535 (2000).
- 28 Yanez Y, Grau E, Rodriguez-Cortez VC *et al.* Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma. *Clin. Epigenetics* 7(1), 16 (2015).
- 29 Dreidax D, Bannert S, Henrich KO *et al.* p19-INK4d inhibits neuroblastoma cell growth, induces differentiation and is hypermethylated and downregulated in MYCN-amplified neuroblastomas. *Hum. Mol. Genet.* 23(25), 6826–6837 (2014).
- 30 Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol.* 11(8), 1466–1477 (1993).
- 31 Lavarino C, Garcia I, Mackintosh C *et al.* Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status. *BMC Med. Genomics* 1, 36 (2008).
- 32 Bagci O, Tumer S, Olgun N, Altungoz O. Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors. *Cancer Lett.* 317(1), 72–77 (2012).
- 33 Garcia I, Mayol G, Rios J *et al.* A three-gene expression signature model for risk stratification of patients with neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 18(7), 2012–2023 (2012).
- 34 Bibikova M, Barnes B, Tsan C *et al.* High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 98(4), 288–295 (2011).
- 35 Nazor KL, Altun G, Lynch C *et al.* Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell* 10(5), 620–634 (2012).
- 36 Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS *et al.* The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 12(6), 996–1006 (2002).
- 37 Roadmap Epigenomics C, Kundaje A, Meuleman W *et al.* Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518(7539), 317–330 (2015).
- **Analysis of regulatory elements in genomes of human tissues and cells – embryonic and adult, diseased and healthy.**
- 38 Mayol G, Martin-Subero JI, Rios J *et al.* DNA hypomethylation affects cancer-related biological functions and genes relevant in neuroblastoma pathogenesis. *PLoS ONE* 7(11), e48401 (2012).
- 39 Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. *affy*--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20(3), 307–315 (2004).
- 40 Garcia I, Mayol G, Rodriguez E *et al.* Expression of the neuron-specific protein CHD5 is an independent marker of outcome in neuroblastoma. *Mol. Cancer* 9, 277 (2010).
- 41 Kulis M, Heath S, Bibikova M *et al.* Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 44(11), 1236–1242 (2012).
- 42 Chan TA, Glockner S, Yi JM *et al.* Convergence of mutation and epigenetic alterations identifies common genes in cancer that predict for poor prognosis. *PLoS. Med.* 5(5), e114 (2008).
- 43 Okawa ER, Gotoh T, Manne J *et al.* Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene* 27(6), 803–810 (2008).
- 44 Aran D, Hellman A. DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. *Cell* 154(1), 11–13 (2013).
- **Expression-correlated methylation in distal sites in the CCND1 breast cancer risk locus.**
- 45 Guo JU, Su Y, Shin JH *et al.* Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 17(2), 215–222 (2014).
- **Provides insights for understanding the role of non-CpG methylation changes during neuronal maturation.**
- 46 Esteller M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358(11), 1148–1159 (2008).
- 47 Ball MP, Li JB, Gao Y *et al.* Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat. Biotechnol.* 27(4), 361–368 (2009).
- 48 Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13(7), 484–492 (2012).
- 49 Kozlenkov A, Roussos P, Timashpolsky A *et al.* Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites. *Nucleic Acids Res.* 42(1), 109–127 (2014).
- 50 Mosse YP, Laudenslager M, Longo L *et al.* Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455(7215), 930–935 (2008).
- 51 Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem. J.* 416(2), 153–159 (2008).

- 52 George RE, Sanda T, Hanna M *et al.* Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455(7215), 975–978 (2008).
- 53 Carpenter EL, Mosse YP. Targeting ALK in neuroblastoma – preclinical and clinical advancements. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9(7), 391–399 (2012).
- **Biology of ALK in the development of neuroblastoma, preclinical and clinical progress and challenges associated with resistance to ALK inhibitors.**
- 54 Passoni L, Longo L, Collini P *et al.* Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer. Res.* 69(18), 7338–7346 (2009).
- 55 Schuebel KE, Chen W, Cope L *et al.* Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet.* 3(9), 1709–1723 (2007).
- 56 Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J *et al.* Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells. *Oncogene* 29(18), 2739–2745 (2010).
- 57 Wang Y, Rao VK, Kok WK *et al.* SUMO modification of Stra13 is required for repression of cyclin D1 expression and cellular growth arrest. *PLoS ONE* 7(8), e43137 (2012).
- 58 French JD, Ghossaini M, Edwards SL *et al.* Functional variants at the 11q13 risk locus for breast cancer regulate cyclin D1 expression through long-range enhancers. *Am. J. Hum. Genet.* 92(4), 489–503 (2013).
- 59 Suzuki H, Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 455(1–2), 35–42 (2014).
- 60 GEO Expression Omnibus.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
- 61 Lavarino C. DNA methylation changes at CpG and non-CpG sites are associated with development and clinical behavior in neuroblastoma.
www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token
- 62 Lavarino C. DNA methylation changes at CpG and non-CpG sites are associated with development and clinical behavior in neuroblastoma [methylation].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query>
- 63 Lavarino C. DNA methylation changes at CpG and non-CpG sites are associated with development and clinical behavior in neuroblastoma [gene expression].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query>

SUPPLEMENTARY INFORMATION TO

DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights

Soledad Gómez, Giancarlo Castellano, Gemma Mayol, Ana Queiros, Marina Bibikova, Kristopher L Nazor, Jeanne F Loring, Isadora Lemos, Eva Rodríguez, Carmen de Torres, Jaume Mora, José I. Martín-Subero and Cinzia Lavarino

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Real-time quantitative PCR, Copy number variation analysis and DNA sequencing

Genomic DNA was isolated using Wizard DNA Purification Kit (Promega Biotech Ibérica, Spain), following manufactures' protocols. DNA was hybridized with CytoScan™ HD Array (Affymetrix, Inc., CA, USA) at the Microarray Analysis Service, IMIM (*Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques*, Barcelona Biomedical Research Park) following manufacturers' recommendations. Array data was analyzed for copy number variations (CNVs) using the Affymetrix® Chromosome Analysis Suite (ChAS) 2.1 software based on the reference genome sequence of the UCSC Genome Browser hg19 (GRCh37/hg19). CNVs were also determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), as previously described [31, 33].

Total RNA was extracted with TRI-reagent (Sigma) and RNA quality was assessed with an Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA), following the manufacturer's protocol. Reverse transcription and RT-qPCR was performed following previously described protocols [23].

DNA sequence analysis was performed using BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) on a ABI Prism 3130XL sequencer (Applied Biosystems), following standard procedures.

Bisulfite pyrosequencing primers

To validate DNA methylation data, two non-CpG sites located in Region 1 (ch.2.731300R: start chr2:29,581,438) and Region 2 (ch.2.740763F: start chr2:30,043,545) were analyzed by bisulfite pyrosequencing as previously described [38].

Primers

NeuroBlast_Region1_F	/5Biosg/ATAGAAAGGTGGGTATTTGTA
NeuroBlast_Region1_R	CAAAAATTTCCCAACATATAACC
NeuroBlast_Region1_Seq	ATTAACAACAAATTCTCCCAAAT

NeuroBlast_Region2_F	GAGGATAGGGATTTAGTTGA
NeuroBlast_Region2_R	/5Biosg/AAACCCAACACTTCCA
NeuroBlast_Region2_Seq	ATGAGATTTTTGTTTTTTTAGTATA

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical analysis was performed on formalin-fixed paraffin embedded tissues using rabbit monoclonal anti-ALK antibody (Thermo Fisher Scientific, UK) at a 1:100 dilution for 30 minutes and mouse polyclonal anti-synaptophysin antibody (Leica, US) 1:100 dilution, 30 minutes.

Western blot analysis

Proteins were extracted and quantified as previously reported [40]. Proteins (40µg) of were resolved on an 8% SDS-PAGE. Membranes were incubated with rabbit monoclonal anti-ALK antibody (1:250; Thermo Fisher Scientific, UK) and mouse monoclonal anti-βactin antibody (1:10000; Sigma, US). Following primary antibody incubation, membranes were probed with IRDye® 800CW goat anti-rabbit IgG (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) or IRDye® 680RD goat anti-mouse IgG (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) secondary antibody. The membrane was scanned in an Odyssey CLx imaging system (LI-COR Biosciences), and band intensities were quantified using the Odyssey software.

Infinium Human Methylation 450k BeadChip platform publicly available databases

Comparison of non-CpG methylation levels of diverse human normal and cancer samples (n=1334) was performed using 12 Infinium Human Methylation 450k BeadChip (Illumina Inc, San Diego, CA) publically available databases (listed below). Mean methylation levels of non-CpG sites differentially methylated between high- and low-risk neuroblastoma (118 non-CpGs, Supplementary Table 4) was calculated. If the same tissue type was analyzed in more than one dataset, these samples were merged into a single beta value representing one particular normal tissue or tumor.

List of *Gene Expression Omnibus* databases used:

- GSE30870; Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, Esteller M. *Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(26):10522-7. doi: 10.1073/pnas.1120658109.

- GSE34688; Shao K, Koch C, Gupta MK, Lin Q, Lenz M, Laufs S, Denecke B, Schmidt M, Linke M, Hennies HC, Hescheler J, Zenke M, Zechner U, Šarić T, Wagner W. *Induced Pluripotent Mesenchymal Stromal Cell Clones Retain Donor-derived Differences in DNA Methylation Profiles*. Mol Ther. 2013; 21(1):240-50. doi: 10.1038/mt.2012.207.
- GSE36278; Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu XY, Fontebasso AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, von Komorowski G, Dürken M, Kulozik AE, Madden J, Donson A, Foreman NK, Drissi R, Fouladi M, Scheurlen W, von Deimling A, Monoranu C, Roggendorf W, Herold-Mende C, Unterberg A, Kramm CM, Felsberg J, Hartmann C, Wiestler B, Wick W, Milde T, Witt O, Lindroth AM, Schwartzentruber J, Faury D, Fleming A, Zakrzewska M, Liberski PP, Zakrzewski K, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Morrissy S, Cavalli F, Taylor MD, van Sluis P, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, Mikkelsen T, Aldape K, Reifenberger G, Collins VP, Majewski J, Korshunov A, Lichter P, Plass C, Jabado N, Pfister SM. *Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma*. Cancer Cell. 2012; 16; 22(4):425-37. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.024.
- GSE37754; Terunuma A, Putluri N, Mishra P, Mathé EA, Dorsey TH, Yi M, Wallace TA, Issaq HJ, Zhou M, Killian JK, Stevenson HS, Karoly ED, Chan K, Samanta S, Prieto D, Hsu TY, Kurley SJ, Putluri V, Sonavane R, Edelman DC, Wulff J, Starks AM, Yang Y, Kittles RA, Yfantis HG, Lee DH, Ioffe OB, Schiff R, Stephens RM, Meltzer PS, Veenstra TD, Westbrook TF, Sreekumar A, Ambros S. *MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis*. J Clin Invest. 2014; 2; 124(1):398-412. doi: 10.1172/JCI71180.
- GSE38216-GPL13534; Kim M, Park YK, Kang TW, Lee SH, Rhee YH, Park JL, Kim HJ, Lee D, Lee D, Kim SY, Kim YS. *Dynamic changes in DNA methylation and hydroxymethylation when hES cells undergo differentiation toward a neuronal lineage*. Hum Mol Genet 2014; 23(3):657-67. doi: 10.1093/hmg/ddt453.
- GSE39279; Sandoval J, Mendez-Gonzalez J, Nadal E, Chen G, Carmona FJ, Sayols S, Moran S, Heyn H, Vizoso M, Gomez A, Sanchez-Cespedes M, Assenov Y, Müller F, Bock C, Taron M, Mora J, Muscarella LA, Liloglou T, Davies M, Pollan M, Pajares MJ, Torre W, Montuenga LM, Brambilla E, Field JK, Roz L, Lo Iacono M, Scagliotti GV, Rosell R, Beer DG, Esteller M. *A Prognostic DNA Methylation Signature for Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer*. J Clin Oncol. 2013; 31(32):4140-7. doi: 10.1200/JCO.2012.48.5516.

- GSE44684; Lambert SR, Witt H, Hovestadt V, Zucknick M, Kool M, Pearson DM, Korshunov A, Ryzhova M, Ichimura K, Jabado N, Fontebasso AM, Lichter P, Pfister SM, Collins VP, Jones DT. *Differential expression and methylation of brain developmental genes define location-specific subsets of pilocyticastrocytoma*. *Acta Neuropathol.* 2013; 126(2):291-301. doi: 10.1007/s00401-013-1124-7.
- GSE50798; Kozlenkov A, Roussos P, Timashpolsky A, Barbu M, Rudchenko S, Bibikova M, Klotzle B, Byne W, Lyddon R, Di Narzo AF, Hurd YL, Koonin EV, Dracheva S. *Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites*. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(1):109-27. doi: 10.1093/nar/gkt838.
- GSE52401; Shi J, Marconett CN, Duan J, Hyland PL, Li P, Wang Z, Wheeler W, Zhou B, Campan M, Lee DS, Huang J, Zhou W, Triche T, Amundadottir L, Warner A, Hutchinson A, Chen PH, Chung BS, Pesatori AC, Consonni D, Bertazzi PA, Bergen AW, Freedman M, Siegmund KD, Berman BP, Borok Z, Chatterjee N, Tucker MA, Caporaso NE, Chanock SJ, Laird-Offringa IA, Landi MT1. *Characterizing the genetic basis of methylome diversity in histologically normal human lung tissue*. *Nature Communications* 2014; 27; 5:3365. doi: 10.1038/ncomms4365.
- GSE38235; Busche S, Ge B, Vidal R, Spinella JF, Saillour V, Richer C, Healy J, Chen SH, Droit A, Sinnott D, Pastinen T. *Integration of High-Resolution Methylome and Transcriptome Analyses to Dissect Epigenomic Changes in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Cancer Res.* 2013; 73(14):4323-36. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4367.
- GSE30654; Nazor KL, Altun G, Lynch C, Tran H, Harness JV, Slavin I, Garitaonandia I, Müller FJ, Wang YC, Boscolo FS, Fakunle E, Dumevska B, Lee S, Park HS, Olee T, D'Lima DD, Semechkin R, Parast MM, Galat V, Laslett AL, Schmidt U, Keirstead HS, Loring JF, Laurent LC. *Recurrent Variations in DNA Methylation in Human Pluripotent Stem Cells and their Differentiated Derivatives*. *Cell Stem Cell.* 2012; 10(5):620-34. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.013.

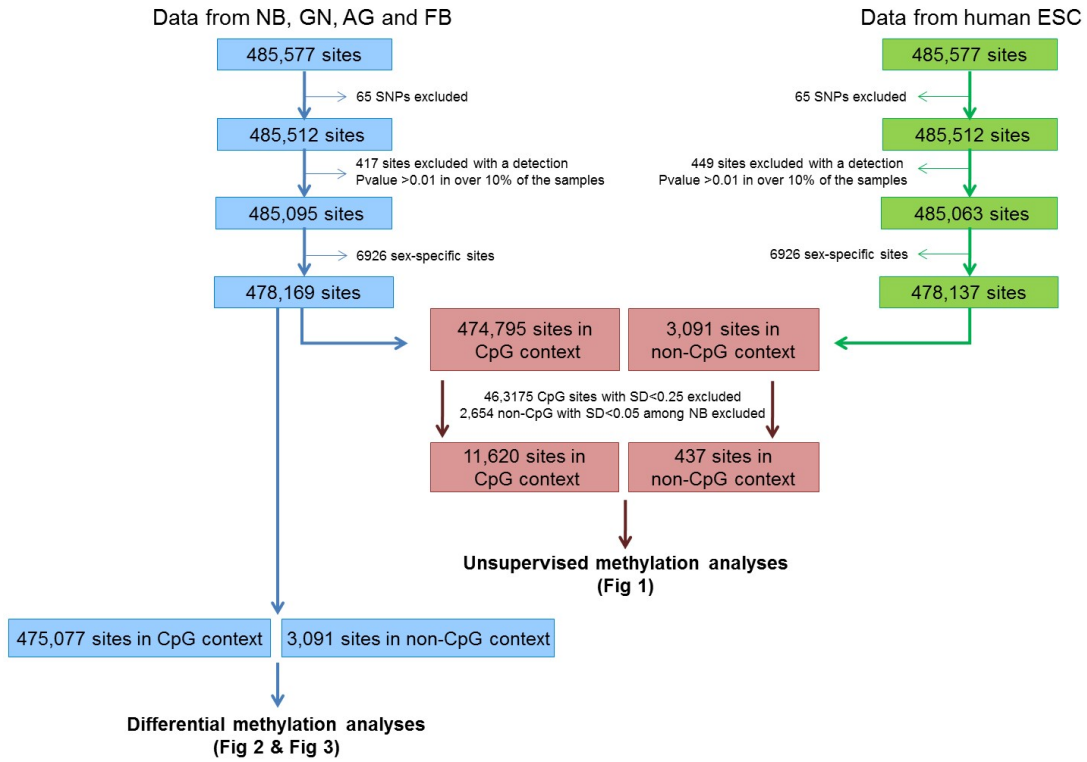
List from *The European Genome-phenome Archive* databases set used:

- EGAD00010000254; Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, Martínez-Trillos A, Castellano G, Brun-Heath I, Pinyol M, Barberán-Soler S, Papasaikas P, Jares P, Beà S, Rico D, Ecker S, Rubio M, Royo R, Ho V, Klotzle B, Hernández L, Conde L, López-Guerra M, Colomer D, Villamor N, Aymerich M, Rozman M, Bayes M, Gut M, Gelpí JL, Orozco M, Fan JB, Quesada V, Puente XS, Pisano DG, Valencia A, López-Guillermo A, Gut I, López-Otín C, Campo E, Martín-Subero JI. *Epigenomic analysis*

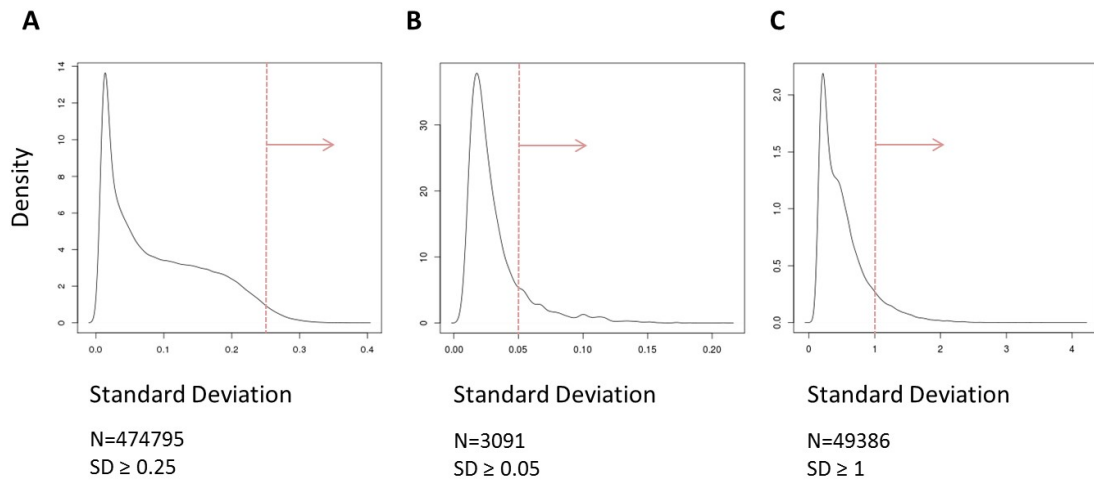
detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. Nat Genet. 2012; 44(11):1236-42. doi: 10.1038/ng.2443.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1: Flow chart showing the steps followed in the analysis of the microarray data of DNA methylation.

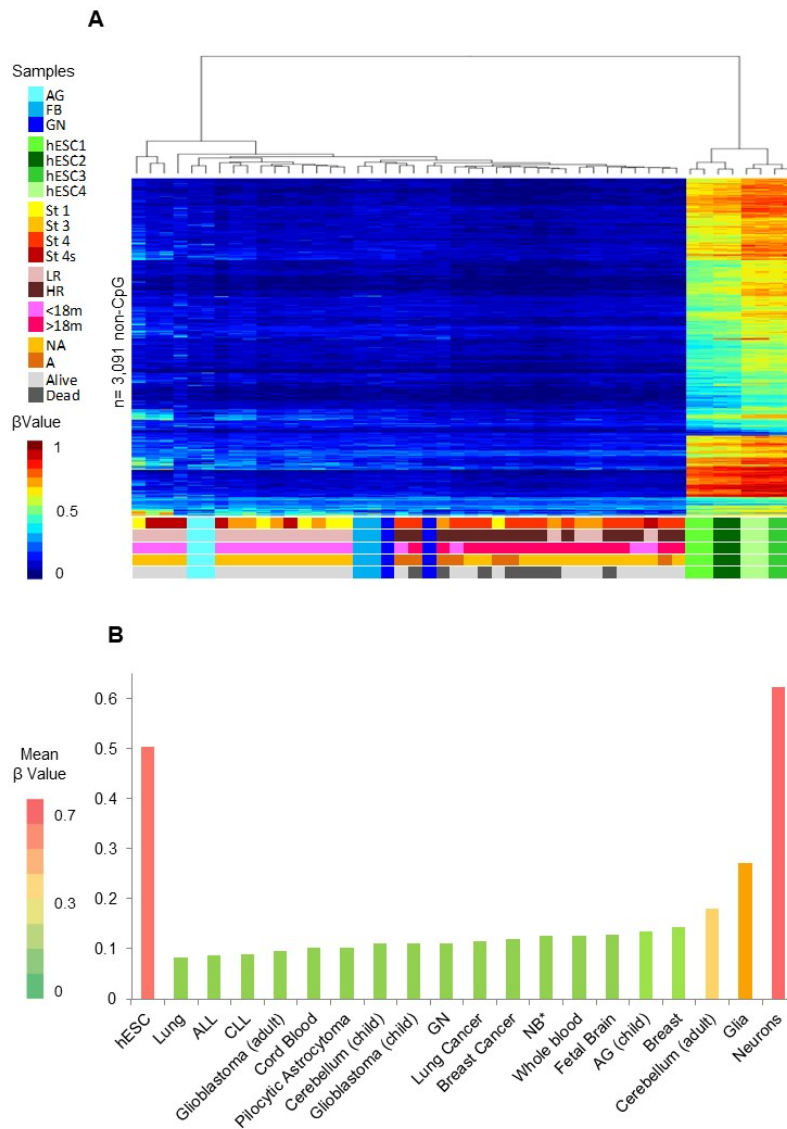


Supplementary Figure 2: Standard Deviation Density Plots.



(A) CpG sites in all samples analyzed (neuroblastoma, human embryonic stem cells, adrenal gland, fetal brain and ganglioneuroma). **(B)** non-CpG sites in neuroblastomas. **(C)** Gene expression probes in all samples (neuroblastoma, adrenal gland, fetal brain and ganglioneuroma). Red dot line: selected SD cut-off value. Standard Deviation (SD).

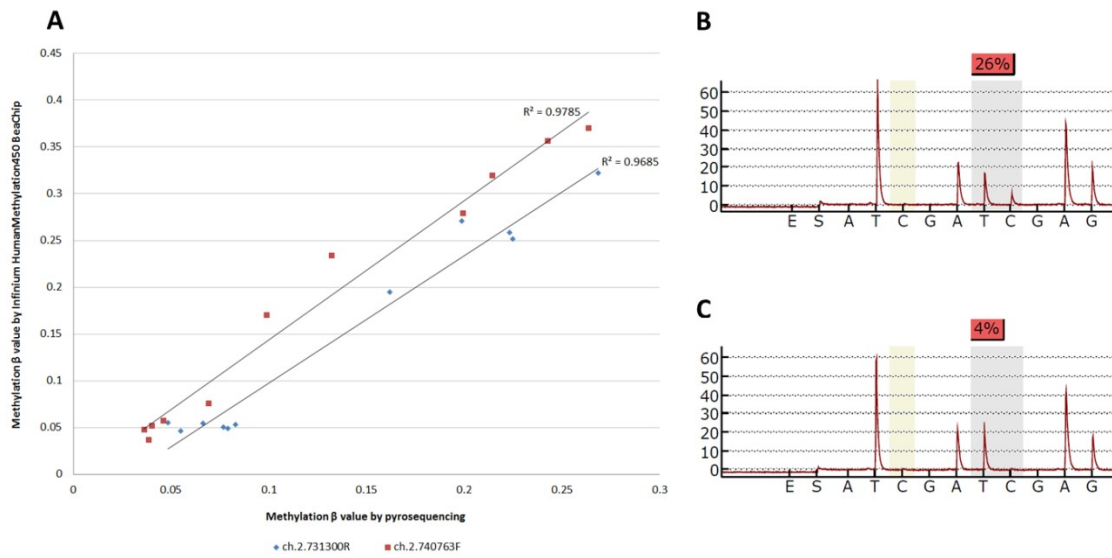
Supplementary Figure 3: non-CpG unsupervised analysis



(A) Unsupervised analysis of all the non-CpG sites (3,091) probed in the Illumina HM450K array in neuroblastoma and references samples. **(B)** Comparison of non-CpG methylation profiles of neuroblastoma with diverse human normal and cancer samples (n=1334).

LR, low-risk neuroblastoma; HR, High-risk neuroblastoma; AG, Adrenal gland; FB, Fetal brain; GN, Ganglioneuroma; hESC, human embryonic stem cell; ALL, acute lymphoblastic leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; <18m/>18m, patient's younger/older than 18 months at diagnosis; NA/A, *MYCN* (*v-myc* avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog) status non-amplified/amplified; Alive/Dead, survival patient status; β -value, DNA methylation level (value).

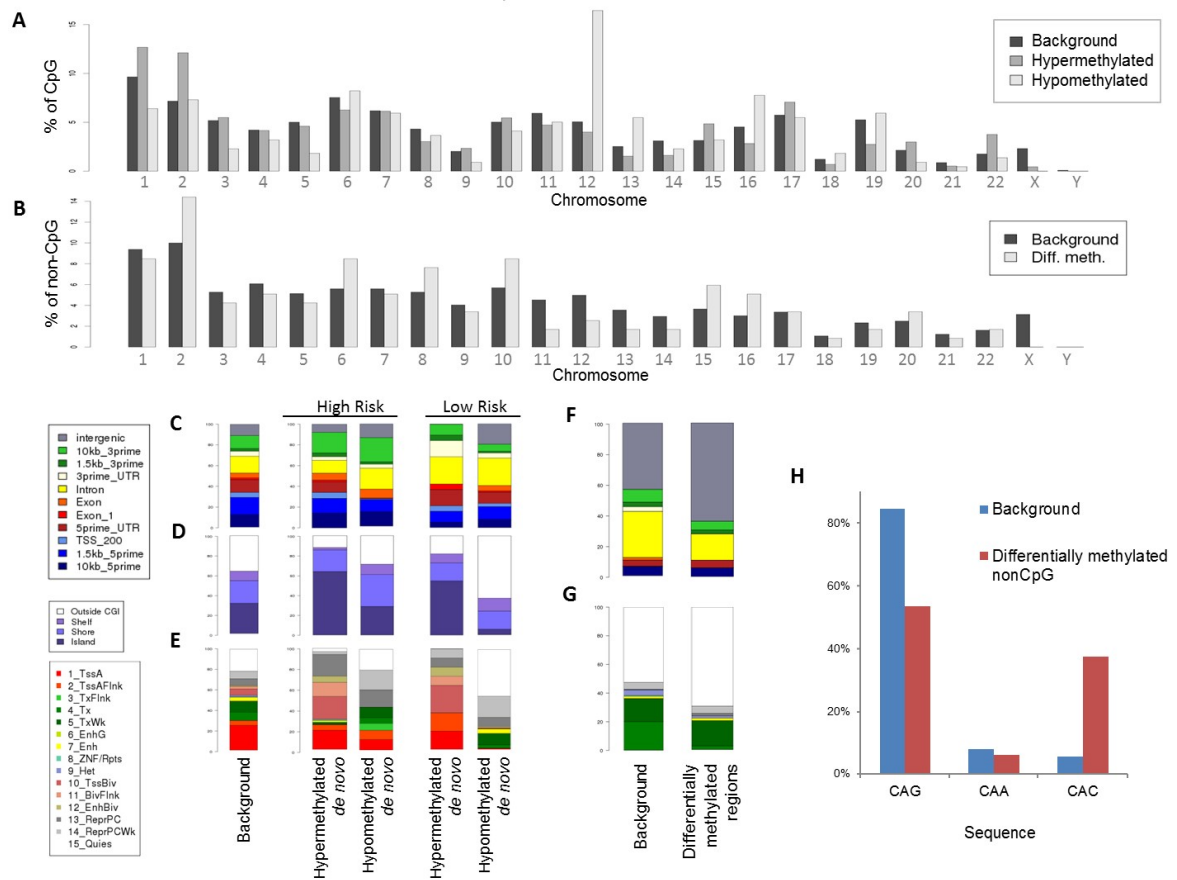
Supplementary Figure 4: Technical non-CpG Methylation Validation.



Technical non-CpG Methylation Validation of 2 intronic non-CpG sites (ch.2.740763F and ch.2.731300R) identified as differentially methylated in the *ALK* gene.

(A) Scatter Plot of DNA methylation levels obtained by Infinium Human Methylation 450k BeadChip (Illumina Inc, San Diego, CA) (Y-axis) and bisulfite Pyrosequencing (X-axis) (n=11). A highly significant correlation ($P < 0.001$, $R^2 = 0.978$ and $R^2 = 0.968$, respectively) between microarray and pyrosequencing data was observed. Example of pyrograms with methylated **(B)** and unmethylated **(C)** non-CpG sites.

Supplementary Figure 5: DNA methylation levels of CpG and non-CpG sites in high and low-risk Neuroblastoma.



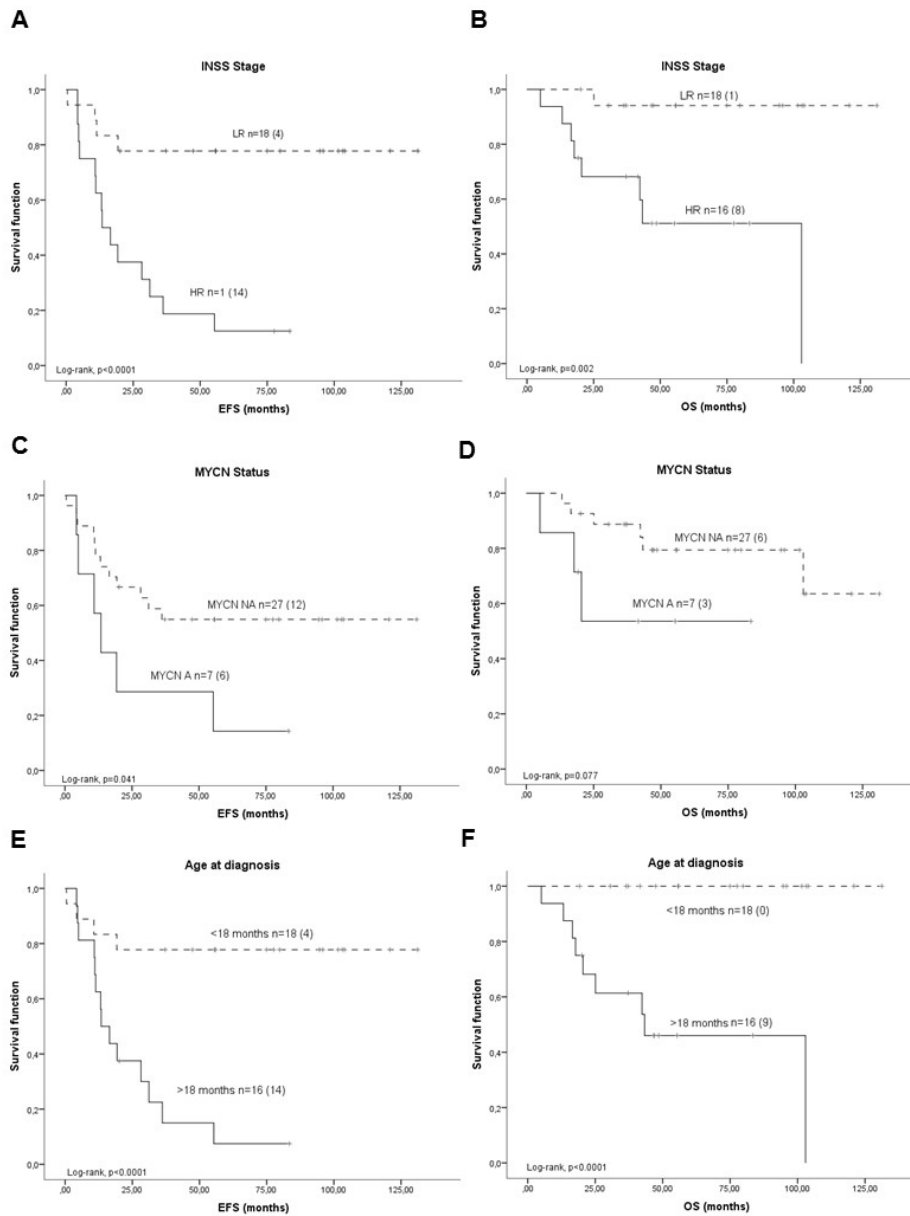
(A-B) Chromosomal distribution of hypermethylated and hypomethylated **(A)** CpG and **(B)** non-CpG sites of high-risk as compared to low-risk tumors. **(C)** Gene domains, **(D)** CpG density regions and **(E)** chromatin states associated with *de novo* CpG methylation levels in low-risk and high-risk neuroblastoma. **(F)** Gene domains and **(G)** chromatin states associated with non-CpG methylation in low-risk neuroblastoma. **(H)** Analysis of enrichment of particular nucleotide sequence at non-CpG sites.

Gene-related regions: 10kb_5prime (from 1,501bp to 10,000bp upstream of the Transcription Start Site (TSS)), 1.5kb_5prime (from 201bp to 1,500bp upstream of the TSS), TSS_200 (from TSS to 200bp upstream of the TSS), 5prime_UTR, Exon_1 (first exon), Exon (all the others exons), Intron (all introns), 3prime_UTR, 1.5kb_3prime (from the transcription termination site (TTS) to 1,500bp downstream TTS), 10kb_3prime (from 1,501bp to 10,000bp downstream of the TTS) and intergenic regions.

Location relative to CpG Island (CGI): CGI, CGI shore (0-2 kb from CGI edge), CGI shelf (from 2001bp to 4 kb from the CGI edge) and outside the CGI categories.

Chromatin State: State 1: TssA (Active_TSS); State 2: TssAFlnk (Flanking_Active_TSS); State 3: TxFlnk (Transcr_at_gene_5_and_3_primer); State 4: Tx (Strong_transcription); State 5: TxWk (Weak_transcription); State 6: EnhG (Genic_enhancers); State 7: Enh (Enhancers); State 8: ZNF/Rpts (ZNF_genes&repeats); State 9: Het (Heterochromatin); State 10: TssBiv (Bivalent/Poised_TSS); State 11: BivFlnk (Flanking_Bivalent_TSS/Enhancer); State 12: EnhBiv (Bivalent_Enhancer); State 13: ReprPC (Repressed_PolyComb); State 14: ReprPCWk (Weak_Repressed_PolyComb); State 15: Quies (Quiescent/Low).

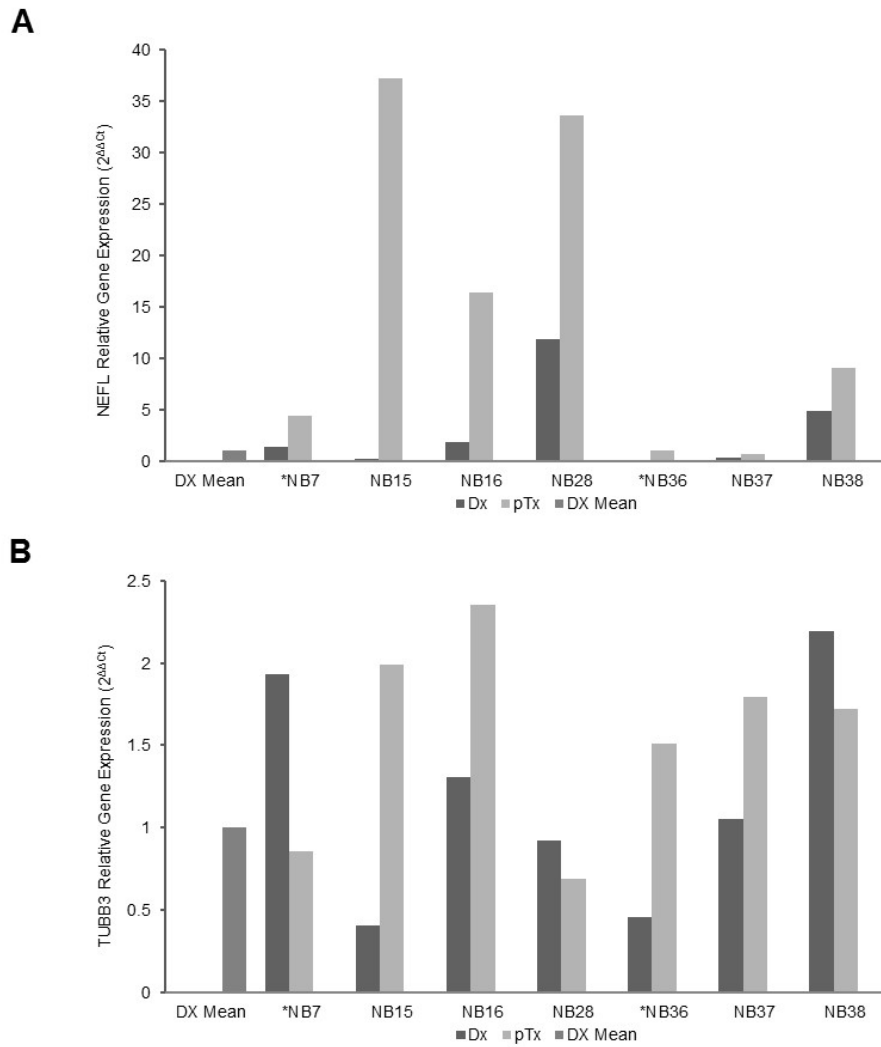
Supplementary Figure 6: Kaplan-Meier survival analysis according to established clinical and biological parameters for neuroblastoma prognosis



(A-B) INSS Stage, **(A)** EFS (LR 0.77 ± 0.09 , $P<0.0001$ vs. HR 0.12 ± 0.08); **(B)** OS (LR 0.94 ± 0.05 vs. HR 0.51 ± 0.13 , $P=0.002$). **(C-D)** *MYCN* Status, **(C)** EFS (*MYCN* NA 0.54 ± 0.09 vs. *MYCN* A 0.14 ± 0.13 , $P=0.041$); **(D)** OS (*MYCN* NA 0.63 ± 0.15 vs. *MYCN* A 0.53 ± 0.20 , $P=0.077$). **(E-F)** Age at diagnosis, **(E)** EFS (<18 months 0.77 ± 0.09 vs. >18 months 0.07 ± 0.07 , $P<0.0001$); **(F)** OS (<18 months 1.0 vs. >18 months 0.46 ± 0.13 , $P<0.0001$).

INSS Stage, Stage according to the International Neuroblastoma Staging System; LR, Low-Risk Neuroblastoma; HR, High-Risk Neuroblastoma; Age at diagnosis: <18m/>18m, patient's younger/older than 18 months at diagnosis; NA/A, *MYCN* (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog) status non-amplified/amplified; OS, Overall survival; EFS, Event free survival.

Supplementary Figure 7: ALK differentiation markers



Mean Dx: mean gene, **(A) NEFL (B) TUBB3**, expression level of neuroblastomas at moment of diagnosis. Dx, sample obtained at diagnosis; pTx, biopsy obtained at conclusion of chemotherapy treatment.

SUPPLEMENTARY TABLES

All Supplementary Tables can be found online.

Supplementary Table 1: Patients' clinical and biological characteristics.

Supplementary Table 2: Differentially methylated CpG sites between Neuroblastoma and normal reference tissues.

Supplementary Table 3: Correlation between DNA methylation and gene expression data in Neuroblastoma.

Supplementary Table 4: Differentially methylated CpG/non-CpG sites between High-risk and Low-risk Neuroblastoma.

Supplementary Table 5: *De novo* DNA methylation Gene Ontology terms in Low-risk (LR) and High-risk (HR) Neuroblastoma.

Supplementary Table 6: DNA methylation changes associated with neuroblastoma patients' outcome.

Supplementary Table 7: DNA methylation in genes with recurrent genetic alterations in Neuroblastoma.

Supplementary Table 8: Transcription Factor Binding Sites of CpGs associated with *CCND1* and 200KB upstream_TSS *CCND1*.

Supplementary Table 9: Transcription Factor Binding Sites of CpGs associated with *ALK* and 200KB upstream_TSS *ALK*.

Todas las tablas (Supplementary Table 1-9) no se encuentran impresas a continuación, se encuentran en formato digital en el CD que acompaña esta tesis.



Data in Brief

DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights



Soledad Gómez^a, Giancarlo Castellano^b, Gemma Mayol^a, Ana Queiros^b, José I. Martín-Subero^{b,c}, Cinzia Lavarino^{a,*}

^a Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

^b Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^c Department of Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2015

Accepted 13 July 2015

Available online 17 July 2015

Keywords:

Neuroblastoma
Embryonal tumor
High-density microarray
DNA methylation
HM450K

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is one of the most frequently occurring extracranial solid tumors of childhood (Maris et al., 2007 [1]; Brodeur, 2003 [2]). Probability of cure varies according to patient's age, extent of disease and tumor biology (Maris et al., 2007 [1]; Brodeur, 2003 [2]; Cohn et al., 2009 [3]). However, the etiology of this developmental tumor is unknown. Recent evidence has shown that pediatric solid tumors, including NB, harbor a paucity of recurrent genetic mutations, with a significant proportion of recurrent events converging on epigenetic mechanisms (Cheung et al., 2012 [4]; Molenaar et al., 2012 [5]; Pugh et al., 2013 [6]; Sausen et al., 2013 [7]).

We have analyzed the DNA methylome of neuroblastoma using high-density microarrays (Infinium Human Methylation 450k BeadChip) to define the epigenetic landscape of this pediatric tumor and its potential clinicopathological impact. Here, we provide the detail of methods and quality control parameters of the microarray data used for the study. Methylation data has been deposited at NCBI Gene Expression Omnibus data repository, accession number GSE54719; superseries record GSE54721.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Specifications

Organism/cell line/tissue	<i>Homo sapiens</i>
Sex	Neuroblastoma samples (n = 35) were composed by 17 males and 18 females. All reference samples (n = 4) were males.
Sequencer or array type	Infinium Human Methylation 450k BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA). GPL13534
Data format	Raw data is available as TXT non-normalized methylated and non-normalized unmethylated tables.
Experimental factors	Tumor and reference samples.
Experimental features	Normal fetal brain (n = 2) and adrenal gland (n = 2) tissues as well as ganglioneuroma (benign Schwannian stroma dominant neuroblastic tumor) samples (n = 2) were used as reference samples. Tumor cell content was evaluated by a pathologist.
Consent	Patients, parents or guardians signed an informed consent before sample collection.
Sample source location	Hospital Sant Joan de Déu – Barcelona, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain. Latitude: 41.383906 longitude: 2.101771

1. Direct link to deposited data

Methylation microarray data has been deposited at NCBI Gene Expression Omnibus data repository (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with accession number GSE54719 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54719>); on superseries record GSE54721 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54721>).

2. Experimental design

To define the DNA methylation landscape of neuroblastoma and its potential clinicopathological impact. Microarray DNA methylation data (Infinium Human Methylation 450k BeadChip) were analyzed and associated with functional/regulatory genome annotation data, transcriptional profiles and clinico-biological parameters.

3. Material and methods

3.1. Patients and samples

Thirty-five primary neuroblastoma tumors (including 6 stage 1, 9 stage 3, 6 stage 4s and 14 stage 4) obtained at the time of diagnosis

* Corresponding author.

E-mail address: clavarino@fsjd.org (C. Lavarino).

Table 1
Patients' clinical and biological characteristics.

Characteristics	Methylation array samples (n = 35)		
Age, months	Median	17.90	
	Range	0.10–225.28	
INSS, n (%)	Stages 1–3	15	44.12%
	Stage 4	14	41.18%
	Stage 4s	6	17.65%
MYCN status, n (%)	MYCN Amp	7	20.59%
	MYCN non-Amp	28	82.35%

from patients diagnosed and treated at Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona, Spain) were included in the study. Normal fetal brain (n = 2) and adrenal gland (n = 2) tissues as well as ganglioneuroma samples (n = 2) were used as reference samples. Neuroblastoma risk assessment was defined by the International Neuroblastoma Staging System (INSS) [8]. Patients' clinical and biological characteristics are displayed in Table 1. Tumors were evaluated by a pathologist, only samples with more than 70% viable tumor cell content were included in the study. This study was approved by the Institutional Review Boards. Informed consent was obtained before collection of samples.

Genomic DNA was isolated from samples using Wizard DNA Purification Kit (Promega Biotech Ibérica, Spain), following manufactures' protocols.

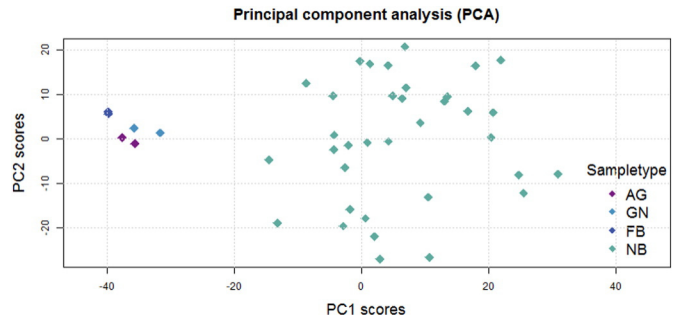


Fig. 2. Principal component analysis. AG: adrenal gland. GN: ganglioneuroma. FB: fetal brain. NB: neuroblastoma.

3.2. DNA methylation microarrays

Genomic DNA bisulfite conversion and hybridization to Infinium Human Methylation 450k BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA) was performed at the Human Genotyping Unit of the Spanish National Cancer Center (CEGEN-CNIO, Madrid, Spain), as described previously [9].

3.3. Quality control

Microarray data was analyzed by minfi [10] and shinyMethyl [11] packages available through Bioconductor [12].

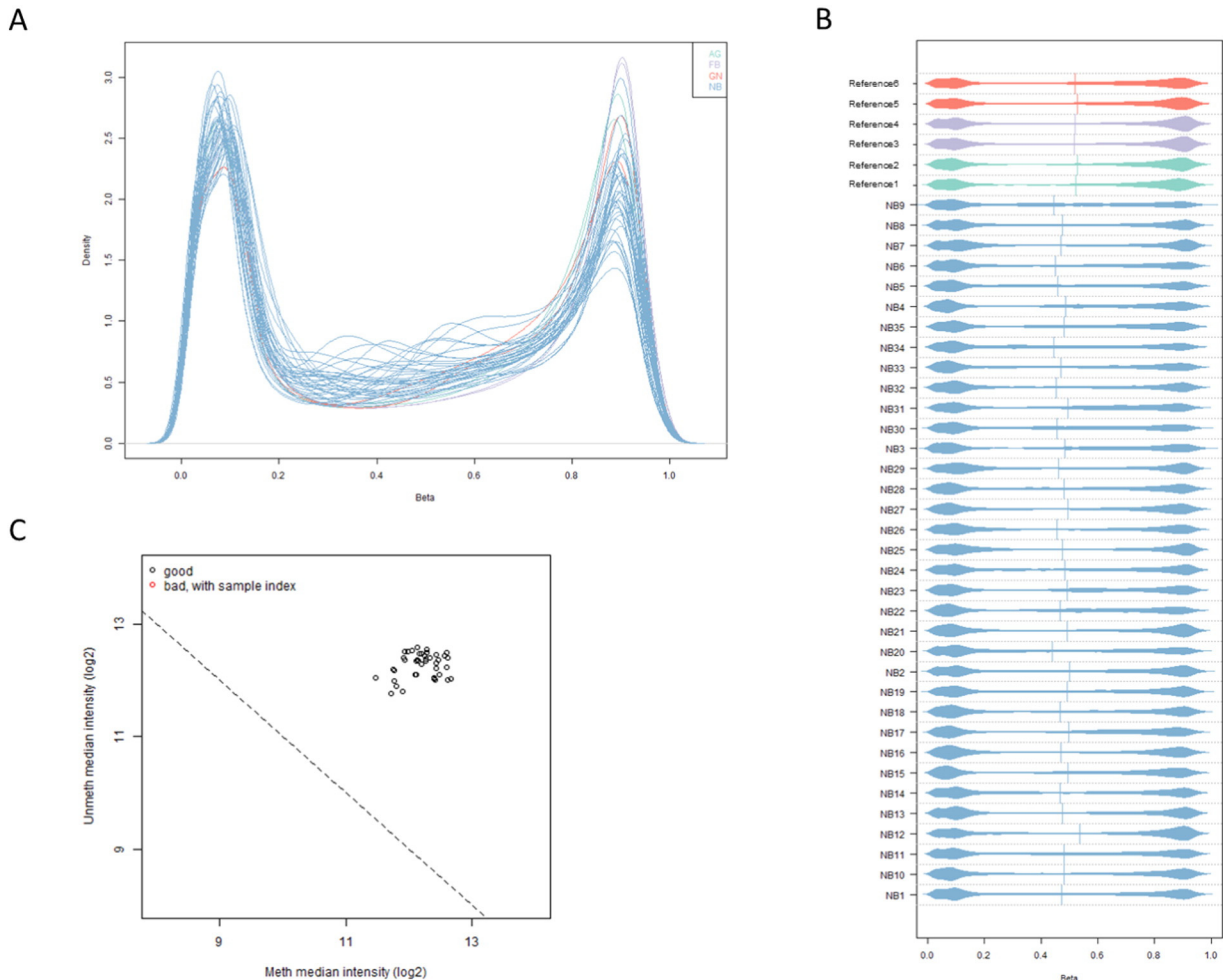


Fig. 1. A: Raw β -value density plot. B: Raw β -value bean density plot. C: Scatter plot of log median intensity of methylated (Meth) and unmethylated (Unmeth) channels.

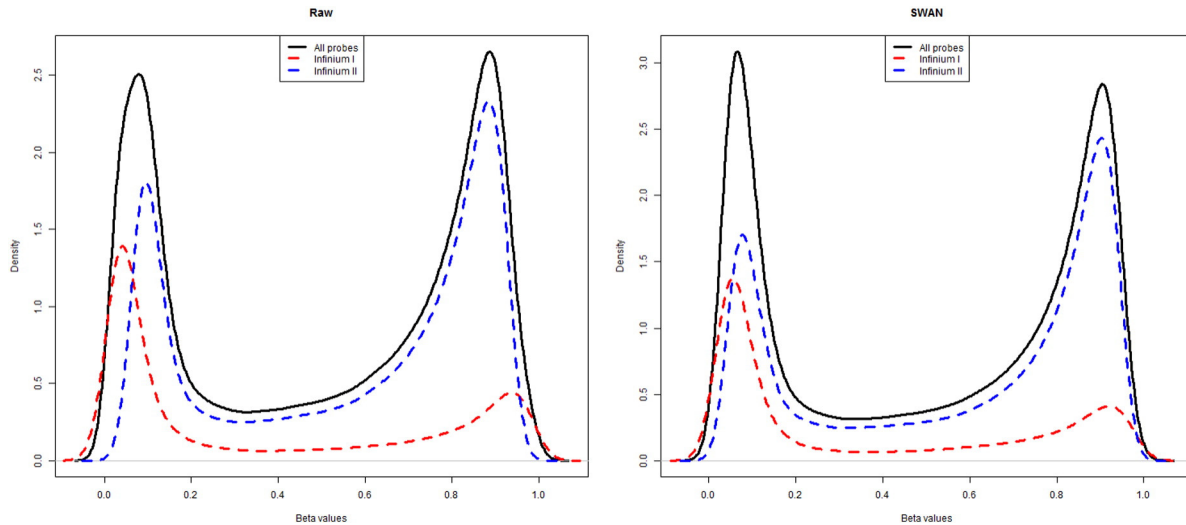


Fig. 3. Density distributions of beta values before and after using SWAN.

Single cytosine methylation values (β -values) in each sample were calculated as the ratio of the methylated signal intensity to the sum of methylated and unmethylated signals. Methylation values ranged from 0, fully unmethylated, to 1, fully methylated cytosine. Raw methylation β -value plots were performed for all samples to identify possible deviant samples (Fig. 1 & B).

Sample quality was assessed using the log median intensity in both the methylated and unmethylated channels (Fig. 1C).

Principal component analysis (PCA) was performed on the 20,000 most variable autosomal probes in order to analyze associations between sample type (adrenal gland, ganglioneuroma, fetal brain or neuroblastoma) and methylation levels (Fig. 2).

3.4. Data normalization

Microarray methylation data was normalized by missMethyl package [13] using the SWAN (subset-quantile within array normalization), a within-array normalization method for Illumina Human Methylation 450k BeadChips (Fig. 3).

3.5. Filtering of microarray data

An optimized pipeline with several filters developed at the IDIBAPS was used to exclude technical biases, [14,15]. Cytosines with poor detection P-values ($P > 0.01$) and those with sex-specific DNA methylation ($n = 6926$) were removed from the initial dataset of 485,512 sites (excluding probes detecting SNPs). The remaining sites ($n = 478,169$) were used for downstream analyses (Fig. 4).

3.6. Bisulfite pyrosequencing

DNA methylation data were validated by bisulfite pyrosequencing as previously described [15,16] (Fig. 5).

4. Data summary

The analysis of the DNA methylome of neuroblastoma patients revealed that: i) most DNA methylation changes take place outside promoters, ii) not only CpGs but also non-CpG sites are targeted, iii) methylation changes at these sites are associated with clinicopathological features of neuroblastoma, and iv) the identified epigenetic patterns provide new insights into the pathogenesis and clinical behavior of this pediatric tumor. The analysis of this data has been reported in our recently published study [15].

Financial disclosure

This work was supported by the NEN association (association of families and friends of patients with neuroblastoma) [to S Gómez], Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain [BR201102 to G. Mayol] and Spanish Government [PI11/02661 and PI14/00038 Instituto de Salud Carlos III grant to C Lavarino and Ramon y Cajal Grant to JI Martín-Subero].

Acknowledgments

The authors acknowledge G. Garcia-Castellví for the fund raising and the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the National Network Biobanks of ISCIII for tissue samples. The authors also thank J. Ríos for statistical advice and S. Sánchez Molina for precious technical support.

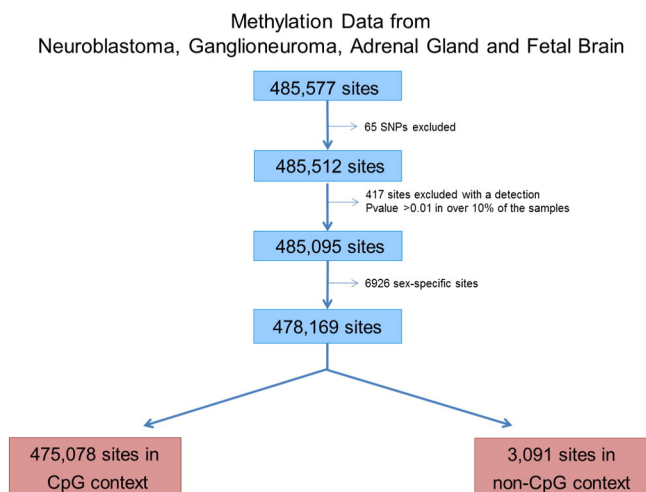


Fig. 4. Data processing work-flow.

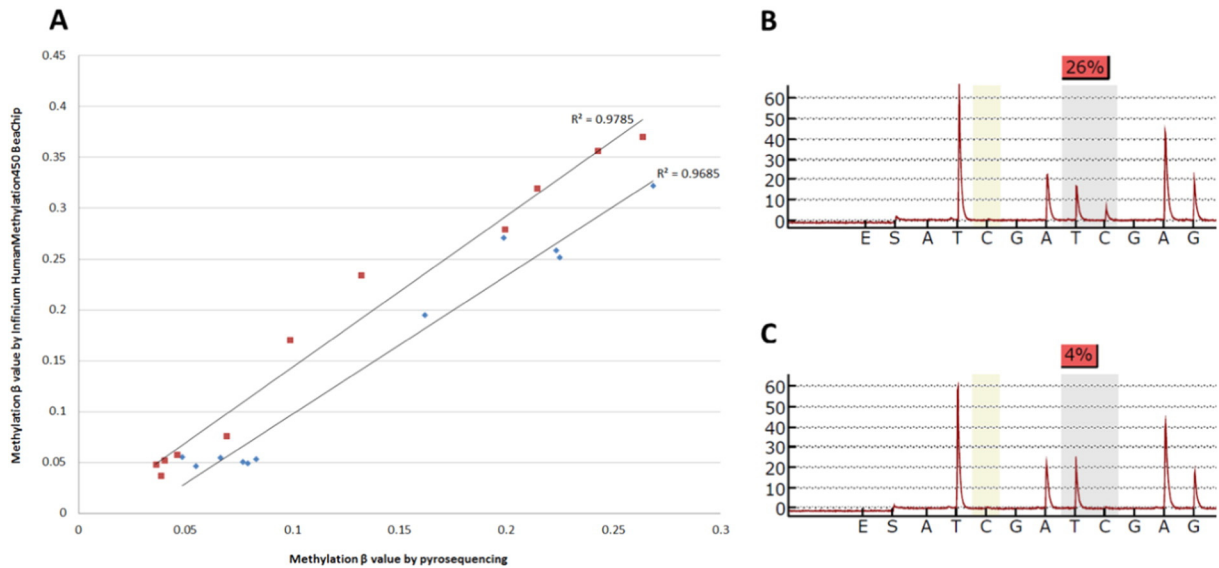


Fig. 5. Technical DNA methylation validation. (A) Scatter plot of DNA methylation levels obtained by Infinium Human Methylation 450k BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA) (Y-axis) and bisulfite pyrosequencing (X-axis) ($n = 11$). A highly significant correlation ($P < 0.001$, $R^2 = 0.978$ and $R^2 = 0.968$, respectively) between microarray and pyrosequencing data was observed. Example of pyrograms with methylated (B) and unmethylated (C) cytosines.

References

- [1] J.M. Maris, M.D. Hogarty, R. Bagatell, S.L. Cohn, Neuroblastoma. *Lancet* 369 (9579) (2007) 2106–2120.
- [2] G.M. Brodeur, Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer* 3 (3) (2003) 203–216.
- [3] S.L. Cohn, A.D. Pearson, W.B. London, et al., The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J. Clin. Oncol.* 27 (2) (2009) 289–297.
- [4] N.K. Cheung, J. Zhang, C. Lu, et al., Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* 307 (10) (2012) 1062–1071.
- [5] J.J. Molenaar, J. Koster, D.A. Zwijnenburg, et al., Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* 483 (7391) (2012) 589–593.
- [6] T.J. Pugh, O. Morozova, E.F. Attiyeh, et al., The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat. Genet.* 45 (3) (2013) 279–284.
- [7] M. Sausen, R.J. Leary, S. Jones, et al., Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat. Genet.* 45 (1) (2013) 12–17.
- [8] G.M. Brodeur, J. Pritchard, F. Berthold, et al., Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 11 (8) (1993) 1466–1477.
- [9] M. Bibikova, B. Barnes, C. Tsan, et al., High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 98 (4) (2011) 288–295.
- [10] M.J. Aryee, A.E. Jaffe, H. Corrada-Bravo, et al., Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* 30 (10) (2014) 1363–1369.
- [11] J.P. Fortin, E. Fertig, K. Hansen, shinyMethyl: interactive quality control of Illumina 450 k DNA methylation arrays in R. *F1000Research* 3 (2014) 175.
- [12] W. Huber, V.J. Carey, R. Gentleman, et al., Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* 12 (2) (2015) 115–121.
- [13] J. Maksimovic, L. Gordon, A. Oshlack, SWAN: subset-quantile within array normalization for Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biol.* 13 (6) (2012) R44.
- [14] M. Kulis, S. Heath, M. Bibikova, et al., Epigenomic analysis detects widespread genome-wide DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 44 (11) (2012) 1236–1242.
- [15] S. Gomez, G. Castellano, G. Mayol, et al., DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. *Epigenomics* (2015) 1–17.
- [16] G. Mayol, J.I. Martin-Subero, J. Rios, et al., DNA hypomethylation affects cancer-related biological functions and genes relevant in neuroblastoma pathogenesis. *PLoS One* 7 (11) (2012) e48401.

Método para la clasificación en subgrupos moleculares de pacientes con Meduloblastoma

Solicitud de Patente Núm. Registro P201730701: [En trámite](#)

Soledad Gómez *et al.* Lancet Oncology: [En revisión de co-autores.](#)

En respuesta a la necesidad de aplicar en la práctica clínica el sistema de clasificación de pacientes con MB en los subgrupos *wingless* (WNT), *sonic hedgehog* (SHH), Grupo 3 y Grupo 4, hemos desarrollado un método novedoso basado en un número reducido de citosinas diferencialmente metiladas que permiten clasificar los tumores de forma rápida, precisa y sencilla empleando técnicas moleculares aplicables en la práctica clínica. Para ello hemos reanalizado bases de datos de metilación del ADN generados mediante tecnología de micorarray *Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip* (HM450K) previamente publicados. En este estudio hemos incluido más de 200 muestras de meduloblastoma (ADN obtenido de muestras de tejido congelado y tejido fijado en formol e embebido en parafina (FFPE), así como otros tumores del desarrollo ($n = 457$) y muestras de tejido humano normal ($n = 85$). Todos los procedimientos de normalización y control de calidad de los datos brutos de metilación del ADN (archivos iDAT) así como todos los análisis que se realizaron en este estudio, han sido ejecutados en nuestro laboratorio según protocolos descritos por nuestro grupo²²¹.

Después de aplicar varios filtros y retirar del estudio las citosinas de baja calidad, nos quedamos con 478.129 citosinas por muestra que alcanzaron nuestros estándares de calidad. Como parte del control de calidad procedimos a replicar los resultados publicados previamente con los mismos datos de metilación. Fuimos capaces de reproducir con éxito los resultados publicados anteriormente de clasificación en subgrupos moleculares de meduloblastoma¹⁰⁰.

A continuación procedimos con la identificación de las citosinas con cambios más significativos en los niveles de metilación entre los subgrupos de meduloblastoma. Mediante un análisis no supervisado empleando los datos de metilación del ADN de muestras congeladas en fresco de 106 meduloblastomas (cohorte de estudio), identificamos 5.904 CpGs con una desviación estándar por encima de 0.3 del nivel de metilación. Mediante un análisis de componentes principales (PCA) observamos que los subgrupos WNT y SHH eran claramente distintos entre sí, mientras que el Grupo 3 y el Grupo 4 mostraban perfiles de metilación del ADN estrechamente relacionados y en parte superpuestos, de forma similar a publicaciones anteriores¹⁰⁰.

Seguidamente procedimos a reducir la complejidad de las de 5.904 citosinas diferenciales con el fin de identificar un conjunto más pequeño de citosinas que explicaran gran parte de la variabilidad total del meduloblastoma, perdiendo la menor cantidad de información posible. El objetivo principal era reducir la información de metilación del ADN redundante para identificar un patrón de metilación compuesto por pocas citosinas que pudieran representar un potencial biomarcador epigenético para la clasificación de los pacientes con meduloblastoma. Mediante la aplicación de diversos filtros fuimos capaces de identificar un número reducido de citosinas con un perfil claramente distintivo de metilación para los subgrupos WNT y SHH. Las muestras del Grupo 3 y Grupo 4 mostraron otra vez una elevada heterogeneidad, con patrones de metilación estrechamente relacionados y en parte similares. Por este motivo para esta primera parte del estudio decidimos agrupar estas muestras en un único grupo, denominado no-WNT/no-SHH. Cabe destacar que en la clasificación revisada de los tumores cerebrales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2016 se incluye de forma provisional el Grupo 3 y el Grupo 4 en un solo grupo denominado no-WNT/no-SHH debido a que no existen en la actualidad ningún método que distinga de forma contundente estos dos subgrupos de tumores. De esta forma pudimos identificar un panel de seis citosinas con un patrón de metilación que se asociaban de forma específica con cada uno de los subgrupos WNT, SHH y no-WNT/no-SHH.

Exploramos la especificidad del panel de citosinas (denominado Panel 1) mediante datos de metilación del ADN de otros tumores pediátricos del sistema nervioso central (ependimoma, glioblastoma, DIPG, astrocitoma pilocítico) y del sistema nervioso periférico (neuroblastoma) así como numerosas muestras de tejido normal. Observamos que el Panel 1 era específico para meduloblastoma ya que ningún otro tumor o muestra normal mostraba un patrón de metilación similar.

Para testar el potencial de clasificación de nuestro Panel 1, realizamos una validación *in silico* empleando una cohorte independiente de datos de metilación del ADN en 169 muestras FFPE de meduloblastoma para las cuales disponíamos de la información de afiliación de los subgrupos moleculares. Para obtener una clasificación objetiva e imparcial procedimos a analizar los datos de metilación del Panel 1 de las muestras FFPE mediante un modelo de Análisis Discriminante Lineal (LDA). La función LDA que utilizamos fue generada previamente con los datos de metilación del Panel 1 (seis citosinas) de la cohorte de entrenamiento. Aplicando este método pudimos predecir el subgrupo molecular de todas las muestras con un 100% de concordancia con los datos publicados previamente con la misma cohorte de meduloblastoma.

El patrón de metilación del Panel 1 es bimodal y específico lo que permitió el análisis de muestras de meduloblastoma empleando técnicas moleculares cuantitativas (pirosecuenciación) y cualitativas (secuenciación de bisulfito). El Panel 1 se validó empleando una cohorte de 121 muestras de meduloblastoma congeladas en fresco y FFPE. Utilizando el modelo de predicción LDA observamos una concordancia excelente con la afiliación de los subgrupos de meduloblastoma tanto para las muestras congeladas (concordancia al 100%) como para las muestras FFPE (100% de concordancia). Estos resultados demostraron cómo las citosinas seleccionadas son eficaces para establecer los subgrupos moleculares y consiguientemente proporcionan robustez al patrón de metilación del panel de 6 CpGs (Panel 1) como potencial marcador epigenético para la clasificación de meduloblastoma en las entidades moleculares: WNT, SHH, no-WNT/no-SHH.

Posteriormente nos centramos en analizar los perfiles de metilación de los meduloblastomas Grupo 3 y Grupo 4. Para ello, partimos de un análisis de todos los casos Grupo 3 y Grupo 4 incluidos en la cohorte de estudio (n=67). Realizamos un PCA con Kernel = 3 y observamos la formación de tres subgrupos estrechamente relacionados y en parte superpuestos: Grupo 3, Grupo 4 y un grupo intermedio mixto 3-4. En base a estos resultados procedimos a analizar los perfiles de metilación de los tumores claramente definidos como Grupo 3 y Grupo 4 (n=47), excluyendo del análisis el grupo mixto 3-4 (n=18). Realizamos un análisis adaptado en base a la metodología aplicada para obtener el Panel 1 para identificar citosinas cuyas diferencias de metilación pudieran discriminar entre el Grupo 3 y el Grupo 4 e identificamos 8 CpGs que llamamos Panel 2. El Panel 2 fue testado con datos de metilación del ADN de meduloblastomas Grupo 3 y el Grupo 4 obtenidos de *microarrays*, tanto del grupo intermedio mixto 3-4 de la cohorte de estudio (n=18) como de la cohorte independiente de FFPE (n=115). Aplicando el modelo de predicción LDA generado previamente con los datos de metilación de los tumores claramente definidos como Grupo 3 y Grupo 4 (n=47), observamos una muy buena concordancia con la afiliación de los subgrupos de meduloblastoma, clasificando correctamente 17 de las 18 muestras del grupo intermedio mixto 3-4 de la cohorte de estudio (94.4%) y 113 muestras de la cohorte independiente de FFPE (97%).

Asimismo, el Panel 2 fue testado con ADN obtenido a partir de muestras congeladas y FFPE cuyos niveles de metilación se analizaron mediante pirosecuenciación y posteriormente mediante el clasificador LDA calibrado en los meduloblastomas Grupo 3 y Grupo 4 de la cohorte de estudio. De este modo alcanzamos un 95% de concordancia con la clasificación de subgrupos previamente establecidos. Estos hallazgos sugieren que el perfil de metilación de las CpGs seleccionadas del Panel 2 representa un potencial marcador epigenético para la clasificación de los subgrupos tumorales de meduloblastomas Grupo 3 y Grupo 4.

En conjunto, los resultados que hemos obtenidos sugieren que el Panel 1 y Panel 2 pueden representar un método técnicamente simple, rápido, preciso y coste efectivo para clasificar a los pacientes con meduloblastoma, aplicable en la práctica clínica en la mayoría de los centros que tratan a niños con tumores cerebrales.



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. De acuerdo con lo dispuesto en el art. 16.1 del Reglamento de ejecución de la Ley 24/2015 de Patentes, se han asignado a su solicitud un número de expediente y una fecha de recepción de forma automática. La fecha de presentación de la solicitud a la que se refiere el art. 24 de la Ley le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201730701	
Fecha de recepción:	17 May 2017, 10:59 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	236-16	
Solicitante:	HOSPITAL SANT JOAN DE DEU	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	Método de clasificación en subgrupos moleculares de pacientes con meduloblastoma	
Documentos enviados:	Descripcion-1.pdf (56 p.) Reivindicaciones-1.pdf (4 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) Dibujos-1.pdf (18 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.) FEERCPT-2.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (14 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE CARPINTERO LOPEZ MARIO - NIF 00681552Q,OU=500750013,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	17 May 2017, 10:59 (CEST)	
Codificación del envío:	D9:95:C4:2E:9B:92:E6:58:CE:A8:F5:3C:2A:0F:09:0D:41:43:ED:6A	

AVISO IMPORTANTE

Las tasas pagaderas al solicitar y durante la tramitación de una patente o un modelo de utilidad son las que se recogen en el Apartado "Tasas y precios públicos" de la página web de la OEPM (http://www.oepm.es/es/propiedad_industrial/tasas/). Consecuentemente, si recibe una comunicación informándole de la necesidad de hacer un pago por la inscripción de su patente o su modelo de utilidad en un "registro central" o en un "registro de internet" posiblemente se trate de un fraude. La anotación en este tipo de autodenominados "registros" no despliega ningún tipo de eficacia jurídica ni tiene carácter oficial.

En estos casos le aconsejamos que se ponga en contacto con la Oficina Española de Patentes y Marcas en el correo electrónico informacion@oepm.es.

ADVERTENCIA: POR DISPOSICIÓN LEGAL LOS DATOS CONTENIDOS EN ESTA SOLICITUD PODRÁN SER PUBLICADOS EN EL BOLETÍN OFICIAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL E INSCRITOS EN EL REGISTRO DE PATENTES DE LA OEPM, SIENDO AMBAS BASES DE DATOS DE CARÁCTER PÚBLICO Y ACCESIBLES VÍA REDES MUNDIALES DE INFORMÁTICA. Para cualquier aclaración puede contactar con la O.E.P.M.

/Madrid, Oficina Receptora/



(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: EMPRENDEDOR: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO: PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	HOSPITAL SANT JOAN DE DEU <input type="checkbox"/> España ES R5800645C Pº Sant Joan de Déu, 2 ESPLUGUES DE LLOBREGAT 08 Barcelona 08950 España ES <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 100,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA:	LAVARINO Cinzia Emilia Italia IT X3597583S Pº Sant Joan de Déu, 2 ESPLUGUES DE LLOBREGAT 08 Barcelona 08950 España

(6-2) INVENTOR 2:	CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: [] APELLIDOS: GOMEZ GONZALEZ NOMBRE: Soledad NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES NIF/NIE/PASAPORTE: 43160223-X DOMICILIO: Pº Sant Joan de Déu, 2 LOCALIDAD: ESPLUGUES DE LLOBREGAT PROVINCIA: 08 Barcelona CÓDIGO POSTAL: 08950 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:	Método de clasificación en subgrupos moleculares de pacientes con meduloblastoma
(8) NÚMERO DE INFORME TECNOLÓGICO DE PATENTES (ITP):	P
(9) SOLICITA LA INCLUSION EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI [] NO [✓]
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI [] NO [✓]
(11) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ORIGEN BIOLÓGICO:
(12) RECURSO GENÉTICO:	NÚMERO DE REGISTRO: NÚMERO DE CERTIFICADO DE ACCESO AL RECURSO: UTILIZACIÓN DEL RECURSO GENÉTICO: CONOCIMIENTO TRADICIONAL ASOCIADO A UN RECURSO GENÉTICO:
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS [✓]
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	NOMBRE: LUGAR: FECHA:
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:
(16) REMISIÓN A UNA SOLICITUD ANTERIOR:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:

<p>(17) AGENTE DE PROPIEDAD INDUSTRIAL:</p>	<p>APELLIDOS: CARPINTERO LÓPEZ NOMBRE: MARIO CÓDIGO DE AGENTE: 0953/9 NÚMERO DE PODER:</p>
<p>(18) DIRECCIÓN A EFECTOS DE COMUNICACIONES: SOLO EN CASO DE DIRECCIÓN DIFERENTE DE LA INDICADA PARA EL PRIMER SOLICITANTE</p>	<p>DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: MEDIO PREFERENTE DE COMUNICACIÓN</p>
<p>(19) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:</p>	<p>DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 56 REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 18 DIBUJOS: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 7 RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): ARCHIVO DE PRECONVERSION: <input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 JUSTIFICANTE DE PAGO (2): <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 14 ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: <input checked="" type="checkbox"/> OTROS (Aparecerán detallados):</p>
<p>(20) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA REDUCCIÓN DE TASAS PARA EMPRENDEDORES PREVISTA EN EL ART. 186 DE LA LEY 24/2015 DE PATENTES Y, A TAL EFECTO, APORTA LA SIGUIENTE DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p>	<p><input type="checkbox"/></p>
<p>(21) NOTAS:</p>	
<p>(22) FIRMA:</p>	<p>FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: NOMBRE CARPINTERO LOPEZ MARIO - NIF 00681552Q LUGAR DE FIRMA: MADRID FECHA DE FIRMA: 17 Mayo 2017</p>

A clinically applicable method for the molecular classification of patients with medulloblastoma

Gómez S, Garrido A, Garcia L, Lemos I, Suñol M, Morales A, Cruz O, De Torres C, Taylor MD, Kulis M, Martin-Subero JI, Mora J and Lavarino C.

INTRODUCTION

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor of childhood and represents the primary cause of pediatric cancer-related mortality⁷⁸. Over the last decade, integrative genomic studies have radically changed the understanding of the biology underlying medulloblastoma pathogenesis, revealing a considerably more heterogeneous disease than previously thought. These studies have identified four molecular subgroups, named wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), Group 3 and Group 4, with distinctive transcriptional and epigenetic features that proved to be significantly better correlated with prognosis than classic clinical and histopathologic stratification^{93, 96, 99, 100}. WNT subgroup tumors represent approximately 10% of MB patients and occur in older patients (median age, 10 years). These tumors are characterized by the aberrant activation of the WNT signaling pathway and commonly harbor mutations in exon 3 of CTNNB1 (~85% of cases) and monosomy chromosome 6 (80%). Patients with WNT MB have an excellent prognosis with current therapy schemes (5-year event free survival greater than 90%)⁷⁴. The prognosis of SHH-activated MBs (comprise roughly 25% of MBs) is largely dependent on patient's age and the genetic features of the tumor. Infants with SHH MB have favorable prognosis with only chemotherapy, whereas, children with TP53 mutated SHH tumors have poorer outcome, especially if associated with *MYC* and *GLI2* amplification⁷⁴. Patients with Group 3 tumors have the most unfavorable prognosis and more commonly present metastasis at diagnosis (50% of patients), while Group 4 MBs have an intermediate prognosis. Group 3 (25%) and Group 4 (35%) tumors lack driver mutations but are characterized by recurrent, partly overlapping, chromosomal alterations. The presence of metastasis, isochromosome 17q and amplification of *MYC* confer an unfavorable prognostic to Group 3 tumors, whereas the amplification of *MYC* in Group 4 patients is not associated with an unfavorable outcome.

These molecular entities have become increasingly important to refine risk stratification, and will be of significant help to improve treatment for the different risk categories but also to design subgroup-driven clinical trials. The recently reported guidelines for the design of the new generation of clinical trials that guide medulloblastoma recommend tumors to be molecularly classified into the consensus subgroups WNT, SHH and non-WNT/non-SHH, as defined by the revised Classification of Brain Tumours of the World Health Organization^{85, 89}. Group 3 and Group 4 tumors have been provisionally included in a single entity termed non-WNT/non-SHH, because current molecular subgrouping approaches are unable to clearly separate these two entities.

Genome-wide methylation array and/or gene expression profiling are currently considered the gold standard for the classification of MB patients^{85, 99, 100}. These are robust microarray and multigene-based classification methods, even so, the implementation of these approaches in daily diagnostic practice is challenging for the majority of centers treating children with brain tumors.

Given the increasing need to integrate into the clinic the stratification of patients with MB according to the consensus subgroups (WNT, SHH and non-WNT/non-SHH), we have developed a robust and technically simple approach for subgroup classification of MB tumors based on a reduced panel of highly specific epigenetic markers. Similarly, we have developed an epigenetic classifier specific for Group 3 and Group 4 MBs. The characteristics of the epigenetic markers that we have selected enable the analysis of single DNA samples obtained from fresh frozen or formalin-fixed paraffin-embedded biopsies of primary, metastasis or relapse compartments, using diverse molecular techniques that can be implemented in daily diagnostic practice of most centers treating children with brain tumors.

MATERIAL AND METHODS

Patients and samples

For validation purposes we analyzed a cohort of 121 DNA samples from frozen (n=101) and formalin fixed paraffin embedded (FFPE) (n=20) biopsies of MB obtained from the Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona, Spain) and from an independent Institution (Sick Children's Hospital of Toronto, Canada). All these cases were included in recently published genomic studies^{93, 99}. Molecular subgroup affiliation as determined in these genomic studies was available for all MB tumors included in the present study. This study was approved by the Institutional Review Boards. Informed consent was obtained.

DNA methylation microarray data

Microarray datasets included in this study have been previously reported. Normalized data are publicly available at the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) data repository (Supplementary Table 1). In order to enable a robust and comprehensive analysis, only RAW methylation data (two color iDAT files) were included in the study. iDAT files of the abovementioned datasets as well as clinical and biological data, have been kindly provided by research groups of the International Cancer Genome Consortium (ICGC) PedBrain Tumor Research Project, The Canadian Pediatric Cancer Genome Consortium (CPCGC), McGill Integrated Cancer Research Program (Montreal), Dana-Farber Cancer Institute (Boston), Scripps Research Institute (La Jolla) and the Friedman Brain Institute at Mount Sinai Hospital (New York).

Quality Control, Normalization and Filtering

Microarray data raw data (iDAT files) of samples (tumors, normal samples) from the HumanMethylation450 BeadChip were analyzed by minfi package available through Bioconductor²²². In order to exclude technical biases, we used an optimized pipeline with several filters, as previously described^{221, 223}. From the initial dataset of 485,512 sites (excluding probes detecting SNPs), we removed those with poor detection *P*-values ($P > 0.01$) and those with sex-specific DNA methylation (n=6,926). The remaining sites (n=478,129) were used for downstream analyses. Single cytosine methylation values (β -values) in each sample were

calculated as the ratio of the methylated signal intensity to the sum of methylated and unmethylated signals.

Detection of differentially methylated Cytosines

DNA methylation changes were analyzed as previously described^{221, 223}. Standard deviation density plots were used to define the most variable CpGs. Unsupervised analyses were performed by principal component analysis (using only CpG sites with a SD above 0.3), Kernel principal component analysis and hierarchical clustering using the Euclidean metric, as previously described.

Identification of epigenetic biomarkers

For the identification of CpGs with the most significant differences between subgroups, we used the following criteria: a) the minimum absolute difference between DNA methylation values of CpG sites within each subgroup, less than 0.1 standard deviation, b) the maximal bimodal methylation values (almost totally methylated or unmethylated) between subgroups and c) a subgroup-specific methylation profile in contrast with the rest of the MB subgroups, and other tumors and normal tissues.

The misclassification rate for any given combinations of the selected CpGs was assessed using a Linear Discriminant Analysis (LDA) function by MASS package (R software), as previously reported²²⁴. Among the combinations that showed a good performance we selected one with the best compromise between the error rate (0%) and number of variables.

We trained the LDA model using the DNA methylation values of the selected combination of CpGs on the training cohort (n=106 MB cases). By applying this model to the different test cohorts we calculated the misclassification rate of our reduced number of CpGs panels.

R software script for MB molecular subgrouping

The procedure to classify MB samples into the molecular subgroups is based on several simple steps: 1) upload the file containing the DNA methylation values of each of the selected CpGs in the published series of 106 Medulloblastoma cases (training cohort), 2) upload the file

containing the DNA methylation values of the MB cases to be classified (test cohort), 3) run the LDA function to classify the test cases using the training cohort as standard ²²⁴.

Gene expression analysis

The gene expression dataset included in this study have been previously generated by the above mentioned research studies using platform Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array (GSE21140; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE21140>); and included 8 WNT, 23 SHH, 26 Group 3 and 34 Group 4 cases⁹³.

Gene expression data normalization was performed using RMA algorithm included in the oligo R-package (R/Bioconductor) ^{225, 226}. Quality control and filtering was done using oligo and limma R-packages (R/Bioconductor)²²⁷.

Genomic DNA Bisulfite sequencing PCR and pyrosequencing

Genomic DNA was isolated using two different kits depending on samples' nature, Genra Puregene Tissue kit (Qiagen Technologies) for fresh frozen samples and QIAamp DNA FFPE kit (Qiagen Technologies) for FFPE samples. For bisulfite conversion of genomic DNA, we used EpiTect Plus Bisulfite Conversion kit (Qiagen Technologies) following manufactures' protocols.

Bisulfite sequencing PCR and pyrosequencing were performed as previously described ^{221, 228, 229}. DNA sequence analysis was performed using BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) on a ABI Prism 3130XL sequencer (Applied Biosystems), following standard procedures. Primer sequences are available from authors upon request.

Genome-wide analysis of Copy Number Alterations (CNVs) in MB

CNVs were analyzed in Medulloblastoma samples using genome-wide high-density array-based technology that combines CGH and SNP arrays (CytoScan HD Affymetrix). Array hybridization was performed at the Microarray Analysis Service, IMIM (*Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques*, Barcelona, Spain), according to Affymetrix standard protocols. Data was analyzed using the Chromosome Analysis Suite (ChAS) v3.1 software (Affymetrix). Settings for CNV detection were applied following manufactures' protocols.

RESULTS

Identification of a reduced set of epigenetic markers (methylation-signature) for medulloblastoma subgroup prediction

To identify a reduced set of differentially methylated cytosines that could enable the classification of medulloblastoma into the four principal subgroups of the disease, we re-analyzed previously published genome methylation array data (Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array) (Supplementary Table 1). In total, we analyzed the genome methylation profile of 817 specimens including two cohorts of primary MB tumors (n = 275, including n=106 fresh frozen and n=169 FFPE MB samples) as well as frozen samples of diverse non-medulloblastoma tumors (n = 457) and normal human tissues and cells (n = 85). Molecular subgroup affiliation as determined in recently published array studies was available for all the 275 MB tumors included in this study (Supplementary Table 1).

The first cohort (training cohort) comprised 106 fresh-frozen MB tumors, including 18 WNT, 21 SHH, 29 GR3 and 38 GR4, collected within the ICGC PedBrain Tumor Project (GSE54880)¹⁰⁰. Unsupervised hierarchical clustering and Principal Component Analysis using all CpG probes within a standard deviation >0.3 (n = 5,904 most variable CpGs, 1.2%) clearly identified the presence of four subgroups (Supplementary Figure 1A-C). As expected, the WNT and SHH groups were clearly separate and distinct, whereas Group 3 and Group 4 were closely related, consistent with previous reports (Supplementary Figure 1B and 1C)¹⁰⁰. These methylation subgroups closely recapitulated the subgroup classification of matching tumors characterized in a previous study using a larger proportion of CpG probes of the same DNA methylation data set (n=21,092)¹⁰⁰.

We next focused our analysis on reducing the dimension and complexity of our initial set of 5,904 differentially methylated CpG probes in order to identify a more manageable group of cytosines allowing us to classify patients with similar accuracy. We aimed to identify cytosines with a consistent methylation profile within each subgroup (SD<0.1) albeit, clearly divergent from the other subgroups (maximum difference from the mean methylation level of other groups). This approach enabled us to identify CpG probes that accomplished the selection criteria and emerged as a distinctive methylation-signature for the WNT and SHH subgroups. In

contrast, the heterogeneous and overlapping methylation patterns of Group 3 and Group 4 impeded the identification of CpG probes with a consistent methylation profile across each of these entities. Hence for this first part of the study, Group 3 and Group 4 were included within a single group named non-WNT/non-SHH, similar to the revised WHO classification of CNS tumors published in 2016⁸⁹. Despite the heterogeneity, we were able to identify CpG probes with a consistent bimodal methylation profile specific for the non-WNT/non-SHH subgroup. In total we extracted of nine CpGs with a subgroup-specific bimodal methylation pattern (either highly methylated (mean subgroup β -value >0.75) or greatly unmethylated (mean subgroup β -values <0.15)) for WNT, SHH and non-WNT/non-SHH.

Next, we proceeded to calculate the classification capacity of any given combination of the nine selected CpGs using a Linear Discriminant Analysis method. From the resulting combinations of CpGs there were multiple with a very good performance. Among these we selected one with six CpGs for subsequent analyses and subgroup prediction, as we considered that these six had a good compromise between error rate (0%) and number of variables (Table 1, Figure 1A and 1B). The identified cytosines were located in the gene body of LHX6 (cg25xxxxxx), USP40 (cg12xxxxxx), CHTF18 (cg10xxxxxx), KIAA1549 (cg01xxxxxx), 5'-UTR of AKAP6 (cg18xxxxxx) and a long intergenic non-protein coding RNA 2178 (cg02xxxxxx) (Table 1).

PCA analysis of the training cohort (n = 106) using exclusively the selected set of six CpGs (from herein referred to as Panel 1) clearly showed the presence of clusters similar to those obtained using the 5,904 most variable CpGs (SD >0.3) and to the results of previous studies (GSE54880)¹⁰⁰ (Figure 1C). All samples could be assigned to a subgroup with an excellent degree of concordance (100%) with previously assigned methylation subgroup classification (Figure 1D).

The specificity of Panel 1 for medulloblastoma tumors was investigated using diverse publicly available HM450K data sets and was found to be highly specific for WNT, SHH and non-WNT/non-SHH MB tumors, none of the other tumors or normal human tissues and cells that we analyzed showed a similar methylation pattern (Supplementary Figure 2A and 2B).

Recent studies have shown that the HM450K array is suitable for the analysis of DNA from FFPE material. We tested Panel 1 on a DNA methylation data set of 169 FFPE MB samples for

which subgroup affiliation was available (15 WNT, 39 SHH, 42 Group 3 and 73 Group 4) (GSE54880)¹⁰⁰. PCA using FFPE methylation data exclusively of the six CpGs of Panel 1 reproduced clusters equivalent to those obtained with the training cohort. To assess the prediction capacity of the Panel 1, we applied to the FFPE data the LDA-based classifier model previously trained on the training cohort. We were able to predict the WNT, SHH and non-WNT/non-SHH tumor subgroups with a 100% concordance with previously reported subgroup classification data of matching samples. These results provide support for the selected panel of 6 CpG probes (Panel 1) and show that our methylation-signature is independent of the type of material and can thus be applied to DNA methylation data obtained from FFPE MB specimens.

We next sought to validate Panel 1 on fresh frozen and FFPE MB tumors (validation cohort) using bisulfite pyrosequencing and direct bisulfite-sequencing PCR (BSP). We processed a total of 121 samples (101 frozen and 20 FFPE) including 23 WNT, 33 SHH or 65 non-WNT/non-SHH. Molecular subgroup affiliation was available as determined in recently published array studies. By pyrosequencing we observed that all the six CpGs showed a subgroup-specific DNA methylation profile, similar to the microarray data (Figure 2A). The epigenetic classification of the cases in WNT, SHH or non-WNT/non-SHH applying the LDA prediction model showed an excellent match with subgroup affiliation both for frozen (100% concordance) and FFPE (100% concordance) samples. This cohort included a MB tumor associated with the Gorlin Syndrome (germline mutation in the Shh receptor *PTCH*, data not shown), as expected, it was classified as a SHH subgroup tumor by our epigenetic markers (Figure 2B).

A portion of the samples (98 frozen and 20 FFPE) were also analyzed by direct-BSP sequencing. The subgroup-specific profile of the methylation-signature permitted to obtain sequences with peaks that clearly detected the methylated or unmethylated status of each of the CpGs included in Panel 1 (Figure 2C). This enabled a rapid, easy and reliable analysis of the epigenetic marks, permitting to assign accurately the molecular subgroup to each tumor (100% concordance) for both FF as well as FFPE DNA samples using BSP methodology. These results show that our reduced methylation-signature has a good discriminatory capacity that allows for similar performance using fresh frozen and FFPE samples analyzed using diverse molecular methodologies.

Finally, we analyzed the stability of our epigenetic markers over the course of the tumor's clinical evolution by comparing the DNA methylation levels of samples of 3 MB (one Group3, one Group4 and one SHH) patients obtained from primary and/or metastasis at the moment of diagnosis and after treatment or at relapse of disease. In all cases, the methylation profile as for the subgroup affiliation observed at diagnosis was maintained at relapse/progression demonstrating that the epigenetic markers remain stable during the course of the disease and are not influenced by treatment.

Altogether these results provide support for the methylation-signature of Panel 1 as potential epigenetic marker for the classification of patients with MB into the clinically relevant entities: WNT, SHH, non-WNT/non-SHH that can be applied to single fresh frozen or FFPE DNA samples from primary, metastasis or relapse compartments and analyzed using diverse molecular methodologies.

Group 3 and Group 4 specific CpG methylation-signature

We next focused our analysis on the methylation profiles of Group 3 and Group 4 tumors. We proceeded to the unsupervised analysis of the methylation data of Group 3 and Group 4 samples included in the training cohort ($n = 67$) using the most variable CpG sites ($SD > 0.3$; 2,612 CpGs). As expected, PCA analysis at Kernel = 2 ($k = 2$) showed two adjacent subgroups (Figure 3A). We observed similarly to previous reports, that the boundary between these subgroups showed a small fraction of tumors that overlapped between group 3 and group 4 (Figure 3A)⁸⁵. At $k=3$, three subgroups were delineated, Group 3 (22/67, 33%), Group 4 (27/67, 40%) and a third group represented by a mixed Group 3-4 which included 7 Group 3 and 11 Group 4 tumors (18/67, 27%) (Figure 3B). We proceeded to analyze the methylation profiles of the clearly defined Group 3 and Group 4 tumors, excluding the mixed Group 3-4. The objective was to identify for each of these two groups a subset of cytosines with a consistent methylation profile to allow for accurate subgroup classification of these strictly defined Group 3 and Group 4 tumors. By applying our selection criteria ($SD < 0.1$ within each group and the largest delta between the two Groups) and analyzing the classification rate of various combinations of CpGs using the LDA classification method, we were able to selected five differentially methylated CpG

probes that showed a consistently methylated profile for Group 3 and unmethylated for Group 4 (Figure 3C-E). These cytosines were located in intronic regions of RPTOR (cg09xxxxxx and cg08xxxxxx) and RIMS2 genes, as well as the 3'-UTR region of VPS37B (cg13xxxxxx) and an intergenic region in chromosome 13 (cg05xxxxxx) (Table 1).

Similar to Panel 1, the methylation profile of the subset of five CpG probes was found to be highly specific for Group 3 and Group 4 when compared to diverse tumors and normal human tissues as well as in WNT and SHH subgroup MB tumors, thus confirming the specificity of the methylation-signature (Supplementary Figure 3A-C).

We then proceeded to apply the LDA classifier model trained on Group 3 and Group 4 *sensu stricto* tumors to classify the mixed Group 3-4 tumors. We were able to classify all the mixed samples into Group 3 (n=7) or Group 4 (n=11) with an high concordance (17 out of 18) with only one case switched from Group 3 to Group 4, as compared to previous subgroup affiliation data of matching samples (Figure 3C).

The five CpG probes (hereafter referred to as Panel 2) were tested using DNA methylation data of all (n=115) Group 3 (n = 42) and Group 4 tumors (n = 73) included in the HM450K array of FFPE MB samples¹⁰⁰. PCA analysis using Panel 2 CpGs showed two closely related, albeit not overlapping group of samples. By applying the LDA classifier model we were able to classify all samples and assign the correct subgroup to 113 samples (97% concordance) (Figure 3F); three cases were found to be switched groups Group 3 to Group 4 tumors as compared to previous subgroup affiliation data of matching samples¹⁰⁰. These three tumors showed an intermediate methylation profiles, characteristic of the mixed Group 3-4 tumors.

We proceeded to validate the Panel 2 on frozen (n= 49) and FFPE (n=7) samples using cases classified as non-WNT/non-SHH by the Panel 1. By applying bisulfite pyrosequencing analysis and LDA prediction model to this validation cohort, we classified 30 cases as Group 3 and 26 cases as Group 4 with a good concordance (95%) with previous subgroup classification data. Three DNAs from frozen samples previously affiliated to the Group 3 were classified as Group 4 by Panel 2. Two of these had sufficient adequate DNA for further analysis of *MYC* and copy number alteration analysis.

Taken together, we have identified a reduced methylation-signature of five CpGs that permits an accurate classification of strictly defined Group 3 and Group 4 MB tumors, and has shown a good discriminatory capacity that allows for assignment of a large proportion of intermediate Group 3 and Group 4 tumors.

Panel 1 and Panel 2 methylation signatures affect inter- and intragenic CpG sites

Methylation changes described for Panel 1 and Panel 2 affected CpG sites not only at promoters but also intragenic as well as intergenic regions (Table 1). Panel 1 included cytosines located in the gene body (intron/exon) of LHX6 (cg25xxxxxx), USP40 (cg12xxxxxx), CHTF18 (cg10xxxxxx), KIAA1549 (cg01xxxxxx), 5'-UTR of AKAP6 (cg18xxxxxx) and in a LINC02178 (cg02xxxxxx), whereas, Panel 2 CpGs were in intronic regions of RPTOR (cg09xxxxxx and cg08xxxxxx) and RIMS2 (cg12xxxxxx), the 3'-UTR region of VPS37B (cg13xxxxxx) and an intergenic region in chromosome 13 (cg05xxxxxx).

When associated with CpG islands, methylation variations occurred at bivalent regulatory states (EnhBiv) and enhancer states (Enh), as for the LHX6 gene found to be hypermethylated in the WNT subgroup and the RIMS2 gene highly methylated in Group 3 tumors. However, the majority of the DNA methylation changes were located outside CpG islands (Table 1) and affected mainly enhancer sites (Enh, EnhBiv) and actively transcribed states (Tx). We also investigated the impact of these methylation changes on gene expression using matching gene expression data (GSE21140). In general, DNA methylation changes were not found to be associated with significant variations of the expression of targeted genes, suggesting that there is no direct correlation between DNA methylation and gene expression, as previously reported^{223, 230}.

We next studied potential mechanisms underlying the detected CpG methylation variations. CpG methylation targeted highly conserved, DNase I hypersensitive DNA regions, associated with binding sites of transcription factors such as EZH2, SUZ12, RBBP5, CTCF, E2F6 and TCF7L2 greatly involved in repression of transcription, as well as the polymerase subunit POLR2A, essential for polymerase activity. We analyzed the expression levels of these

transcription factors and observed an inverse correlation between lower expression of EZH2, RBBP5 and SUZ12, and high CpG methylation levels in the WNT subgroup of the CpG cg25xxxxxx located in an intronic CGI of the LHX6 gene (Table 1). Interestingly, all the CpG sites flanking this CpG (cg25xxxxxx) showed consistent hypermethylation in the entire WNT subgroup (100% of cases) as compared with the other subgroups fully unmethylated. We explored the methylation levels of this CGI in normal tissue (fetal brain, cerebellum, neurons, glial cells, ESCs, NP_IPSC) and found them to be consistently low, similar to SHH and non-WNT/non-SHH tumors. At a functional level, this CGI has been reported to be associated with bivalent regulatory states (defined by the presence of H3K27m3 and H3K4m1) such as poised promoters or weak enhancers. In our set of the 5,904 most variable CpGs (SD >0.3), we observed a significant (P-value<0.01) representation (47 of 387 CpGs) of methylation changes affecting several members of the LIM homeodomain (LHX) family genes (LHX1, LHX2, LHX4, LHX5, LHX6, LHX8 and LHX9) (data not shown). These methylation changes affected principally CGI associated with poised promoter and enhancer regions, and showed a subgroup-specific methylation pattern, especially for WNT and SHH (LHX1, LHX2, LHX5 and LHX6 highly methylated in WNT, and LHX4 methylated in SHH and hypomethylated in WNT), as compared to Group 3 and Group 4 tumors.

Similarly, we explored the CGI located at the RIMS2 gene promoter region and found it highly methylated in Group 3 tumors as compared with Group 4 tumors, intermediate mixed Group 3-4 showed variable levels. This CGI was associated with binding sites of transcription factors such as CTCF, POLR2A, MYC, TAF1, RAD1 and TBP, however, only MYC showed significantly higher expression in Group 3 with respect to Group 4 MBs. This region was related with H3K4m3, a chromatin mark associated with active (weak) promoters. Similarly, methylation changes observed in RPTOR affected a group of intronic CpG probes related with active promoter/enhancer regions (H3K27ac and H3K4me1 histones marks).

Taken together, the identified DNA methylation changes affect mostly non-promoter regions with chromatin features that suggest the potential involvement of active regions such as enhancers.

DISCUSSION

In this study, we have developed a clinically applicable approach for the classification of the consensus MB subgroups (WNT, SHH and non-WNT/non-SHH) based on a reduced set of six epigenetic biomarkers. This epigenetic classifier, named Panel 1, is characterized by a bimodal subgroup-specific methylation pattern that allows for accurate and rapid classification of single DNA samples from frozen and FFPE MB tissue samples using molecular approaches that can be implemented in the daily diagnostic practice in most laboratories.

To develop the epigenetic classifier, we used cohorts of MB samples that have been characterized in previous studies using robust microarray and multigene-based classification methods^{93, 96, 99, 100}. This allowed for a direct comparison between the subgroup classifications of the different methods. Our epigenetic classifier (Panel 1) recapitulated with an excellent match (100% concordance) the subgroup classifications of the genome-wide DNA methylation microarray and gene-signature profiling methods, currently considered the gold standard for the classification of MB patients.

The establishment of the molecular subgroup has become of critical importance for the inclusion/exclusion criteria of many clinical trials. This needs for reliable classification approaches that can be reproducibly applied to the different types of material available in the clinical setting (small biopsies, frozen or FFPE, from primary tumor, metastasis or relapse compartment). We observed that the methylation profile of our epigenetic markers remained stable in metastasis as in the primary tumor, and at recurrence as at diagnosis, indicating a strong degree of stability of the subgroup classification of the Panel 1. These observations are consistent with previous studies that showed the maintenance of subgroup affiliation at recurrence and metastasis, demonstrating that MB subgroups remain stable and are not affected by treatment.

The design of subgroup-driven clinical trials is critical to improve treatment adjusted to more accurate risk categories. For example, patients with WNT tumors generally have excellent prognosis, ongoing trials (e.g. European SIOP PNET5 medulloblastoma trial) are aimed at testing the benefit of a reduction of therapy to limit neurotoxicities or other adverse side-effects. In contrast, Group 3 patients may benefit from escalation of up-front therapy. Ongoing trials are

focused on new therapies that target subgroup-specific genetic alterations such as SMO inhibitors for SHH-driven MB tumors.

The recently reported guidelines for the design of the new generation of clinical trials have provisionally included Group 3 and Group 4 tumors in a single entity termed non-WNT/non-SHH, because current molecular subgrouping approaches are unable to clearly separate these two entities^{85, 89}. In this study, we have developed an epigenetic classifier (Panel 2) specific for Group 3 and Group 4 tumors based on five CpGs markers. Group 3 and Group 4 MBs are more heterogeneous and closely related than WNT and SHH MBs, and comprise a small set (<10%) of tumors exhibiting intermediate methylation profiles, with overlapping genetic and epigenetic features of either subgroup⁸⁵. Similar to previous microarray and multi-gene based classification strategies, our subgroup-specific methylation pattern showed a high classification capacity that enabled accurate classification of all clearly defined Group 3 and Group 4 MBs, but showed a more limited discrimination capacity for cases with an intermediate methylation pattern (misclassified samples <5%) that was difficult to affiliate to either of the two subgroups. Nevertheless, Panel 2 showed the capacity to reliably classify more than 90% of all Group 3 and Group 4 patients. The genetics and biology underlying Group 3 and Group 4 subtypes is still greatly unknown. These tumors lack recurrent mutations but show common chromosomal alterations such as isochromosome 17q. Candidate genetic targets have yet to be identified for potential subgroup-specific therapies. Further investigation is desperately needed to better understand the molecular basis underlying the pathogenesis of these tumors. In this context, Panel 2 represents a rapid and reproducible approach that allows for Group 3 and Group 4 classification using DNA from frozen or FFPE samples that may prove to be useful for research purposes.

The varying methylation levels of Panel 1 and Panel 2 CpGs were not translated into gene expression changes, suggesting that they may not have functional impact but could represent a stable molecular mark of the cellular origin of each subgroup. However, these methylation changes targeted CpG sites associated with Polycomb repressed and enhancer chromatin states located largely at gene body regions of LHX6, CHTF18, USP40, RPTOR and RIMS2. DNA methylation within the gene body may be involved in the regulation of multiple processes, such as transcript elongation, expression of coding and non-coding transcripts, alternative

splicing and enhancer activation¹³². Interestingly, we have reported previously that intragenic regions are often associated with diagnosis, prognosis and treatment response^{221, 224}. In the present study we identified an intronic CGI in the LIM-homeobox family gene LHX6 highly methylated in all the WNT tumors that we analyzed. This methylation pattern was not observed in the other subgroups of MB or normal tissues, and represents thus a subgroup-specific alteration that affects universally the WNT subgroup, the first described. LHX6 is a neurogenesis-related transcription factor that plays a critical role in fate determination of GABAergic interneuron progenitors and is regulated by transcription factors such as sonic hedgehog, fibroblast growth factors and the Wnt/ β -catenin pathway^{231, 232}. LHX6 has been reported as a tumor suppressor found to be hypermethylated in diverse cancers (breast, ovary and lung cancer, among others)²³²⁻²³⁴. Among the 5,904 most variable CpGs identified in this study, we observed a high representation of methylation changes at intronic CGI of LHX family genes affecting poised promoter regions. LHX genes have been found to be highly methylated in various cancers, suggesting a potential role of LIM proteins in the pathogenesis of MB. These findings warrant further investigation.

In conclusion, we have developed a simplified and reproducible approach to classify medulloblastoma tumors into clinically relevant subgroups applying epigenetic markers. Using this strategy, MB patients can be accurately classified into the three consensus subgroups WNT, SHH and non-WNT/non-SHH^{85, 89}. In addition, we propose a similar approach for the specific classification of Group 3 and Group 4 MB tumors. The proposed strategies allows for classification of single DNA samples from biopsies both frozen as well as FFPE of primary, metastasis or relapse compartments, using diverse molecular approaches. Our results show that the proposed strategy is robust, accurate, and cost-effective, making it adequate for molecular subgrouping of MB in daily diagnostic practice of most centers treating children with brain tumors.

Figures

Figure1

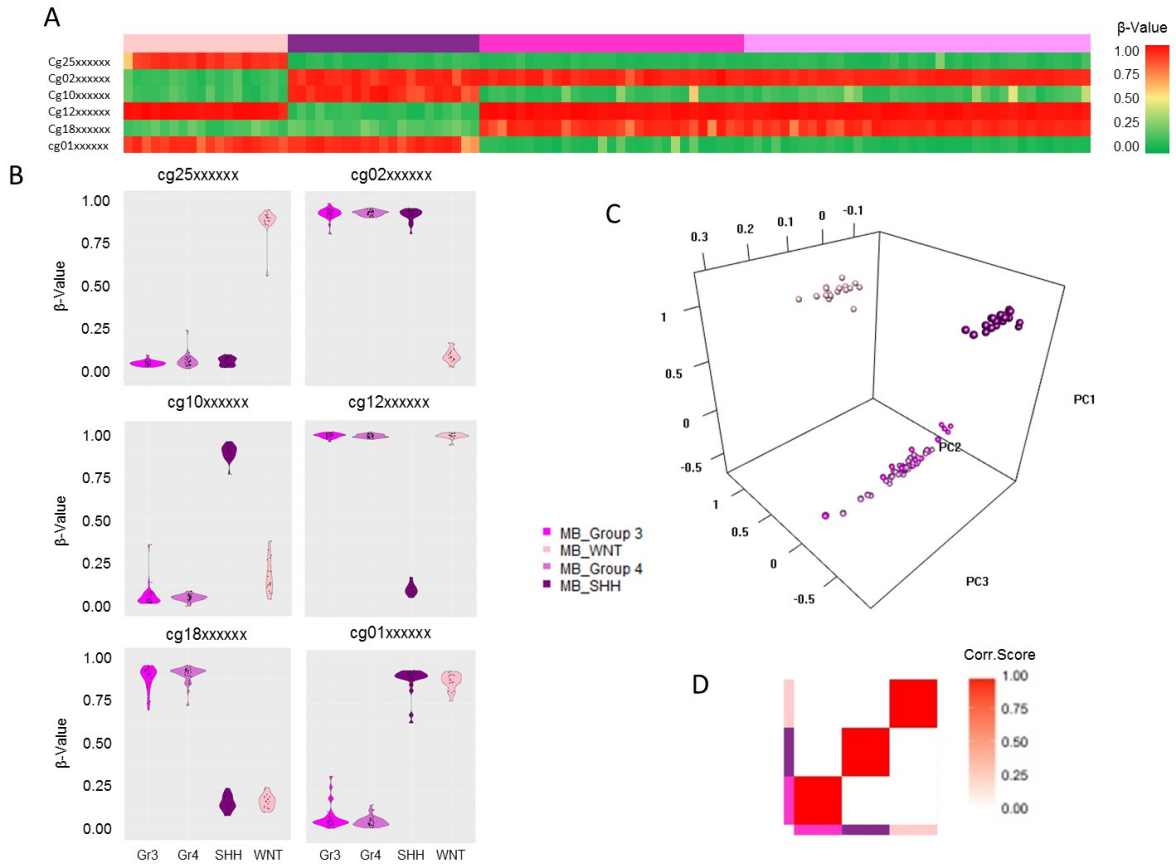


Figure 1: Panel 1. A) Heatmap of 6 CpG of Panel 1 in the training cohort (n=106). B) Violin plots of the 6 differentially methylated CpG probes of Panel 1. C) PCA analysis of the training cohort samples of the 6 differentially methylated CpG probes identified. D) Correlation plot between previously reported medulloblastoma subgroup classification (X-axis) and molecular subgroup classification assessed by Panel 1 microarray data (Y-axis).

Figure 2

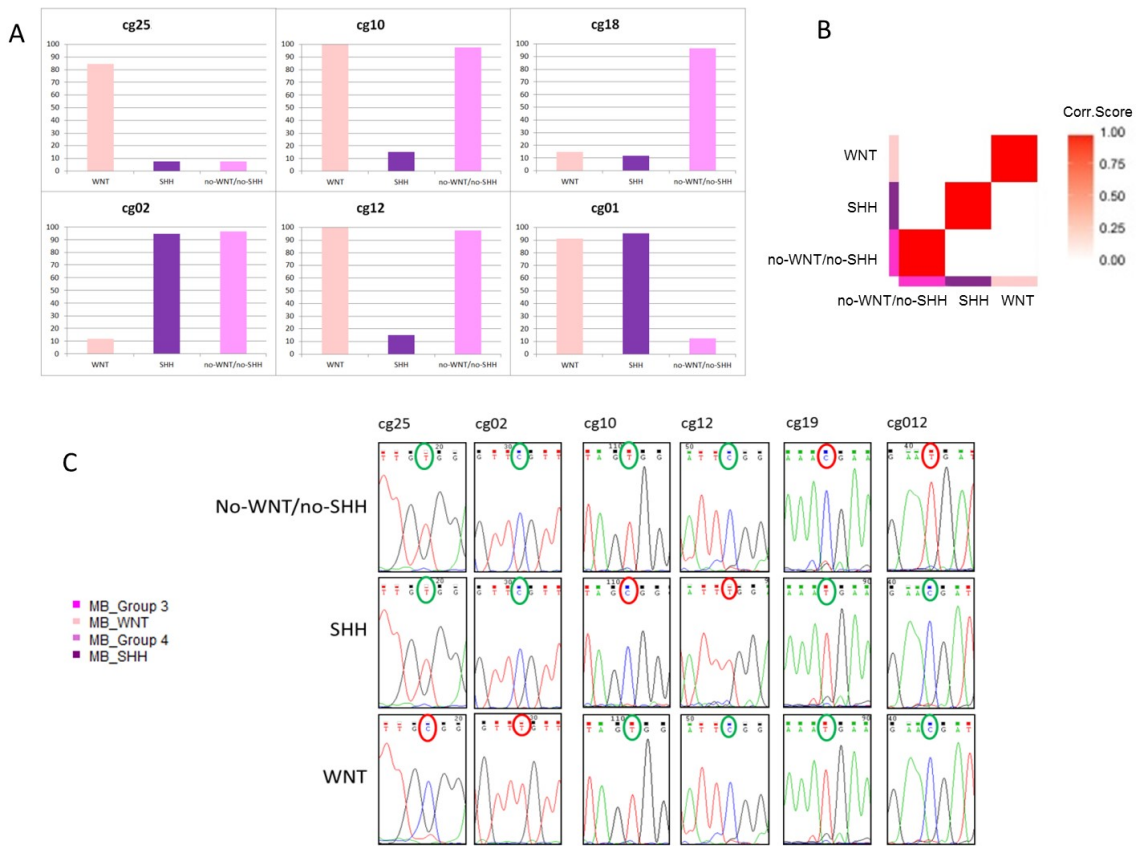


Figure 2: Validation of Panel 1 by A) pyrosequencing. B) Correlation plot between previously reported medulloblastoma subgroup classification (X-axis) and molecular subgroup classification assessed by Panel 1 pyrosequencing (Y-axis). C) Representative results of Panel 1 analysed by direct bisulfite-sequencing PCR.

Figure 3

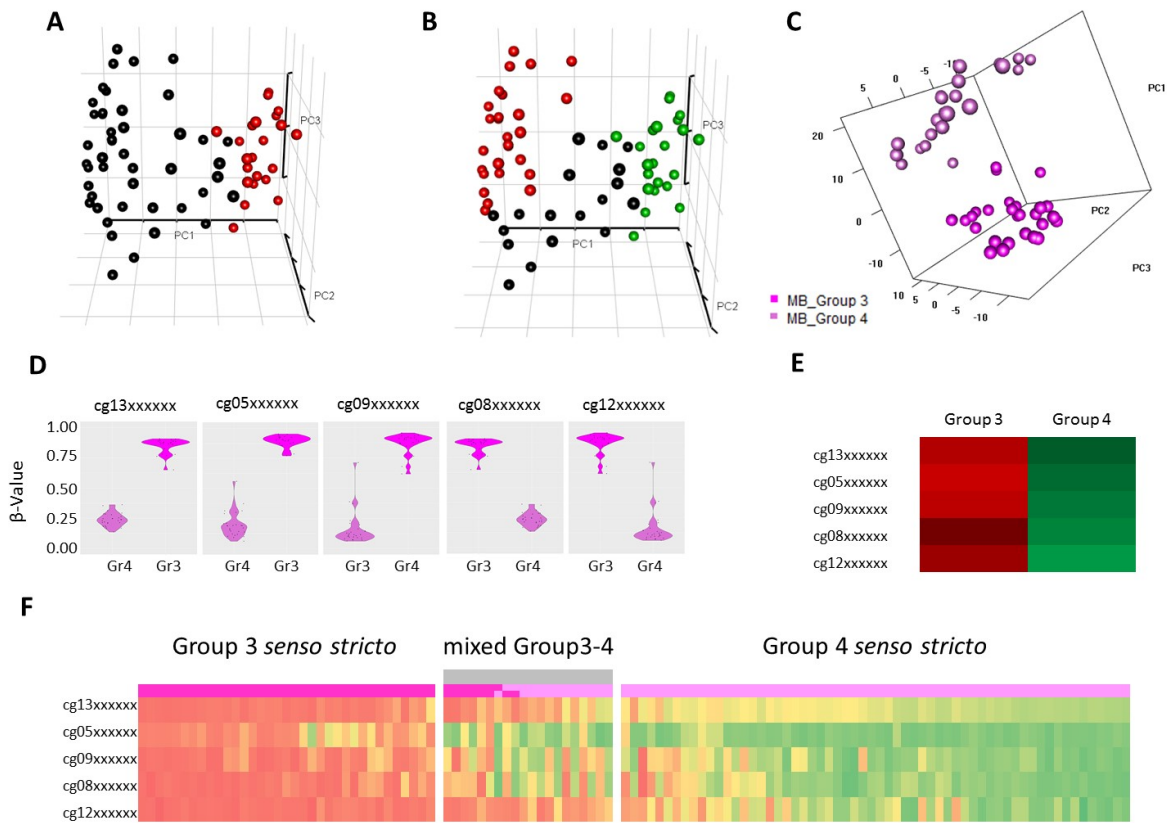


Figure 3: Group 3 and Group 4 specific CpG methylation-signature. PCA analysis at Kernel in the training cohort (n = 67) A) K=2 and B) K=3. C) PCA analysis of the clearly defined Group 3 and Group 4 tumors (n=49) of the five differentially methylated CpG probes identified. D) Violin plots of the five differentially methylated CpG probes of Panel 2. E) Heatmap of the mean β -value of samples Group 3 and Group 4 of the training cohort. F) β -value heatmap of samples Group 3 and Group 4 of the training cohort (n = 67).

Tables

Table 1

Characteristic Panel 1	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6
TargetID-Illumina array	cg25xxxxxx	cg02xxxxxx	cg10xxxxxx	cg12xxxxxx	cg18xxxxxx	cg01xxxxxx
Gene name	LHX6	-	CHTF18	USP40	AKAP6	KIAA1549
Gene-related Region	Intron	Intergenic	Intron	Intron	5prime_UTR	Exon
Chromosome	9	16	16	2	14	7
Location (hg19)	Island	Outside CGI	Shore	Shore	Out_CGI	Outside CGI
CpG Island	Enhancer; Bivalent	Enhancer Bivalent	Quiescent	Enhancer	Enhancer	Enhancer
Regulatory Function (E81)	EZH2; RBBP5; SUZ12	-	-	POLR2A	RAD21	-
Transcription Factor Binding Sites						
<i>Median of DNA methylation levels (min-max)^o</i>						
WNT	Methylated 0.88 (0.57-0.94)	Unmethylated 0.12 (0.06-0.19)	Unmethylated 0.13 (0.06-0.2)	Methylated 0.96 (0.13-0.05)	Unmethylated 0.17 (0.05-0.12)	Methylated 0.87 (0.12-0.05)
SHH	Unmethylated 0.09 (0.05-0.13)	Methylated 0.91 (0.81-0.95)	Methylated 0.9 (0.8-0.97)	Unmethylated 0.11 (0.06-0.17)	Unmethylated 0.16 (0.11-0.25)	Methylated 0.88 (0.64-0.94)
Group3	Unmethylated 0.08 (0.05-0.12)	Methylated 0.92 (0.8-0.98)	Unmethylated 0.12 (0.06-0.57)	Methylated 0.97 (0.93-0.99)	Methylated 0.88 (0.69-0.95)	Unmethylated 0.10 (0.03-0.33)
Group4	Unmethylated 0.09 (0.05-0.26)	Methylated 0.92 (0.9-0.95)	Unmethylated 0.16 (0.07-0.46)	Methylated 0.96 (0.94-0.98)	Methylated 0.90 (0.72-0.95)	Unmethylated 0.07 (0.04-0.17)
Abbreviations: WNT, wingless; SHH, sonic hedgehog; ^o DNA methylation levels range from 0 for unmethylated to 1 for completely methylated.						
Characteristic Panel 2	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6
TargetID-Illumina array	cg13xxxxxx	cg05xxxxxx	cg09xxxxxx	cg08xxxxxx	cg12xxxxxx	
Gene name	VPS37B	-	RPTOR	RPTOR	RIMS2	
Gene-related Region	3prime_UTR	Intergenic	Intron_1	Intron_1	Intron	
Chromosome	12	12	17	17	8	
Location (hg19)	Shore	Out_CGI	Out_CGI	Out_CGI	Island	
CpG Island	Weak Transcription	Quiescent	Quiescent	Quiescent	Enhancer	
Regulatory Function (E81)	POLR2A	E2F6; SP1	POLR2A	POLR2A	CTCF	
Transcription Factor Binding Sites (161 ENCODE)						
<i>Median of DNA methylation levels (min-max)^o</i>						
Group3	Methylated 0.85 (0.65-0.91)	Methylated 0.89 (0.77-0.95)	Methylated 0.87 (0.62-0.96)	Methylated 0.73 (0.41-0.88)	Methylated 0.81 (0.24-0.95)	
Group4	Unmethylated 0.24 (0.14-0.36)	Unmethylated 0.20 (0.06-0.56)	Unmethylated 0.16 (0.06-0.71)	Unmethylated 0.13 (0.05-0.44)	Unmethylated 0.06 (0.04-0.1)	
Abbreviations: WNT, wingless; SHH, sonic hedgehog; ^o DNA methylation levels range from 0 for unmethylated to 1 for completely methylated.						

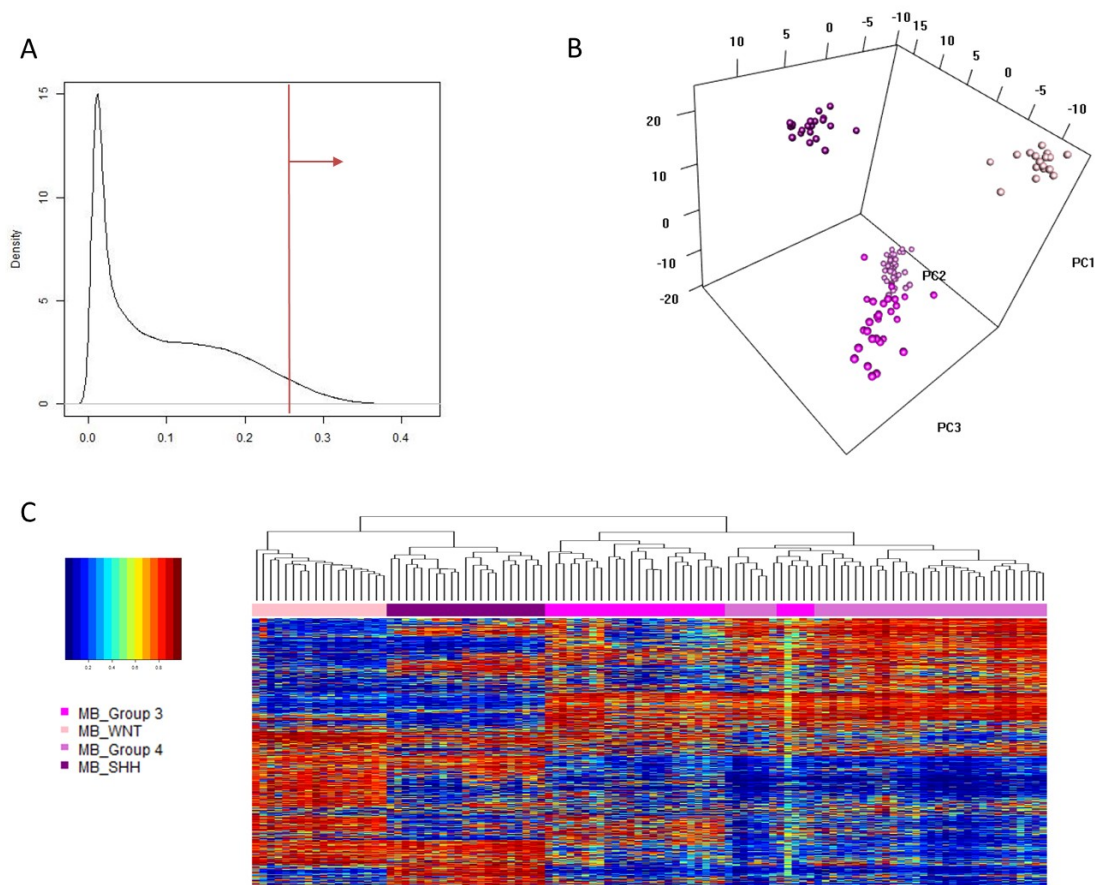
Supporting Information to:

A clinically applicable method for the molecular classification of patients with medulloblastoma

Gómez S, Garrido A, Garcia L, Lemos I, Suñol M, Morales A, Cruz O, De Torres C, Taylor MD, Kulis M, Martin-Subero JI, Mora J and Lavarino C.

Supplementary Figures

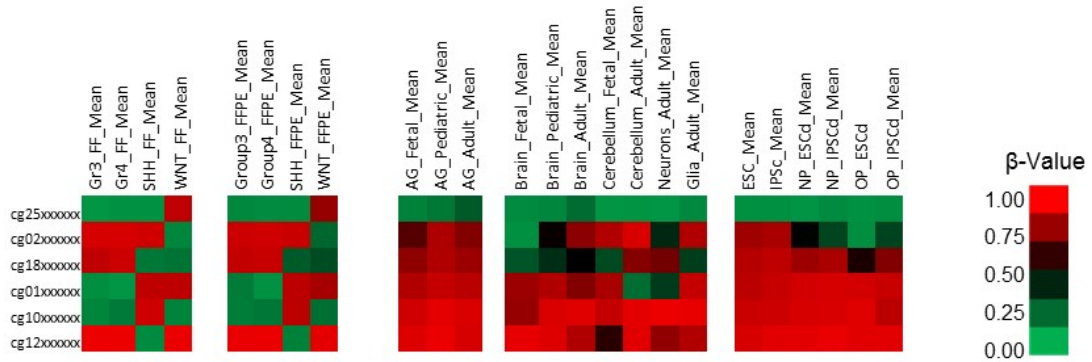
Supplementary Figure 1



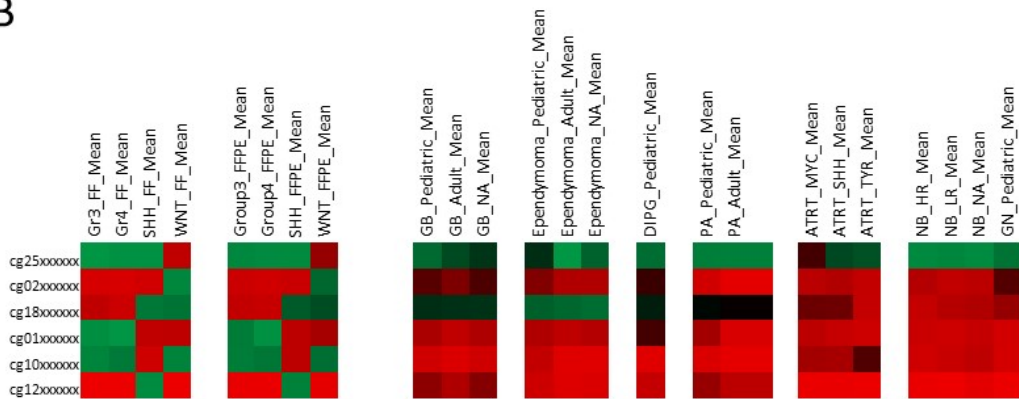
Supplementary Figure 1: Standard deviation density plot of samples included in the training cohort (n=109). Unsupervised analysis of most variable CpGs, above a standard deviation >0.3 (n = 5,904 CpGs) in the training cohort, B) PCA analysis and C) Hierarchical clustering analysis.

Supplementary Figure 2

A



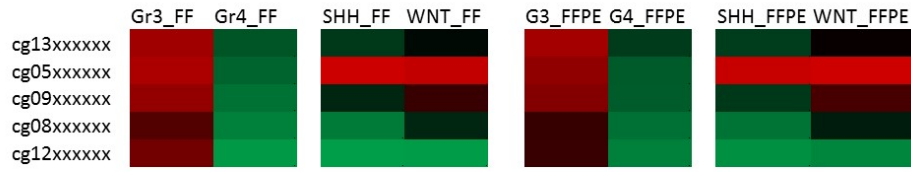
B



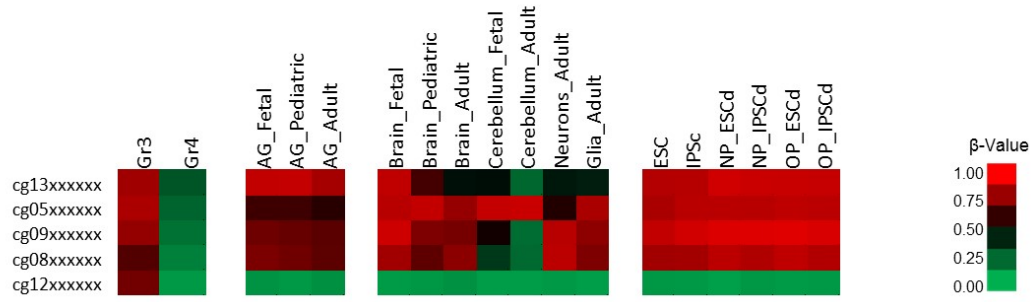
Supplementary Figure 2: Specificity of Panel 1 for medulloblastoma tumors as compared to A) normal samples and B) tumoral samples. Gr3: Group 3. Gr4: Group 4. AG: Adrenal gland. ESC: Embryonic stem cells. IPSc: Induced pluripotent stem cells. NP: Neuronal precursor. OP: Oligodendrocyte progenitor. GB: Glioblastoma. PA: Pilocytic astrocytomas. ATRT: Atypical teratoid rhabdoid tumor. NB: Neuroblastoma. GN: Ganglioneuroma.

Supplementary Figure 3

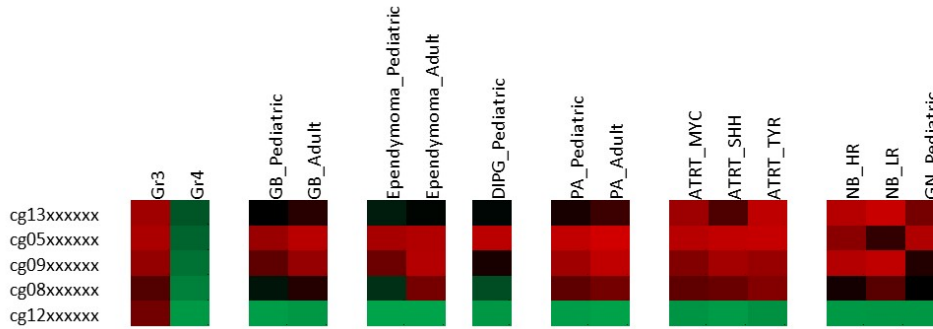
A



B



C



Supplementary Figure 3: Specificity of Panel 2 for Group 3 and Group 4 medulloblastoma tumors as compared to A) WNT and SHH medulloblastoma tumors ,B) normal samples and C) tumoral samples. Gr3: Group 3. Gr4: Group 4. AG: Adrenal gland. ESC: Embryonic stem cells. IPSc: Induced pluripotent stem cells. NP: Neuronal precursor. OP: Oligodendrocyte progenitor. GB: Glioblastoma. PA: Pilocytic astrocytomas. ATRT: Atypical teratoid rhabdoid tumor. NB: Neuroblastoma. GN: Ganglioneuroma.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1A

GEO ID	Title	Fresh Frozen Samples included in the study	Complete Cohort	Link	WNT	SHH	Group 3	Group 4
GSE54880	<i>Microarray-based DNA methylation profiling of medulloblastoma and normal cerebellum samples</i>	106	285	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54880	18	21	29	38
GSE54880	<i>Microarray-based DNA methylation profiling of medulloblastoma and normal cerebellum samples</i>	169	285	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54880	15	39	42	73

Supplementary Table 1B

GEO ID	Title	Fresh Frozen Samples included in the study	Complete Cohort	Link
GSE30654	<i>Recurrent Variations in DNA Methylation in Human Pluripotent Stem Cells and their Differentiated Derivatives</i>	40	675	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30654
GSE36278	<i>Methylation data from glioblastoma tumor samples</i>	126	142	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE36278
GSE44684	<i>DNA methylation data from pilocytic astrocytoma tumor samples and normal cerebellum controls</i>	54	67	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44684
GSE45353	<i>Epigenomic Alterations Define Lethal CIMP-positive Ependymomas of Infancy</i>	48	48	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE45353
GSE50022	<i>Illumina Infinium 450K array data for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma</i>	24	28	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50022
GSE50798	<i>Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites</i>	24	24	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50798
GSE54719	<i>DNA methylation changes at CpG and non-CpG sites are associated with development and clinical behavior in neuroblastoma</i>	41	41	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54719
GSE54880	<i>Microarray-based DNA methylation profiling of medulloblastoma and normal cerebellum samples</i>	8	284	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54880
GSE55712	<i>Genome wide methylation profiling of pediatric glioblastomas</i>	98	98	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE55712
GSE65306	<i>Comprehensive genomic analysis of relapse neuroblastoma</i>	14	32	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE65306
GSE70460	<i>The genomic and epigenomic landscape of atypical teratoid rhabdoid tumors</i>	58	150	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70460
GSE70737	<i>An integrative analysis of reprogramming in human isogenic system identified a clone selection criterion</i>	7	24	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70737

Discusión

EL PATRÓN DE METILACIÓN ESPECÍFICO DEL NEUROBLASTOMA REVELA NUEVOS CONOCIMIENTOS BIOLÓGICOS Y CLÍNICOS

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en los primeros años de vida^{7, 19}. Clínicamente el neuroblastoma se caracteriza por una marcada heterogeneidad genética y biológica que se manifiesta en una evolución clínica variable, mostrando en ocasiones una proliferación agresiva y resistente al tratamiento, y en otras una regresión o maduración espontánea⁷. La edad del paciente al diagnóstico junto con la extensión de la enfermedad, las características histológicas y las alteraciones genéticas específicas (aberraciones cromosómicas, amplificación del oncogén *MYCN* y alteraciones de la ploidía), influyen significativamente y son predictivas de su comportamiento clínico. Sin embargo, la etiología del neuroblastoma sigue siendo desconocida y los índices de supervivencia en pacientes de alto riesgo clínico siguen siendo menores del 40%⁶.

Evidencias recientes han mostrado que los tumores sólidos pediátricos, incluido el neuroblastoma, albergan una baja cantidad de mutaciones genéticas recurrentes, pero contrariamente presentan una proporción significativa de alteraciones recurrentes en los mecanismos epigenéticos^{68-70, 73}. La metilación del ADN en citosinas es un mecanismo epigenético de regulación génica implicado en procesos celulares fundamentales en el desarrollo embrionario de los mamíferos²³⁵. Durante el desarrollo, el metiloma sufre modificaciones que son cruciales para la determinación del linaje celular y la diferenciación²³⁵. En cáncer, diversos estudios genómicos han descrito una extensa alteración de los patrones de metilación del ADN basados en una hipometilación global y una hipermetilación específica^{118, 150-154}. El neuroblastoma es un tumor del desarrollo que se origina de células precursoras comprometidas en la formación del sistema nervioso simpático¹⁵. Estas evidencias sugieren que las alteraciones en la metilación del ADN pueden contribuir de manera significativa a la patogénesis del neuroblastoma y, potencialmente, a otros tumores embrionarios^{68-70, 73}.

Durante los últimos años nuestro grupo ha desarrollado una línea de investigación enfocada en el estudio de las distintas alteraciones (epi)genéticas que puedan estar subyacentes al comportamiento clínico-patológico del neuroblastoma y, un tumor del desarrollo prototípico potencialmente, a otros tumores embrionarios. Para ello hemos realizado diversos estudios genómicos aplicando tecnología de microarray. Esta aproximación nos ha otorgado la posibilidad de analizar de forma global el genoma del neuroblastoma y de describir el primer estudio completo del metiloma del neuroblastoma.

Históricamente los cambios de metilación del ADN en cáncer se han descrito en relación a Islas CpG y a regiones promotoras¹³⁷. En neuroblastoma la mayoría de estudios que han analizado la metilación del ADN han centrado el análisis mayoritariamente en islas CpG en los promotores de genes^{160, 236-244}. En nuestros estudios además de analizar las regiones tradicionalmente descritas, mediante tecnología de *microarrays* hemos podido analizar los cambios de metilación del ADN en gran parte del genoma del neuroblastoma. De esta manera pudimos realizar nuevos hallazgos los cuales revelaron que los cambios de metilación del ADN en neuroblastoma afectan no solo a promotores sino, en mayor medida, a regiones intergénicas y en el cuerpo del gen y estos se encuentran significativamente asociados al comportamiento clínico del neuroblastoma. Esto sugiere que los cambios de metilación del ADN en neuroblastoma subyacen a los distintos subtipos de la enfermedad y que estos cambios epigenéticos pueden tener implicaciones funcionales y clínicas en la patogénesis de este tumor pediátrico.

El patrón específico de metilación del ADN en neuroblastoma se encontraba caracterizado por una extensa hipometilación global y una hipermetilación local, tal y como se ha descrito previamente en cáncer. Observamos que los cambios de metilación del ADN en neuroblastoma afectaban mayoritariamente a regiones fuera del promotor, en parte están asociados a

dominios no funcionales de la cromatina, como las regiones de heterocromatina (H3K9me3), y en parte a dominios funcionales relacionados con la regulación génica como los *enhancers* (H3K27me3, H3K4me1), lo cual indica que la metilación fuera de regiones promotoras podía estar jugando un papel importante^{129, 132}. Además, encontramos regiones de promotores bivalentes (H3K4me4 y H3K27me3) y regiones reprimidas por Polycomb (H3K27me3) recurrentemente afectadas por los cambios de metilación, lo que sugiere un control estricto de la expresión de genes del desarrollo y, por ende, de las vías de diferenciación en neuroblastoma.

Uno de los resultados más relevantes de estos estudios es la detección, por primera vez en neuroblastoma, de metilación en sitios no-CpG (CHG y CHH, donde H = A, T o C). La presencia de metilación en sitios no-CpG ha sido recientemente descrita de forma abundante y no aleatoriamente distribuida en genomas de células madre embrionarias humanas (hESCs) y en tejidos derivados de ectodermo (cerebelo, corteza cerebral y bulbo olfatorio), lo cual sugiere que este tipo de metilación podría ser una marca epigenética específica de tipo celular^{112, 116, 143, 146, 245}. En estos estudios se observó que los niveles de metilación en sitios no-CpG de las hESCs eran muy elevados y prácticamente indetectables en córtex fetal, momento en el cual sufre una extensa reconfiguración^{116, 149}. Sin embargo, la presencia de metilación no-CpG en neuronas aumenta dramáticamente en los primeros años de vida postnatal y se estabiliza cuando el córtex frontal alcanza la madurez. El incremento de este tipo de metilación y su acumulación en neuronas coincide con el desarrollo e incremento de la densidad de sinapsis (sinaptogénesis) (de 0 a 5 años, con un fuerte incremento hasta los 2 años) y la posterior poda sináptica (desde los 5 años hasta la adolescencia). A partir de este momento se acumula de forma gradual para convertirse en la principal forma de metilación en neuronas adultas^{112, 116, 149}. La metilación en sitios no-CpG está bien conservada en el genoma neuronal. La metilación en sitios no-CpG en las hESCs es distinta que en neuronas en términos de localización, especificidad de secuencia y asociación con transcripción. Según publicaciones previas, las hESCs se hayan frecuentemente metiladas en contexto no-CpG de forma específica en la secuencia CAG y moderadamente asociada a la expresión génica. Mientras, en neuronas la secuencia más frecuentemente metilada es CAC y esta se encuentra asociada a represión de la transcripción. Estas evidencias indican que la metilación en no-CpG puede tener diversas funciones¹⁴⁸.

De forma consistente a las publicaciones previas, en nuestro estudio observamos una extensa metilación en no-CpGs en hESCs y niveles muy bajos en córtex fetal. En neuroblastoma observamos que la presencia de metilación en sitios no-CpG se encontraba asociada a los neuroblastomas clínicamente favorables e histológicamente más diferenciados, en localizaciones intergénicas e intragénicas, de forma específica en intrones, fuera de regiones promotoras. Esta metilación afectaba, en gran medida, a genes relacionados con la diferenciación celular y el desarrollo embrionario tales como *ALK*. El gen *ALK* se expresa de forma predominante en el sistema nervioso central y su expresión declina después del nacimiento⁵⁸. Recientemente se ha identificado una sobreexpresión de *ALK* asociada a los neuroblastomas de alto riesgo clínico, lo cual sugiere un rol oncogénico de *ALK* en la patogénesis del neuroblastoma^{58, 69, 246-249}. Aunque las mutaciones puntuales de *ALK* son una de las alteraciones asociadas a predisposición genética del neuroblastoma, las alteraciones ya sea por mutaciones activadoras (3-11%) o por amplificaciones en el gen (3-4%) se han reportado en un número limitado de neuroblastomas^{69, 247, 250}. Sin embargo, los mecanismos por los cuales *ALK* se encuentra sobreexpresado en los tumores clínicamente desfavorables no han sido plenamente elucidados. En nuestra cohorte, observamos que la metilación en contexto no-CpG en *ALK* se asociaba a los tumores clínicamente favorables y a bajos niveles de expresión, mientras que en los tumores clínicamente desfavorables los niveles de metilación eran prácticamente nulos. La metilación diferencial en *ALK* en sitios no-CpG se localizaba

dentro del cuerpo del gen, concretamente en intrones, y presentaba correlación significativa con los niveles de expresión génica en neuroblastoma.

De forma relevante, los tumores de alto riesgo reinstauraban la metilación en sitios no-CpG tras el tratamiento con quimioterapia. Observamos como el aumento de metilación en sitios no-CpG en los tumores de alto riesgo tras el tratamiento con agentes quimioterápicos se encontraba asociado a un descenso de la expresión de *ALK*. La diferenciación neural inducida por quimioterapia ha sido descrita en los neuroblastomas de alto riesgo y pobremente diferenciados. En línea con las evidencias descritas, estos tumores presentaban discretos signos de diferenciación inducida por quimioterapia tanto a nivel morfológicos como en un incremento de la expresión de marcadores de diferenciación neural. En consecuencia, el aumento de metilación detectado en el contexto no-CpG indica un papel potencial de esta metilación en la diferenciación y regulación transcripcional de genes implicados en desarrollo, como por ejemplo *ALK*. Esta asociación requiere de mayor investigación para esclarecer el papel preciso de la metilación en no-CpG en la patogénesis del neuroblastoma.

Además, estos resultados resaltan el hecho que existen cambios de metilación del ADN potencialmente inducidos por la quimioterapia y que por tanto, el neuroblastoma al diagnóstico y después del tratamiento podría ser epigenéticamente diferente. Asimismo, los resultados observados en *ALK* indican que el neuroblastoma postquimioterápico puede cambiar su patrón de ADN en genes descritos con alteraciones recurrentes en neuroblastoma y que, por tanto, pueda presentar alteraciones en los mismos genes o vías. Al haber estudiado únicamente la evolución del estado de metilación en no-CpGs en un gen modelo dentro de una pequeña cohorte de neuroblastomas, es necesario analizar esta observación en profundidad y validarla en cohortes mayores.

Publicaciones previas han sugerido que las alteraciones genéticas y epigenéticas pueden afectar a genes y vías similares en el cáncer^{251, 252}. En este contexto observamos cambios en la metilación del ADN en una porción significativa de genes previamente descritos con mutaciones o alteraciones genéticas recurrentes en neuroblastoma y relacionados con desarrollo y cáncer, como *CCND1*^{68-70, 73, 239}. El patrón de metilación de *CCND1* en neuroblastoma lo hemos hallado recurrentemente caracterizado por una extensa hipometilación en regiones intragénicas y en la región 3'-UTR en ausencia de alteraciones en el promotor, presentando un patrón de desmetilación tanto en los neuroblastomas como en los tejidos de referencia. *CCND1* está altamente expresado en numerosos tumores sólidos y en la mayoría de los neuroblastomas²⁵³. La causa de la sobreexpresión de *CCND1* no está clara. Los cambios en la región intragénica y 3'-UTR del gen *CCND1* podrían tener una repercusión funcional en la expresión diferencial del gen en neuroblastoma ya que los hallamos correlacionados con la expresión génica. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *CCND1* puede no estar relacionada con los cambios de metilación en la región promotora²⁵⁴.

Se ha descrito recientemente cambios de metilación en CpGs en *enhancers* distales que regulan la expresión del gen *CCND1* en cáncer de mama^{255, 256}. De forma consistente a estos estudios, en nuestros análisis identificamos un conjunto de citosinas distales a 160-190kb por delante del inicio de transcripción de *CCND1* en regiones asociadas a *enhancers* que correlacionaban con la expresión de *CCND1*^{255, 256}. Además, los cambios de metilación coincidían con sitios de unión de factores de transcripción tales como DEC-1 (con correlación positiva) y GATA3 (con correlación negativa)^{253, 257}. GATA3 es un factor de transcripción sobreexpresado en neuroblastoma y se ha asociado a la sobreexpresión de *CCND1*. En base a los estudios funcionales previos de los *enhancers* distales de *CCND1*, podemos especular que exista una relación semejante entre la misma región distal del gen *CCND1* y su expresión en neuroblastoma. Todo ello indica que la metilación del ADN fuera de las regiones promotoras puede ejercer un posible rol funcional.

Nuestros estudios fueron pioneros en la identificación de cambios de metilación en contexto CpG fuera de promotores e islas CpG así como metilación en contexto no-CpG en neuroblastoma. Para analizar el potencial poder pronóstico de estos cambios de metilación del ADN, seleccionamos y analizamos un grupo reducido de sitios CpG y no-CpG con metilación diferencial entre los tumores con distinto riesgo clínico. Estas citosinas correlacionaban con la supervivencia, tanto libre de evento como global, en neuroblastoma. Estas observaciones sugerían que los cambios de metilación del ADN en sitios CpG y no-CpG tanto dentro como fuera de CGI y localizados en el cuerpo del gen podrían estar asociados con el comportamiento clínico del neuroblastoma.

MÉTODO CLÍNICAMENTE APLICABLE PARA LA CLASIFICACIÓN EN SUBGRUPOS MOLECULARES DE PACIENTES CON MEDULOBLASTOMA

El meduloblastoma es el tumor sólido maligno más común en la edad pediátrica y representa aproximadamente el 20% de los tumores pediátricos del sistema nervioso central⁷⁸. Emerge de la fosa posterior y su origen se establece en algún momento durante el desarrollo embrionario del cerebelo⁷⁷.

Este tumor representa un grupo heterogéneo de tumores embrionarios neuroepiteliales del cerebelo caracterizados por tener comportamiento clínico, histopatología, biología e índices de curación diversos⁷⁴. Hasta la actualidad, la estratificación del paciente para el tratamiento se basaba únicamente en parámetros clínicos como la edad del paciente en el momento del diagnóstico, extensión de la resección quirúrgica del tumor, estado de diseminación y la histología del tumor⁹⁴. Sin embargo estos esquemas de estratificación de pacientes no reflejan la heterogeneidad del comportamiento clínico de estos tumores.

Con el fin de definir las bases moleculares del comportamiento clínico-patológico de la enfermedad en los últimos años se han llevado a cabo varios estudios genómicos. Uno de los hallazgos más relevantes de estos estudios ha sido la identificación de cuatro subgrupos principales de meduloblastoma denominados: *wingless* (WNT), *Sonic hedgehog* (SHH), Grupo 3 y Grupo 4 que se caracterizan por tener un comportamiento clínico, un perfil transcripcional y una genética distinta^{92, 93, 96-102}. Estos subgrupos moleculares se definen actualmente mediante robustos sistemas de clasificación basados en el análisis de *microarrays* de metilación o en el análisis de la expresión de múltiples genes mediante tecnología *NanoString nCounter System* (NanoString Technologies, Inc.), lo que dificulta su incorporación a la rutina clínica de la mayoría de hospitales que tratan a niños con tumores cerebrales^{99, 100}.

El reconocimiento, relativamente reciente, de los subgrupos consenso de meduloblastoma ha cambiado la forma en que se estudia el meduloblastoma en el contexto de la investigación y cómo se diagnostica y trata en el contexto clínico¹⁰⁴. Actualmente gran parte de los esfuerzos dentro del campo de la investigación genómica del meduloblastoma se basan en la identificación de nuevos tratamientos ajustados a las características genéticas de cada uno de estos subgrupos²⁵⁸.

En respuesta a la creciente necesidad de aplicar en la práctica clínica el sistema de clasificación de pacientes con meduloblastoma en los subgrupos moleculares WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4, nuestro grupo ha desarrollado una nueva aproximación clínicamente aplicable basada en el patrón de metilación de dos paneles reducidos de biomarcadores epigenéticos (Panel 1 y Panel 2, con menos de 10 citosinas cada uno).

Partimos de los datos de *microarrays* de metilación del ADN (HM450K) de más 200 muestras de meduloblastoma de cohortes previamente descritas y caracterizadas mediante robustas técnicas actualmente empleadas en los centros de referencia¹⁰⁰. En base a nuestra experiencia previa en el análisis de metilación del ADN mediante *microarrays* en neuroblastoma, realizamos un reanálisis de los datos de metilación en meduloblastoma. Iniciamos el estudio discriminando claramente los subgrupos moleculares establecidos en meduloblastoma mediante un análisis no supervisado de los datos de metilación del ADN. Este análisis, aunque claramente discriminante entre los subgrupos de meduloblastoma, incluía miles de citosinas. Tras aplicar numerosos filtros y algoritmos sobre los datos no supervisados fuimos capaces de reducir la complejidad sin perder capacidad discriminatoria.

En primer lugar, identificamos 6 sitios de metilación diferencial para la clasificación de los subgrupos consenso de meduloblastoma (WNT, SHH y no-WNT/no-SHH). Este clasificador

epigenético, denominado Panel 1, se caracterizaba por un patrón de metilación bimodal específico propio de subgrupo que permitía la clasificación precisa y rápida de muestras de ADN individuales. El Panel 1 podía emplearse en ADN de meduloblastoma obtenido tanto de muestras de tejido congeladas como FFPE, empleando técnicas moleculares cuantitativas y cualitativas que podrían implementarse en la rutina clínica de la mayoría de los laboratorios del mundo.

Al emplear muestras de meduloblastoma de cohortes publicadas y previamente clasificadas, pudimos realizar una comparación directa entre los resultados de las clasificaciones de los subgrupos mediante diferentes métodos. Los resultados obtenidos mediante nuestro clasificador epigenético (Panel 1) obtuvieron un 100% de concordancia con la afiliación de subgrupos previamente determinada por las técnicas actualmente utilizadas en los centros de referencia (HM450K y *NanoString nCounter System*).

Los criterios de inclusión de muchos ensayos clínicos requieren el establecimiento del subgrupo molecular de meduloblastoma. Esto precisa de enfoques de clasificación fehacientes que puedan aplicarse de forma reproducible a los diferentes tipos de material disponible en el contexto clínico: biopsias pequeñas, congeladas o FFPE, tanto de tumor primario, como metástasis o recaídas. El perfil de metilación de nuestros marcadores epigenéticos del Panel 1 se demostró estable ya que se mantuvo constante al analizarlo tanto en el tumor primario, en metástasis como en recaídas. Estas observaciones eran consistentes con estudios previos que mostraron que el subgrupo molecular se mantenía estable tanto en la recaída como en las metástasis, demostrando que los subgrupos de meduloblastoma permanecen estables y no se ven afectados por el tratamiento.

El diseño de ensayos clínicos dirigidos a las características genéticas de los subgrupos moleculares es fundamental a la hora de aplicar un tratamiento ajustado a categorías de riesgo. En el caso de los pacientes con tumores WNT, con un índice de supervivencia por encima del 90%, los ensayos en curso están dirigidos a testar el beneficio de una reducción controlada de la terapia para limitar los efectos secundarios adversos, especialmente aquellos producidos por radioterapia (<https://clinicaltrials.gov>). Por el contrario, los pacientes con tumores de meduloblastoma subgrupo Grupo 3, cuyo pronóstico es desfavorable, podrían beneficiarse de una intensificación del tratamiento de primera línea. Actualmente los ensayos clínicos en curso se centran en nuevas terapias dirigidas a las alteraciones genéticas específicas del subgrupo SHH, como los inhibidores de SMO y GLI1 (<https://clinicaltrials.gov>).

Los tumores de meduloblastoma Grupo 3 y Grupo 4 (que representan más del 50% de los meduloblastomas) comparten algunas características genéticas, son más heterogéneos y se encuentran más estrechamente relacionados entre ellos que el grupo WNT y el grupo SHH⁸⁵. Las directrices recientemente publicadas por la Organización Mundial de la Salud en 2016 para el diseño de ensayos clínicos de la nueva generación, han incluido provisionalmente los tumores del Grupo 3 y del Grupo 4 en una sola entidad denominada no-WNT/no-SHH, debido a las metodologías actualmente utilizadas para determinación de los subgrupos moleculares son incapaces de separar claramente estas dos entidades, existe alrededor de un 10% de casos ambiguos^{85, 89}. Mediante una aproximación similar a la empleada para la identificación del Panel 1, hemos desarrollado un clasificador epigenético (Panel 2) específico para los tumores Grupo 3 y el Grupo 4 basados en 5 biomarcadores epigenéticos. Los meduloblastomas Grupo 3 y el Grupo 4 están compuestos en parte por un pequeño conjunto de tumores (<10%) que presentan perfiles intermedios de metilación y, en parte, superposición de características genéticas y epigenéticas^{85, 89, 104}. De manera similar a las estrategias actualmente empleadas en los centros de referencia, nuestro patrón de metilación específico de subgrupos (Panel 2) presentaba una alta capacidad de clasificación que permitió la afiliación precisa de todos los meduloblastomas claramente definidos como Grupo 3 y Grupo 4, aunque mostró una capacidad de discriminación más limitada (<5%) para aquellos casos con un patrón intermedio

de metilación. Sin embargo, empleando el Panel 2 pudimos clasificar de forma fiable y precisa más del 90% de los pacientes de los subgrupos Grupo 3 y Grupo 4. De este modo el Panel 2 representaba un enfoque rápido y reproducible que permitía la clasificación de los subgrupos de meduloblastoma Grupo 3 y Grupo 4 empleando ADN de muestras individuales congeladas o FFPE. Actualmente no existe ninguna terapia dirigida individualmente a los subgrupos Grupo 3 y Grupo 4 en el contexto de ensayo clínico, debido a que el conocimiento de la base molecular que subyace a la patogénesis de estos tumores es limitado. Por ello, la discriminación entre estos subgrupos moleculares de meduloblastoma puede resultar útil no solo con fines diagnósticos y pronósticos, sino con fines de investigación.

En conjunto, hemos desarrollado una metodología clínicamente aplicable, robusta, rápida y reproducible para la predicción exacta de subgrupos de meduloblastoma de muestras individuales en base a dos paneles compuestos por conjuntos reducidos de biomarcadores epigenéticos, y por tanto, potencialmente incorporables en la práctica clínica. Nuestro enfoque es técnicamente más simple, rápido y coste efectivo en comparación con las actuales técnicas estándar de clasificación de subgrupos de meduloblastoma.

Conclusiones

EL PATRÓN DE METILACIÓN ESPECÍFICO DEL NEUROBLASTOMA REVELA NUEVOS CONOCIMIENTOS BIOLÓGICOS Y CLÍNICOS

- Este fue el primer estudio completo de metilación del ADN en neuroblastoma empleando *microarrays* de alta densidad.
- Detectamos por primera vez en neuroblastoma la presencia de metilación del ADN en citosinas no-CpG, asociada a tumores de bajo riesgo clínico.
- Nuestros hallazgos revelaron que la metilación del ADN en el neuroblastoma afecta no sólo a los promotores, sino también a las regiones intragénicas e intergénicas tanto en sitios CpG como no-CpG.
- Cambios de metilación fuera del promotor afectaban dominios funcionales de la cromatina de genes implicados en desarrollo y cáncer.
- El estado de metilación detectado en el contexto no-CpG indica un papel potencial de esta metilación en la diferenciación y regulación transcripcional de genes clave en el desarrollo, como por ejemplo *ALK*.
- Los cambios de metilación del ADN en sitios CpG y no-CpG tanto dentro como fuera de CGI y localizados en el cuerpo del gen pueden estar asociados con el comportamiento clínico del neuroblastoma.
- Nuestros resultados sugieren que el neuroblastoma a lo largo de la terapia puede ser epigenéticamente diferente.
- La metilación fuera de las regiones promotoras, en el cuerpo del gen y de las regiones intergénicas, en sitios CpG asociados a CGI y en sitios no-CpG dentro y fuera de CGIs pueden estar asociados al comportamiento clínico del neuroblastoma.

MÉTODO CLÍNICAMENTE APLICABLE PARA LA CLASIFICACIÓN EN SUBGRUPOS MOLECULARES DE PACIENTES CON MEDULOBLASTOMA

- Hemos desarrollado un sistema clínicamente aplicable para la clasificación precisa del meduloblastoma en WNT, SHH, Grupo 3 y el Grupo 4.
- El Panel 1 compuesto por 6 biomarcadores epigenéticos específicos con alta capacidad de predicción, permitía una clasificación precisa del meduloblastoma en WNT, SHH y no-WNT/no-SHH, subgrupos consenso recientemente recomendados por la OMS.
- El Panel 2 formado por 5 sitios específicos, de metilación diferencial con alta capacidad de predicción, permitía distinguir el meduloblastoma Grupo 3 y el Grupo 4.
- El patrón bimodal de los paneles identificados permitía el análisis mediante diversas técnicas moleculares, tanto cuantitativas como cualitativas.
- Los biomarcadores epigenéticos identificados eran clínicamente aplicables en la rutina diagnóstica de laboratorios de la mayoría de hospitales que tratan a niños con tumores cerebrales.
- Hemos desarrollamos una aproximación rápida y reproducible para la predicción de subgrupos de meduloblastoma de muestras individuales en base a dos paneles reducidos de biomarcadores epigenéticos potencialmente incorporables en la práctica clínica.

Bibliografía

1. Bolande, R.P. Models and concepts derived from human teratogenesis and oncogenesis in early life. *J Histochem Cytochem* **32**, 878-84 (1984).
2. Dyer, M.A. Mouse models of childhood cancer of the nervous system. *J Clin Pathol* **57**, 561-76 (2004).
3. Gilbertson, R.J. Mapping cancer origins. *Cell* **145**, 25-9 (2011).
4. Mora, J. What is a pediatric tumor? *Clinical Oncology in Adolescents and Young Adults* **2**, 7 (2012).
5. Marshall, G.M. et al. The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer* **14**, 277-89 (2014).
6. Matthay, K.K. et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16078 (2016).
7. Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R. & Cohn, S.L. Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106-20 (2007).
8. Virchow, R.L.K. Hyperplasie der Zirbel und der Nebennieren. Die Krankhaften Geschwülste (1864).
9. Wright, J.H. Neurocytoma or Neuroblastoma, a Kind of Tumor Not Generally Recognized. *J Exp Med* **12**, 556-61 (1910).
10. Rothenberg, A.B., Berdon, W.E., D'Angio, G.J., Yamashiro, D.J. & Cowles, R.A. Neuroblastoma-remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison. *Pediatr Radiol* **39**, 155-60 (2009).
11. Howlader N et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/. , based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017. (2016).
12. London, W.B. et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* **23**, 6459-65 (2005).
13. Esiashvili, N., Goodman, M., Ward, K., Marcus, R.B., Jr. & Johnstone, P.A. Neuroblastoma in adults: Incidence and survival analysis based on SEER data. *Pediatr Blood Cancer* **49**, 41-6 (2007).
14. Gilbert, S.F., Singer, S.R., Tyler, M.S. & Kozlowski, R.N. Developmental biology (Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 2006).
15. Cheung, N.K. & Dyer, M.A. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **13**, 397-411 (2013).
16. Beckwith, J.B. & Perrin, E.V. In Situ Neuroblastomas: A Contribution to the Natural History of Neural Crest Tumors. *Am J Pathol* **43**, 1089-104 (1963).
17. Mora, J. & Gerald, W.L. Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics. *Expert Rev Mol Diagn* **4**, 293-302 (2004).
18. van Noesel, M.M. & Versteeg, R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene* **325**, 1-15 (2004).
19. Brodeur, G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* **3**, 203-16 (2003).
20. Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G. & Delattre, O. Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* **29**, 1566-79 (2010).
21. Mora J, C.O., Morales L. in Tratado de pediatría (ed. Ergon) (Madrid, 2006).
22. Cheung, N.-K.V. & Cohn, S.L. Neuroblastoma (Springer, Berlin ; New York, 2005).
23. Ambros, P.F. et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* **100**, 1471-82 (2009).
24. Kramer, K., Gerald, W., LeSauter, L., Saragovi, H.U. & Cheung, N.K. Monoclonal antibody to human Trk-A: diagnostic and therapeutic potential in neuroblastoma. *Eur J Cancer* **33**, 2090-1 (1997).
25. Cheung, I.Y. et al. Deep MicroRNA sequencing reveals downregulation of miR-29a in neuroblastoma central nervous system metastasis. *Genes Chromosomes Cancer* **53**, 803-14 (2014).
26. D'Angio, G.J., Evans, A.E. & Koop, C.E. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet* **1**, 1046-9 (1971).
27. Fisher, J.P. & Tweddle, D.A. Neonatal neuroblastoma. *Semin Fetal Neonatal Med* **17**, 207-15 (2012).
28. Geatti, O. et al. Iodine-131 metaiodobenzylguanidine scintigraphy for the location of neuroblastoma: preliminary experience in ten cases. *J Nucl Med* **26**, 736-42 (1985).
29. Voute, P.A., Hoefnagel, C.A., Marcuse, H.R. & de Kraker, J. Detection of neuroblastoma with 131I-meta-iodobenzylguanidine. *Prog Clin Biol Res* **175**, 389-98 (1985).
30. Cheung, I.Y., Feng, Y., Gerald, W. & Cheung, N.K. Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **14**, 7020-7 (2008).
31. Cheung, I.Y., Feng, Y., Vickers, A., Gerald, W. & Cheung, N.K. Cyclin D1, a novel molecular marker of minimal residual disease, in metastatic neuroblastoma. *J Mol Diagn* **9**, 237-41 (2007).
32. Stutterheim, J. et al. PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J Clin Oncol* **26**, 5443-9 (2008).
33. Brodeur, G.M. et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* **11**, 1466-77 (1993).
34. Cohn, S.L. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* **27**, 289-97 (2009).
35. Shimada, H. et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* **86**, 364-72 (1999).
36. Rogowitz, E. et al. Neuroblastoma of the elderly, an oncologist's nightmare: case presentation, literature review and SEER database analysis. *Exp Hematol Oncol* **3**, 20 (2014).

37. Speleman, F., De Preter, K. & Vandesompele, J. Neuroblastoma genetics and phenotype: a tale of heterogeneity. *Semin Cancer Biol* **21**, 238-44 (2011).
38. Ora, I. & Eggert, A. Progress in treatment and risk stratification of neuroblastoma: impact on future clinical and basic research. *Semin Cancer Biol* **21**, 217-28 (2011).
39. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**, 1121-4 (1984).
40. Owens, C. & Irwin, M. Neuroblastoma: the impact of biology and cooperation leading to personalized treatments. *Crit Rev Clin Lab Sci* **49**, 85-115 (2012).
41. Valentijn, L.J. et al. Inhibition of a new differentiation pathway in neuroblastoma by copy number defects of N-myc, Cdc42, and nm23 genes. *Cancer Res* **65**, 3136-45 (2005).
42. Yoshimoto, M. et al. MYCN gene amplification. Identification of cell populations containing double minutes and homogeneously staining regions in neuroblastoma tumors. *Am J Pathol* **155**, 1439-43 (1999).
43. Mora, J. et al. Clinical categories of neuroblastoma are associated with different patterns of loss of heterozygosity on chromosome arm 1p. *J Mol Diagn* **2**, 37-46 (2000).
44. Barbashina, V., Salazar, P., Holland, E.C., Rosenblum, M.K. & Ladanyi, M. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res* **11**, 1119-28 (2005).
45. Henrich, K.O. et al. CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells. *Cancer Res* **71**, 3142-51 (2011).
46. Bagchi, A. et al. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell* **128**, 459-75 (2007).
47. Fujita, T. et al. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* **100**, 940-9 (2008).
48. Geli, J., Kiss, N., Kogner, P. & Larsson, C. Suppression of RIZ in biologically unfavourable neuroblastomas. *Int J Oncol* **37**, 1323-30 (2010).
49. Liu, Z. et al. CASZ1, a candidate tumor-suppressor gene, suppresses neuroblastoma tumor growth through reprogramming gene expression. *Cell Death Differ* **18**, 1174-83 (2011).
50. Savelyeva, L., Corvi, R. & Schwab, M. Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet* **55**, 334-40 (1994).
51. Bown, N. et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* **340**, 1954-61 (1999).
52. Garcia, I. et al. A three-gene expression signature model for risk stratification of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **18**, 2012-23 (2012).
53. Simon, T., Spitz, R., Hero, B., Berthold, F. & Faldum, A. Risk estimation in localized unresectable single copy MYCN neuroblastoma by the status of chromosomes 1p and 11q. *Cancer Lett* **237**, 215-22 (2006).
54. Brodeur, G.M. Neuroblastoma (Elsevier, Amsterdam ; New York, 2000).
55. Mora, J., Cheung, N.K., Chen, L., Qin, J. & Gerald, W. Survival analysis of clinical, pathologic, and genetic features in neuroblastoma presenting as locoregional disease. *Cancer* **91**, 435-42 (2001).
56. Mora, J. et al. Comprehensive analysis of tumoral DNA content reveals clonal ploidy heterogeneity as a marker with prognostic significance in locoregional neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 385-96 (2007).
57. Lavarino, C. et al. Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status. *BMC Med Genomics* **1**, 36 (2008).
58. Mosse, Y.P. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**, 930-5 (2008).
59. Mosse, Y.P. et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* **75**, 727-30 (2004).
60. Raabe, E.H. et al. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene* **27**, 469-76 (2008).
61. Amiel, J. et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* **33**, 459-61 (2003).
62. Trochet, D. et al. PHOX2B genotype allows for prediction of tumor risk in congenital central hypoventilation syndrome. *Am J Hum Genet* **76**, 421-6 (2005).
63. Park, J.R. et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* **60**, 985-93 (2013).
64. Heide, S. et al. Oncologic Phenotype of Peripheral Neuroblastic Tumors Associated With PHOX2B Non-Polyalanine Repeat Expansion Mutations. *Pediatr Blood Cancer* **63**, 71-7 (2016).
65. Satge, D. et al. Abnormal constitutional karyotypes in patients with neuroblastoma: a report of four new cases and review of 47 others in the literature. *Cancer Genet Cytogenet* **147**, 89-98 (2003).
66. Mosse, Y. et al. Identification and high-resolution mapping of a constitutional 11q deletion in an infant with multifocal neuroblastoma. *Lancet Oncol* **4**, 769-71 (2003).
67. Vogelstein, B. et al. Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546-58 (2013).

68. Sausen, M. et al. Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat Genet* **45**, 12-7 (2013).
69. Pugh, T.J. et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* **45**, 279-84 (2013).
70. Molenaar, J.J. et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* **483**, 589-93 (2012).
71. Maris, J.M. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* **362**, 2202-11 (2010).
72. Modak, S. & Cheung, N.K. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat Rev* **36**, 307-17 (2010).
73. Cheung, N.K. et al. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* **307**, 1062-71 (2012).
74. Gajjar, A. et al. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming the Diagnostic and Clinical Landscape. *J Clin Oncol* **33**, 2986-98 (2015).
75. Bailey P, C.H. Medulloblastoma cerebelli: a common type of midcerebellar glioma of childhood (Arch Neurol Psychiatry, 1925).
76. Bailey P, C.H. A classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlation study of prognosis (Lippincott, Philadelphia, 1926).
77. Gilbertson, R.J. & Ellison, D.W. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* **3**, 341-65 (2008).
78. Mostoufi-Moab, S. & Grimberg, A. Pediatric brain tumor treatment: growth consequences and their management. *Pediatr Endocrinol Rev* **8**, 6-17 (2010).
79. Northcott, P.A. et al. Enhancer hijacking activates GF11 family oncogenes in medulloblastoma. *Nature* **511**, 428-34 (2014).
80. Shonka, N., Brandes, A. & De Groot, J.F. Adult medulloblastoma, from spongioblastoma cerebelli to the present day: a review of treatment and the integration of molecular markers. *Oncology (Williston Park)* **26**, 1083-91 (2012).
81. Martinez, S., Andreu, A., Mecklenburg, N. & Echevarria, D. Cellular and molecular basis of cerebellar development. *Front Neuroanat* **7**, 18 (2013).
82. Gilbert, S.F. & Barresi, M.J.F. Developmental biology (Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 2016).
83. Gibson, P. et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* **468**, 1095-9 (2010).
84. Wilne, S. et al. Progression from first symptom to diagnosis in childhood brain tumours. *Eur J Pediatr* **171**, 87-93 (2012).
85. Ramaswamy, V. et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* **131**, 821-31 (2016).
86. Pietsch, T. & Haberler, C. Update on the integrated histopathological and genetic classification of medulloblastoma - a practical diagnostic guideline. *Clin Neuropathol* **35**, 344-352 (2016).
87. Martinez Leon, M.I. [Review and update about medulloblastoma in children]. *Radiologia* **53**, 134-45 (2011).
88. Escalona-Zapata, J. Tumores del Sistema Nervioso Central (Editorial Complutense, 1996).
89. Louis, D.N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**, 803-20 (2016).
90. Louis, D.N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97-109 (2007).
91. Robson, D.K. Pathology & Genetics. Tumours of the Nervous System. World Health Organisation Classification of Tumours. P. Kleihues and k. Cavenee (eds). IARC Press, Lyon, 2000. No. of pages: 314. ISBN: 92 832 2409 4. *The Journal of Pathology* **193**, 276-276 (2001).
92. Kool, M. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* **123**, 473-84 (2012).
93. Northcott, P.A. et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* **29**, 1408-14 (2011).
94. DeSouza, R.M., Jones, B.R., Lowis, S.P. & Kurian, K.M. Pediatric medulloblastoma - update on molecular classification driving targeted therapies. *Front Oncol* **4**, 176 (2014).
95. Chang, C.H., Housepian, E.M. & Herbert, C., Jr. An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas. *Radiology* **93**, 1351-9 (1969).
96. Taylor, M.D. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* **123**, 465-72 (2012).
97. Northcott, P.A. et al. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* **488**, 49-56 (2012).
98. Northcott, P.A. et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* **12**, 818-34 (2012).
99. Northcott, P.A. et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* **123**, 615-26 (2012).
100. Hovestadt, V. et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol* **125**, 913-6 (2013).

101. Wang, X. et al. Medulloblastoma subgroups remain stable across primary and metastatic compartments. *Acta Neuropathol* **129**, 449-57 (2015).
102. Thompson, E.M. et al. Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol* **17**, 484-95 (2016).
103. Schwalbe, E.C. et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol* (2017).
104. Holgado, B.L., Guerreiro Stucklin, A., Garzia, L., Daniels, C. & Taylor, M.D. Tailoring Medulloblastoma Treatment Through Genomics: Making a Change, One Subgroup at a Time. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2017).
105. Devaskar, S.U. & Raychaudhuri, S. Epigenetics--a science of heritable biological adaptation. *Pediatr Res* **61**, 1R-4R (2007).
106. Waddington, C.H. CANALIZATION OF DEVELOPMENT AND THE INHERITANCE OF ACQUIRED CHARACTERS. *Nature* **150**, 3 (1942).
107. Dupont, C., Armant, D.R. & Brenner, C.A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med* **27**, 351-7 (2009).
108. Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhata, R. & Shilatifard, A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* **23**, 781-3 (2009).
109. Espada, J. & Esteller, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 238-46 (2010).
110. Rodriguez-Paredes, M. & Esteller, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* **17**, 330-9 (2011).
111. Ficz, G. et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* **473**, 398-402 (2011).
112. Lister, R. et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* **341**, 1237905 (2013).
113. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21 (2002).
114. Wu, S.C. & Zhang, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 607-20 (2010).
115. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-57 (1999).
116. Ramsahoye, B.H. et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5237-42 (2000).
117. Boland, M.J., Nazor, K.L. & Loring, J.F. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ Res* **115**, 311-24 (2014).
118. Biswas, S. & Rao, C.M. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacol Ther* **173**, 118-134 (2017).
119. Kinde, B., Gabel, H.W., Gilbert, C.S., Griffith, E.C. & Greenberg, M.E. Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 6800-6 (2015).
120. Paulsen, M. & Ferguson-Smith, A.C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* **195**, 97-110 (2001).
121. Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**, 261-82 (1987).
122. Bock, C., Walter, J., Paulsen, M. & Lengauer, T. CpG island mapping by epigenome prediction. *PLoS Comput Biol* **3**, e110 (2007).
123. Irizarry, R.A. et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* **41**, 178-86 (2009).
124. Edgar, R., Tan, P.P., Portales-Casamar, E. & Pavlidis, P. Meta-analysis of human methylomes reveals stably methylated sequences surrounding CpG islands associated with high gene expression. *Epigenetics Chromatin* **7**, 28 (2014).
125. Maunakea, A.K. et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* **466**, 253-7 (2010).
126. Deaton, A.M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* **25**, 1010-22 (2011).
127. Bibikova, M. et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* **98**, 288-95 (2011).
128. Illingworth, R.S. & Bird, A.P. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett* **583**, 1713-20 (2009).
129. Jones, P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* **13**, 484-92 (2012).
130. Saxonov, S., Berg, P. & Brutlag, D.L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1412-7 (2006).
131. Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J. & Macleod, D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* **40**, 91-9 (1985).

132. Kulis, M., Queiros, A.C., Beekman, R. & Martin-Subero, J.I. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 1161-74 (2013).
133. Turek-Plewa, J. & Jagodzinski, P.P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* **10**, 631-47 (2005).
134. McCabe, M.T., Brandes, J.C. & Vertino, P.M. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res* **15**, 3927-37 (2009).
135. Ballestar, E. & Wolffe, A.P. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* **268**, 1-6 (2001).
136. Dong, Z., Wang, X. & Evers, B.M. Site-specific DNA methylation contributes to neurotensin/neuromedin N expression in colon cancers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G1139-47 (2000).
137. Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148-59 (2008).
138. Hackett, J.A. et al. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* **339**, 448-52 (2013).
139. Guo, H. et al. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* **511**, 606-10 (2014).
140. Smith, Z.D. et al. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* **484**, 339-44 (2012).
141. Laurent, L. et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* **20**, 320-31 (2010).
142. Xie, W. et al. Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell* **153**, 1134-48 (2013).
143. Guo, J.U. et al. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci* **17**, 215-22 (2014).
144. Lister, R. et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell* **133**, 523-36 (2008).
145. Lister, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**, 315-22 (2009).
146. Hon, G.C. et al. Epigenetic memory at embryonic enhancers identified in DNA methylation maps from adult mouse tissues. *Nat Genet* **45**, 1198-206 (2013).
147. Hackett, J.A. & Surani, M.A. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**, 20110328 (2013).
148. He, Y. & Ecker, J.R. Non-CG Methylation in the Human Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **16**, 55-77 (2015).
149. Kozlenkov, A. et al. Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites. *Nucleic Acids Res* **42**, 109-27 (2014).
150. Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89-92 (1983).
151. Greger, V., Passarge, E., Hopping, W., Messmer, E. & Horsthemke, B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* **83**, 155-8 (1989).
152. Sakai, T. et al. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* **48**, 880-8 (1991).
153. Herman, J.G. et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9700-4 (1994).
154. Merlo, A. et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* **1**, 686-92 (1995).
155. McKenna, E.S. & Roberts, C.W. Epigenetics and cancer without genomic instability. *Cell Cycle* **8**, 23-6 (2009).
156. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-74 (2011).
157. Toyota, M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8681-6 (1999).
158. Suzuki, H., Yamamoto, E., Maruyama, R., Niinuma, T. & Kai, M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* **455**, 35-42 (2014).
159. Abe, M. et al. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res* **65**, 828-34 (2005).
160. Abe, M. et al. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett* **247**, 253-8 (2007).
161. Buckley, P.G. et al. Genome-wide DNA methylation analysis of neuroblastic tumors reveals clinically relevant epigenetic events and large-scale epigenomic alterations localized to telomeric regions. *Int J Cancer* **128**, 2296-305 (2011).
162. Abe, M. et al. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology* **74**, 50-60 (2008).
163. Pfister, S. et al. Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medulloblastoma. *Nucleic Acids Res* **35**, e51 (2007).

164. Henrich, K.O. et al. Integrative Genome-Scale Analysis Identifies Epigenetic Mechanisms of Transcriptional Deregulation in Unfavorable Neuroblastomas. *Cancer Res* **76**, 5523-37 (2016).
165. Waalwijk, C. & Flavell, R.A. DNA methylation at a CCGG sequence in the large intron of the rabbit beta-globin gene: tissue-specific variations. *Nucleic Acids Res* **5**, 4631-4 (1978).
166. Wang, R.Y., Gehrke, C.W. & Ehrlich, M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* **8**, 4777-90 (1980).
167. Cross, S.H., Charlton, J.A., Nan, X. & Bird, A.P. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nat Genet* **6**, 236-44 (1994).
168. Laird, P.W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet* **11**, 191-203 (2010).
169. Frommer, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1827-31 (1992).
170. Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D. & Baylin, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9821-6 (1996).
171. Khulan, B. et al. Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res* **16**, 1046-55 (2006).
172. Weber, M. et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* **39**, 457-66 (2007).
173. Irizarry, R.A. et al. Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). *Genome Res* **18**, 780-90 (2008).
174. Illingworth, R.S. et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* **6**, e1001134 (2010).
175. Meissner, A. et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* **33**, 5868-77 (2005).
176. Zilberman, D. & Henikoff, S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* **134**, 3959-65 (2007).
177. Li, Y. & Tollefsbol, T.O. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol* **791**, 11-21 (2011).
178. Gerald Schock, T.T. Techniques to overcome bottlenecks in epigenetics research. *QIAGEN GmbH* (2011).
179. Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. & Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* **22**, 2990-7 (1994).
180. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7 (1977).
181. Franca, L.T., Carrilho, E. & Kist, T.B. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* **35**, 169-200 (2002).
182. Colella, S., Shen, L., Baggerly, K.A., Issa, J.P. & Krahe, R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* **35**, 146-50 (2003).
183. Ahmadian, A., Ehn, M. & Hober, S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* **363**, 83-94 (2006).
184. Tost, J. & Gut, I.G. Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology. *Methods Mol Biol* **373**, 89-102 (2007).
185. Dufva, M. DNA Microarrays for Biomedical Research (Humana Press Inc., Totowa, NJ, United States, 2009).
186. Dedeurwaerder, S. et al. Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. *Epigenomics* **3**, 771-84 (2011).
187. Allison, D.B., Cui, X., Page, G.P. & Sabripour, M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet* **7**, 55-65 (2006).
188. Bibikova, M. et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium(R) assay. *Epigenomics* **1**, 177-200 (2009).
189. Roessler, J. et al. Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc. *BMC Res Notes* **5**, 210 (2012).
190. Sandoval, J. et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* **6**, 692-702 (2011).
191. Kent, W.J. et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* **12**, 996-1006 (2002).
192. Roadmap Epigenomics, C. et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* **518**, 317-30 (2015).
193. Ernst, J. et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* **473**, 43-9 (2011).
194. Sloan, C.A. et al. ENCODE data at the ENCODE portal. *Nucleic Acids Res* **44**, D726-32 (2016).
195. Huber, W. et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* **12**, 115-21 (2015).
196. Gene Ontology, C. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* **43**, D1049-56 (2015).
197. Yates, L.A., Norbury, C.J. & Gilbert, R.J. The long and short of microRNA. *Cell* **153**, 516-9 (2013).
198. van Rooij, E. The art of microRNA research. *Circ Res* **108**, 219-34 (2011).
199. Ruvkun, G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* **294**, 797-9 (2001).

200. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L. & Pandolfi, P.P. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* **146**, 353-8 (2011).
201. Lu, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834-8 (2005).
202. Wuchty, S., Arjona, D., Bozdog, S. & Bauer, P.O. Involvement of microRNA families in cancer. *Nucleic Acids Res* **40**, 8219-26 (2012).
203. Chen, Y. & Stallings, R.L. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* **67**, 976-83 (2007).
204. Das, S. et al. Modulation of neuroblastoma disease pathogenesis by an extensive network of epigenetically regulated microRNAs. *Oncogene* **32**, 2927-36 (2013).
205. Buechner, J. & Einvik, C. N-myc and noncoding RNAs in neuroblastoma. *Mol Cancer Res* **10**, 1243-53 (2012).
206. Domingo-Fernandez, R., Watters, K., Piskareva, O., Stallings, R.L. & Bray, I. The role of genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis. *Pediatr Surg Int* **29**, 101-19 (2013).
207. Boloix, A. et al. [Novel micro RNA-based therapies for the treatment of neuroblastoma]. *An Pediatr (Barc)* **85**, 109 e1-6 (2016).
208. Bray, I. et al. Widespread dysregulation of MiRNAs by MYCN amplification and chromosomal imbalances in neuroblastoma: association of miRNA expression with survival. *PLoS One* **4**, e7850 (2009).
209. Das, S. et al. MicroRNA mediates DNA demethylation events triggered by retinoic acid during neuroblastoma cell differentiation. *Cancer Res* **70**, 7874-81 (2010).
210. Shohet, J.M. et al. A genome-wide search for promoters that respond to increased MYCN reveals both new oncogenic and tumor suppressor microRNAs associated with aggressive neuroblastoma. *Cancer Res* **71**, 3841-51 (2011).
211. Buckley, P.G. et al. Chromosomal and microRNA expression patterns reveal biologically distinct subgroups of 11q- neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **16**, 2971-8 (2010).
212. Zhi, F. et al. MicroRNAs in neuroblastoma: small-sized players with a large impact. *Neurochem Res* **39**, 613-23 (2014).
213. Karreth, F.A. & Pandolfi, P.P. ceRNA cross-talk in cancer: when ce-bling rivalries go awry. *Cancer Discov* **3**, 1113-21 (2013).
214. Sumazin, P. et al. An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma. *Cell* **147**, 370-81 (2011).
215. Tay, Y. et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell* **147**, 344-57 (2011).
216. Ala, U. et al. Integrated transcriptional and competitive endogenous RNA networks are cross-regulated in permissive molecular environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7154-9 (2013).
217. Ach, R.A., Wang, H. & Curry, B. Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnol* **8**, 69 (2008).
218. Choi, Y.W. et al. MicroRNA Expression Signatures Associated With BRAF-Mutated Versus KRAS-Mutated Colorectal Cancers. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3321 (2016).
219. Xiao, J., Wang, Q.X. & Zhu, Y.Q. Altered expression profile of micrnas in gastric stromal tumor. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **35**, 842-50 (2015).
220. Fricke, A. et al. Identification of a blood-borne miRNA signature of synovial sarcoma. *Mol Cancer* **14**, 151 (2015).
221. Gomez, S. et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. *Epigenomics* **7**, 1137-53 (2015).
222. Aryee, M.J. et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* **30**, 1363-9 (2014).
223. Kulis, M. et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* **44**, 1236-42 (2012).
224. Queiros, A.C. et al. A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia* **29**, 598-605 (2015).
225. Irizarry, R.A. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-64 (2003).
226. Irizarry, R.A., Ooi, S.L., Wu, Z. & Boeke, J.D. Use of mixture models in a microarray-based screening procedure for detecting differentially represented yeast mutants. *Stat Appl Genet Mol Biol* **2**, Article1 (2003).
227. Ritchie, M.E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43**, e47 (2015).
228. Martin-Subero, J.I. et al. New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood* **113**, 2488-97 (2009).
229. Darst, R.P., Pardo, C.E., Ai, L., Brown, K.D. & Kladde, M.P. Bisulfite sequencing of DNA. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 7**, Unit 7 9 1-17 (2010).
230. Gonzalez, A., Gil-Peralta, A., Gonzalez-Marcos, J.R. & Mayol, A. Angioplasty and stenting for total symptomatic atherosclerotic occlusion of the subclavian or innominate arteries. *Cerebrovasc Dis* **13**, 107-13 (2002).
231. Zhou, C. et al. Lhx6 and Lhx8: cell fate regulators and beyond. *FASEB J* **29**, 4083-91 (2015).

232. Liu, W.B. et al. LHX6 acts as a novel potential tumour suppressor with epigenetic inactivation in lung cancer. *Cell Death Dis* **4**, e882 (2013).
233. Hu, Z. & Xie, L. LHX6 inhibits breast cancer cell proliferation and invasion via repression of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Med Rep* **12**, 4634-9 (2015).
234. Estecio, M.R. et al. LHX6 is a sensitive methylation marker in head and neck carcinomas. *Oncogene* **25**, 5018-26 (2006).
235. Smith, Z.D. & Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* **14**, 204-20 (2013).
236. Yang, Q. et al. Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* **13**, 3191-7 (2007).
237. Banelli, B. et al. A pyrosequencing assay for the quantitative methylation analysis of the PCDHB gene cluster, the major factor in neuroblastoma methylator phenotype. *Lab Invest* **92**, 458-65 (2012).
238. Asada, K. et al. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. *Jpn J Clin Oncol* **43**, 641-5 (2013).
239. Koyama, H. et al. Mechanisms of CHD5 inactivation in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* **18**, 1588-97 (2012).
240. Hoebeeck, J. et al. Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett* **273**, 336-46 (2009).
241. Haruta, M., Kamijo, T., Nakagawara, A. & Kaneko, Y. RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer Lett* **348**, 167-76 (2014).
242. Teitz, T. et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* **6**, 529-35 (2000).
243. Yanez, Y. et al. Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma. *Clin Epigenetics* **7**, 16 (2015).
244. Dreidax, D. et al. p19-INK4d inhibits neuroblastoma cell growth, induces differentiation and is hypermethylated and downregulated in MYCN-amplified neuroblastomas. *Hum Mol Genet* **23**, 6826-37 (2014).
245. Lister, R. et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 68-73 (2011).
246. Caren, H., Abel, F., Kogner, P. & Martinsson, T. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J* **416**, 153-9 (2008).
247. George, R.E. et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* **455**, 975-8 (2008).
248. Carpenter, E.L. & Mosse, Y.P. Targeting ALK in neuroblastoma--preclinical and clinical advancements. *Nat Rev Clin Oncol* **9**, 391-9 (2012).
249. Bagci, O., Tumer, S., Olgun, N. & Altungoz, O. Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors. *Cancer Lett* **317**, 72-7 (2012).
250. Passoni, L. et al. Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer Res* **69**, 7338-46 (2009).
251. Chan, T.A. et al. Convergence of mutation and epigenetic alterations identifies common genes in cancer that predict for poor prognosis. *PLoS Med* **5**, e114 (2008).
252. Schuebel, K.E. et al. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet* **3**, 1709-23 (2007).
253. Molenaar, J.J. et al. Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells. *Oncogene* **29**, 2739-45 (2010).
254. Mayol, G. et al. DNA hypomethylation affects cancer-related biological functions and genes relevant in neuroblastoma pathogenesis. *PLoS One* **7**, e48401 (2012).
255. Aran, D. & Hellman, A. DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. *Cell* **154**, 11-3 (2013).
256. French, J.D. et al. Functional variants at the 11q13 risk locus for breast cancer regulate cyclin D1 expression through long-range enhancers. *Am J Hum Genet* **92**, 489-503 (2013).
257. Wang, Y. et al. SUMO modification of Stra13 is required for repression of cyclin D1 expression and cellular growth arrest. *PLoS One* **7**, e43137 (2012).
258. Morrissy, A.S. et al. Spatial heterogeneity in medulloblastoma. *Nat Genet* **49**, 780-788 (2017).
259. Fabbri, M. & Calin, G.A. Epigenetics and miRNAs in human cancer. *Adv Genet* **70**, 87-99 (2010).
260. Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A. & Vingron, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**, S96-104 (2002).
261. Carvalho, B.S. & Irizarry, R.A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* **26**, 2363-7 (2010).
262. Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M. & Irizarry, R.A. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**, 307-15 (2004).
263. De Preter, K. et al. Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Mod Pathol* **15**, 159-66 (2002).

264. Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W. & Bartel, D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* **4** (2015).
265. Ghorai, A. & Ghosh, U. miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. *Front Genet* **5**, 100 (2014).
266. Sarver, A.L. et al. MicroRNAs at the human 14q32 locus have prognostic significance in osteosarcoma. *Orphanet J Rare Dis* **8**, 7 (2013).
267. Hill, K.E. et al. An imprinted non-coding genomic cluster at 14q32 defines clinically relevant molecular subtypes in osteosarcoma across multiple independent datasets. *J Hematol Oncol* **10**, 107 (2017).
268. Nadal, E. et al. Epigenetic inactivation of microRNA-34b/c predicts poor disease-free survival in early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **19**, 6842-52 (2013).
269. Luk, J.M. et al. DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival. *J Biol Chem* **286**, 30706-13 (2011).
270. Zehavi, L. et al. Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor. *Mol Cancer* **11**, 44 (2012).
271. Agueli, C. et al. 14q32/miRNA clusters loss of heterozygosity in acute lymphoblastic leukemia is associated with up-regulation of BCL11a. *Am J Hematol* **85**, 575-8 (2010).
272. Kleinman, C.L. et al. Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR. *Nat Genet* **46**, 39-44 (2014).
273. Radovich, M. et al. A large microRNA cluster on chromosome 19 is a transcriptional hallmark of WHO type A and AB thymomas. *Br J Cancer* **114**, 477-84 (2016).
274. Chang, Y.Y. et al. Deregulated microRNAs in triple-negative breast cancer revealed by deep sequencing. *Mol Cancer* **14**, 36 (2015).
275. Roth, S.A. et al. Next generation sequencing of microRNAs from isogenic neuroblastoma cell lines isolated before and after treatment. *Cancer Lett* **372**, 128-36 (2016).
276. Gattolliat, C.H. et al. Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. *Br J Cancer* **105**, 1352-61 (2011).
277. Leichter, A.L., Sullivan, M.J., Eccles, M.R. & Chatterjee, A. MicroRNA expression patterns and signalling pathways in the development and progression of childhood solid tumours. *Mol Cancer* **16**, 15 (2017).
278. Buechner, J. et al. Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma. *Br J Cancer* **105**, 296-303 (2011).
279. Moncini, S. et al. The role of miR-103 and miR-107 in regulation of CDK5R1 expression and in cellular migration. *PLoS One* **6**, e20038 (2011).

ANEXOS

Alteración de la expresión de redes de miRNAs en Neuroblastoma, una aproximación multi “-ómica”

Resumen

Antecedentes: Evidencias recientes muestran que los microRNAs (miRNAs) y la epigenética se encuentran estrechamente relacionados, ya que los miRNAs pueden estar regulados epigenéticamente y a su vez los miRNAs regulan directamente la maquinaria epigenética²⁵⁹. En este estudio partimos del análisis de los cambios de metilación que afectan regiones reguladoras de mRNAs, y como ello modifica la expresión y la interacción de miRNAs con mRNA diana.

Métodos: Para ello utilizamos bases de datos de metilación del array *Human Methylation 450K BeadChip*, expresión de miRNAs (*Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0*, miRNA4.0) y expresión génica (*Affymetrix Human Genome U219 Array Plates*) generados utilizando la misma cohorte de muestras de neuroblastoma.

Resultados (preliminares): Hemos identificado patrones de metilación diferencial que afectan regiones asociadas a miRNAs que correlacionan con parámetros clínico-biológicos relevantes en neuroblastoma. Estos cambios de metilación se asociaban con perfiles de expresión de miRNA diferencial entre subgrupos de neuroblastoma. Asimismo hemos identificado redes de interacción entre miRNA y ARNm diana que se ven afectadas por dichas modificaciones epigenéticas. Actualmente, nuestros hallazgos están en proceso de estudio y validación en nuestro laboratorio.

Material y métodos

Pacientes y Muestras. Se incluyeron en el estudio aquellas muestras congeladas obtenidas en el momento del diagnóstico de la enfermedad de pacientes diagnosticados y tratados en nuestra institución (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, España). Todas las muestras tumorales fueron evaluadas por un patólogo y solo se incluyeron en el estudio aquellas con un contenido de >70% de población tumoral viable. Los padres y/o tutores firmaron los consentimientos informados requeridos antes de la recogida de muestras.

Todos los análisis basados en la tecnología de *microarray* se realizaron sobre la misma cohorte de muestras de neuroblastoma con la finalidad de integrar los datos multi “-ómicos”. Los resultados se validaron sobre una cohorte de muestras de neuroblastoma independiente.

Metilación del ADN en neuroblastoma: Los datos fueron obtenidos mediante la hibridación de muestras de nuestro laboratorio a la plataforma *Human Methylation 450K BeadChip* (HM450K) (Illumina, Inc). La normalización, control de calidad y filtrado de los datos obtenidos mediante HM450K (iDAT) se realizó según descrito²²¹.

Identificación de citosinas, CpG y no-CpG, diferencialmente metiladas. La identificación de citosinas diferencialmente metiladas se realizó según descrito²²¹.

Anotación genómica, caracterización transcripcional y epigenómica de las citosinas Los datos de metilación derivados de la plataforma HM450K (Illumina, Inc) fueron anotados según la versión GRCh37/hg19 de la base de datos UCSC Genome Browser¹⁹¹. Todas las citosinas fueron clasificadas según su relación con las islas CpG (CGI) y según las categorías del estado de la cromatina y del estado transcripcional^{192, 193, 223}.

Expresión génica en neuroblastoma: Los datos fueron obtenidos mediante la hibridación de ARN de muestras obtenidas en nuestro laboratorio sobre la plataforma *Affymetrix Human Genome U219 Array Plates*, todo ello realizado en la Unidad de Genómica Funcional del Instituto de Investigación Biomédica August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España; siguiendo los protocolos estándar de *Affymetrix*.

Expresión de miRNA en neuroblastoma: Para ello se utilizó la tecnología de *microarray GeneChip miRNA 4.0* (Affymetrix, Inc.). La hibridación del ARN de 20 neuroblastomas así como 4 tejidos de referencia normales (2 glándulas suprarrenales fetales y 2 cerebros fetales) de muestras obtenidas de nuestra institución se realizó en el Servicio de Análisis de Microarrays del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, España, siguiendo los protocolos estándar de *Affymetrix*.

Normalización, control de calidad y filtrado de los datos derivados de la tecnología *microarray*: Los datos de expresión obtenidos con la tecnología de *microarrays* (archivos CEL) se analizaron con el algoritmo *robust multichip averaged* (RMA) para los datos de expresión génica y *variance stabilizing normalization* (VSN)²⁶⁰ y *oligo*²⁶¹ para los datos de expresión de miRNAs, empleando paquetes estadísticos y librerías de *Affymetrix* disponibles a través de R/Bioconductor²⁶².

Análisis de los perfiles de expresión: El análisis de los perfiles de expresión génica, tanto para los datos obtenidos a partir de la tecnología de *Human Genome U219 Array Plates* como para los datos obtenidos de *GeneChip miRNA 4.0* (Affymetrix, Inc.), se realizaron aplicando *limma*²²⁷ así como diversos algoritmos computacionales mediante R/Bioconductor²²¹.

Acceso a los datos derivados de la tecnología de *microarrays*: Todos los datos obtenidos mediante tecnología de *microarrays* fueron depositados en la base de datos *NCBI Gene Expression Omnibus* con los siguientes números de acceso: Superserie GSE54721, compuesto por GSE54720 para los datos de expresión génica obtenidos mediante la plataforma *Affymetrix Human Genome U219 Array Plates* y GSE54719 para los datos de metilación obtenidos mediante la plataforma HM450K. Los accesos a los datos obtenidos por medio de la plataforma de *microarray Affymetrix GeneChip miRNA 4.0* no serán públicos hasta la publicación del manuscrito.

PCR cuantitativa en tiempo real tras retrotranscripción (RTq-PCR): El análisis de los niveles de expresión se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo aplicando los protocolos descritos previamente^{57, 263}.

Predicción de las dianas de miRNA: La identificación de mRNAs diana para los miRNA de interés se realizó mediante algoritmos e herramientas bioinformáticas, como:

- TargetScan Human (<http://www.targetscan.org/>)
- miRBase (<http://mirbase.org/>)
- MicroCosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>)
- miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)
- miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)

Redes de miRNAs para la regulación génica: Para estudiar las redes de regulación de los miRNA se desarrollaron y/o adaptaron métodos y algoritmos computacionales mediante paquetes de R (R/Bioconductor)^{200, 215, 264}. Incluimos en el estudio únicamente aquellos miRNAs que cumplían criterios de robustez al ser miRNAs conservados y con sitios de unión conservados en vertebrados.

Resultados

Citosinas en el contexto de miRNAs incluidas en el *microarray* HM450K.

Al expandir la información contenida en la anotación de las citosinas incluidas en el array HM450K pudimos identificar y analizar los cambios de metilación del ADN asociados a regiones descritas como potenciales promotores y regiones reguladoras de miRNAs (n=7.209) (Figura 1).

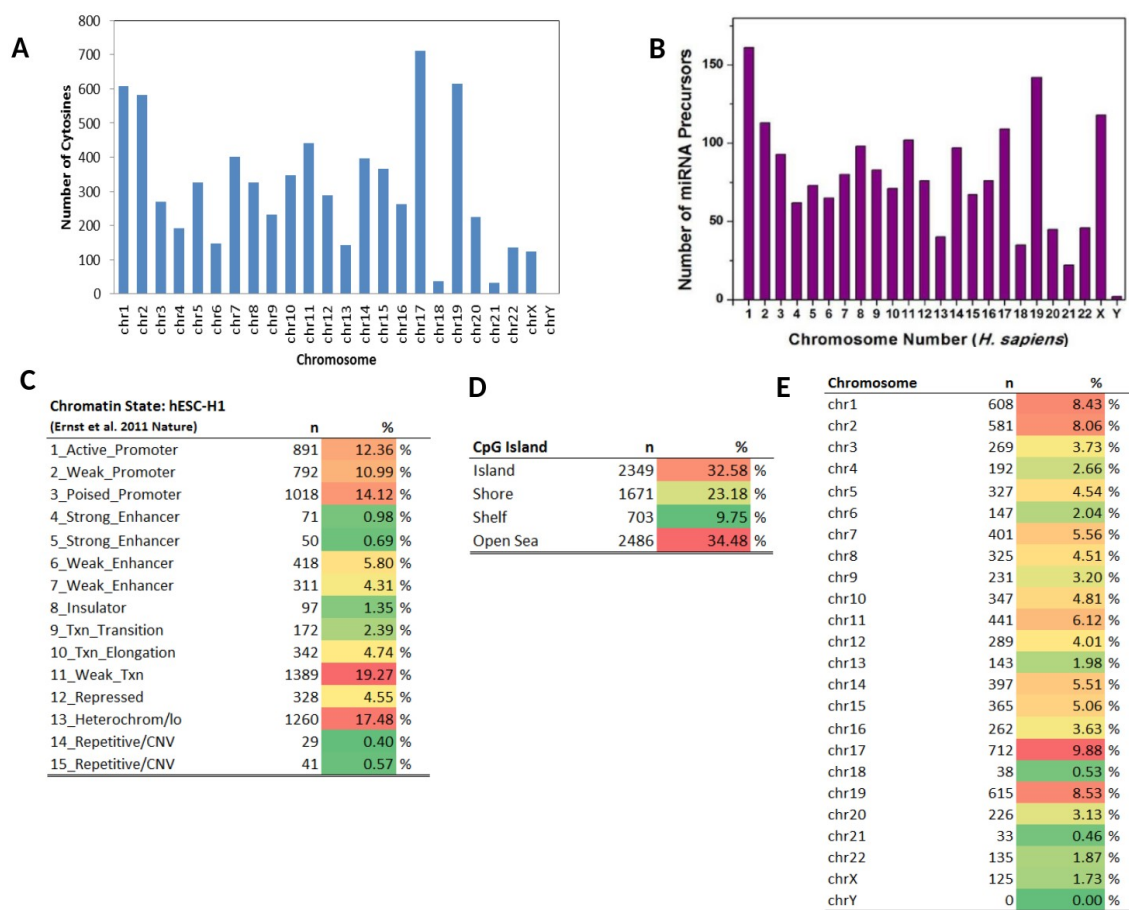


Figura 1: Histograma que representa (A) la distribución cromosómica de las citosinas asociadas a precursores de miRNAs en el *microarray* HM450K y (B) la variación de precursores de miRNAs (miRBase) en los diferentes cromosomas (Ghorai y Ghosh. *Frontiers in Genetics*. 2014²⁶⁵). Distribución de las citosinas asociadas a precursores de miRNAs en el *microarray* HM450K según (C) las categorías del estado de la cromatina y del estado transcripcional de las células embrionarias humanas H1 (Ernst. *et al* Nature. 2011) y (D) su localización relativa a Islas CpG. (E) Distribución cromosómica de las citosinas asociadas a precursores de miRNAs en el *microarray* HM450K.

En el *microarray* HM450K las citosinas asociadas a miRNAs se distribuyen acorde a las posiciones genómicas de los precursores de miRNAs (pri-miRNAs) (Figura 1A-B). La menor representación de las citosinas en los cromosomas sexuales observada en la Figura 1A es debida al filtro que hemos aplicado que excluye sitios de metilación sexo-específicos y asociados a impronta genética.

La mayoría de las citosinas relacionadas con miRNAs en el HM450K se encuentran en regiones asociadas a marcas históricas propias de regiones activas de la cromatina (H3K4me3, H3K4me1, H3K27me3) como regiones promotoras, de transcripción (Weak_Txn) y

regiones inactivas como heterocromatina (H3K9me3), mientras que observamos un número reducido de citosinas localizadas en *enhancers* (Figura 1C-E).

Cambios de metilación en regiones genómicas asociadas a miRNAs

Los resultados de diversos análisis no supervisados y supervisado mostraron cambios significativos de metilación en citosinas localizadas en regiones asociadas a miRNAs. Estos análisis revelaron que existen patrones de metilación diferencial entre los neuroblastomas y las muestras referencia, resaltando patrones específicos asociados a subgrupos de relevancia clínica, especialmente entre neuroblastomas de alto y bajo riesgo (n=235, 3.3%) así como entre los tumores con diverso estado de amplificación del oncogén *MYCN* (n=286, 3.97%) (Figura 2A-B).

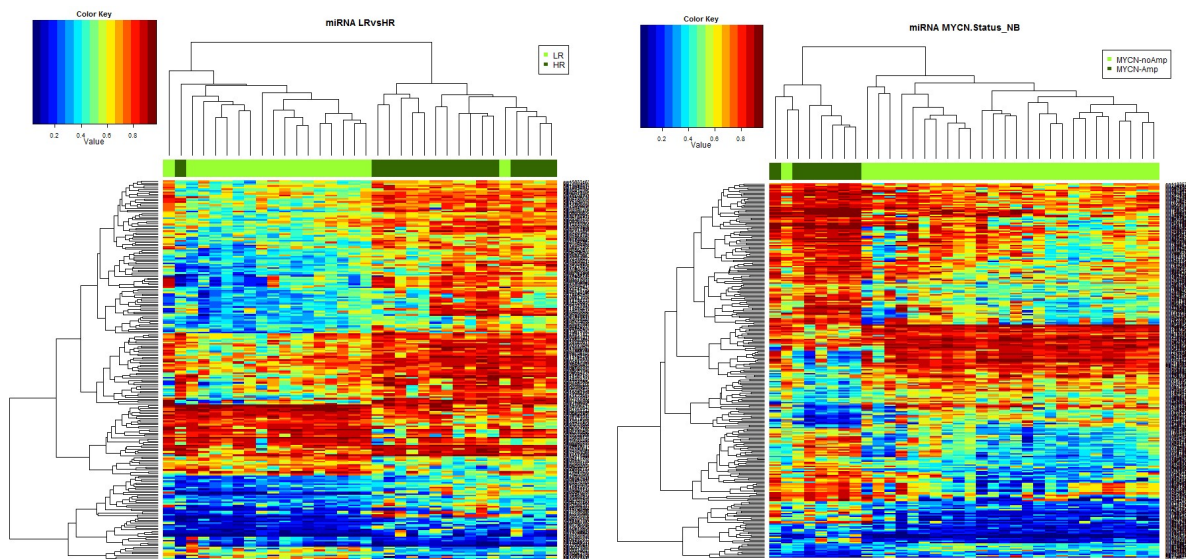


Figura 2: Análisis de metilación diferencial de citosinas localizadas en regiones genómicas asociadas a miRNAs entre los neuroblastomas (A) de alto (HR) y bajo riesgo (LR); (B) *MYCN* amplificados (MYCN-Amp) y los no amplificados (MYCN-noAmp).

La mayoría de los cambios de metilación que observamos entre los subgrupos de neuroblastoma de distinto riesgo clínico o estado de amplificación de *MYCN*, se asociaban a un patrón de hipermetilación más significativo en los tumores de alto riesgo y *MYCN* amplificados. Estos cambios de metilación afectaban mayoritariamente a citosinas fuera de CGI, en regiones de la cromatina caracterizadas por marcas histónicas que representan regiones activas potencialmente de transcripción o regiones promotoras, así como regiones inactivas como heterocromatina.

La existencia de estos patrones de metilación con una clara correlación con parámetros clínico-biológicos relevantes en neuroblastoma sugería que estas alteraciones epigenéticas podrían contribuir al comportamiento clínico-patológico de este tumor, afectando de forma específica la expresión de miRNAs.

Alteraciones de la expresión de miRNAs subyacentes a cambios de metilación del ADN

En base a estas evidencias, el siguiente objetivo era estudiar el posible efecto en la expresión de miRNAs desencadenado por estos cambios de metilación del ADN. Para ello utilizamos un array de expresión de miRNAs (Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0, miRNA4.0) Las sondas

incluidas en el estudio y normalizadas fueron 4.603 (2.578 sondas de miRNA maduros y 2.025 sondas de pre-miRNAs), obtenidas tras filtrar las sondas no humanas (n= 29.722) y las sondas control (n=2.028) (Figura 3).

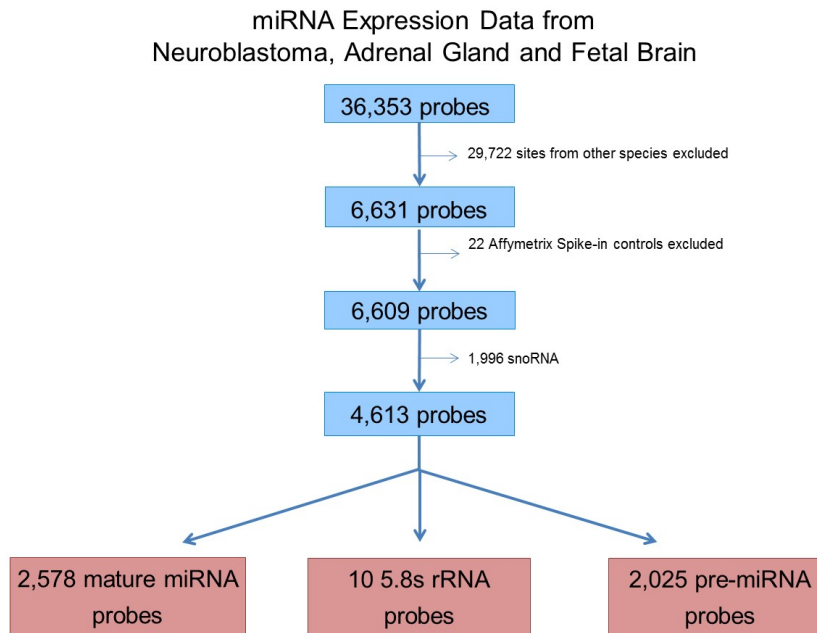


Figura 3: Diagrama de flujo que muestra los pasos seguidos en el análisis de los datos de *microarrays* de expresión de miRNAs Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0.

El análisis no supervisado de los datos de expresión del array miRNA4.0 se realizó sobre aquellas sondas que tuvieran una desviación estándar por encima de 1 entre todas las muestras (n=321).

Los resultados mostraron una expresión diferencial de miRNAs entre los neuroblastomas y las referencias (Glándula suprarrenal y Cerebro fetal). Analizando más en detalle los resultados observamos que las muestras de neuroblastoma se separaban a su vez según características clínico-biológicas, siendo la más significativa asociada al estado de amplificación del oncogén *MYCN* (*MYCN* no amplificados (NA) y *MYCN* amplificados (A)) (Figura 4).

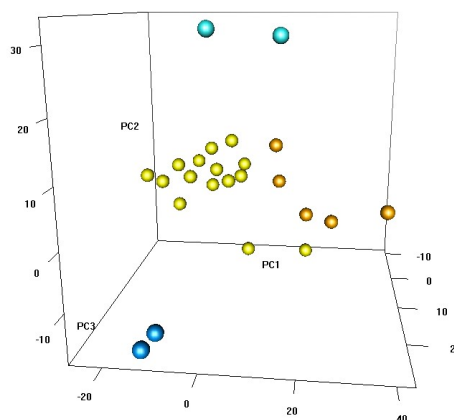


Figura 4: Análisis de componentes principales de los datos normalizados del array Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0. Naranja: neuroblastoma *MYCN* amplificado; Amarillo: neuroblastoma *MYCN* no amplificado; Azul celeste: Glándula Suprarrenal; Azul oscuro: Cerebro fetal.

En el análisis comparativo entre los neuroblastomas *MYCN* amplificados y los no amplificados identificamos 252 miRNAs diferencialmente expresados: 34 miRNAs inmaduros y 213 miRNAs maduros. Observamos como una porción importante de estos miRNAs (92%, 234 de los 252 miRNAs) mostraban niveles de expresión más bajos en los tumores amplificados (Figura 5). Es de interés destacar que parte de estos cambios de expresión (41.6%) afectaban a miRNAs incluidos en *clusters* localizados en el cromosoma 14 (24%; 14q32.2-31), cromosoma X (16%; Xp11.23 y Xq13.2) y cromosoma 19 (14%; 19q13.41-42 y 19p13.13). Alteraciones en la expresión de miRNAs en estos *clusters*, en especial en aquellos localizados en el cromosoma 14q32 y 19q13, han sido previamente descritos en cáncer, principalmente en adenocarcinomas de pulmón, melanoma, leucemia linfoblástica aguda, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular, ETMR, timomas, cáncer de mama y en neuroblastoma²⁶⁶⁻²⁷⁶.

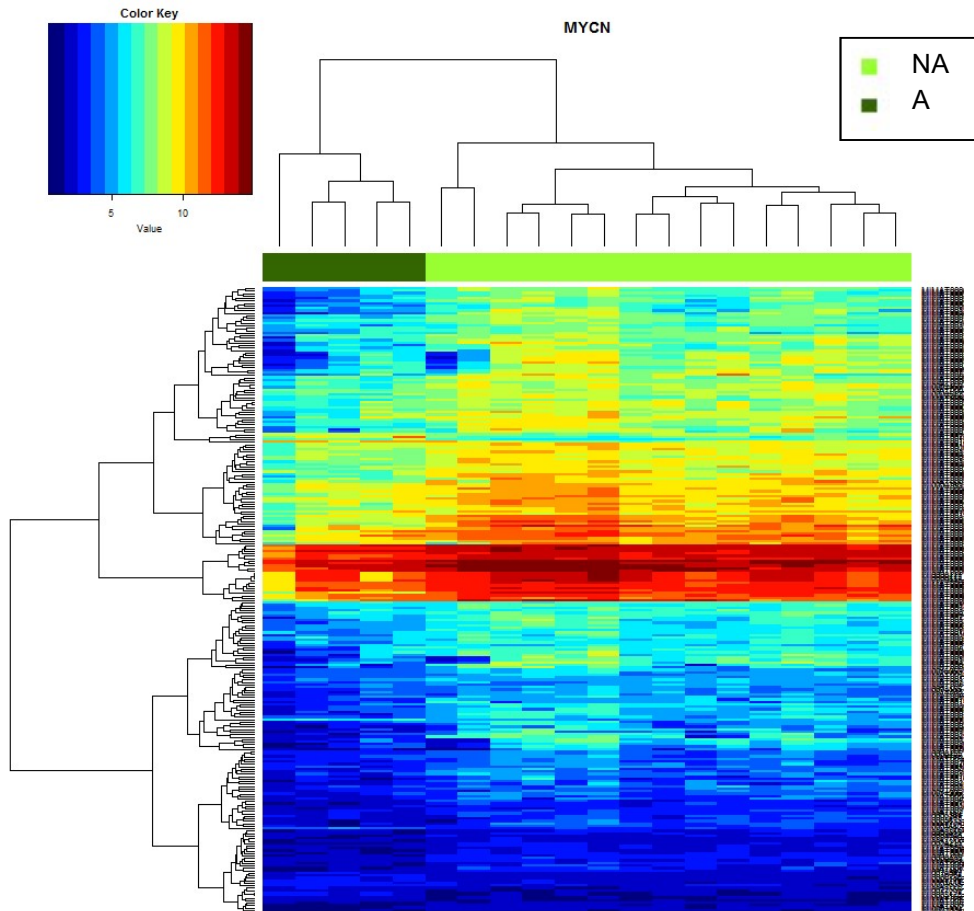


Figura 5: Análisis de expresión diferencial de miRNAs entre *MYCN* amplificados y los no amplificados (n=252). A: Neuroblastoma *MYCN* amplificado; NA: Neuroblastoma *MYCN* no amplificado.

Estos resultados sugerían una posible relación, directa o indirecta, entre la amplificación de *MYCN* y los cambios de expresión de miRNAs en neuroblastoma. Estas evidencias nos llevaron a ahondar en esta potencial relación mediante la investigación de redes de interacción entre *MYCN* y miRNAs.

Identificación de redes de interacción entre miRNAs y ARN mensajeros

Los miRNAs regulan múltiples secuencias de ARN y al mismo tiempo, un único ARNm puede ser regulado por múltiples miRNAs lo que da lugar a una compleja y sofisticada red de regulación génica.

A partir de nuestros resultados procedimos a estudiar más en detalle los efectos causados por la amplificación *MYCN* en los perfiles de expresión de miRNAs y su repercusión en las redes de miRNA-ARNm en neuroblastoma.

Para ello desarrollamos una herramienta de bioinformática para identificar redes de miRNAs basado en programación en lenguaje estadístico R (<https://cran.r-project.org/>). Esta herramienta permite correlacionar miRNAs con sus dianas de mRNA. La relación entre los miRNAs y sus dianas la establecimos basándonos en la información públicamente accesible en la base de datos TargetScan (<http://targetscan.org>) (Figura 6).

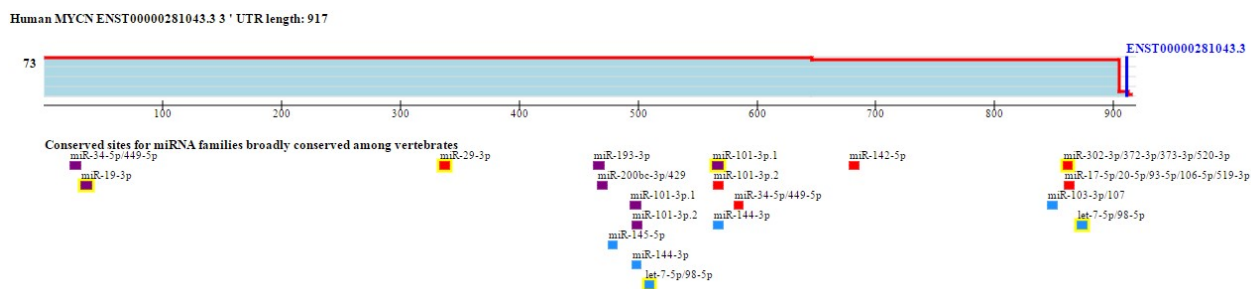


Figura 6: Imagen de TargetScan (<http://targetscan.org>) que representa la predicción de sitios de unión conservados de miRNAs conservados en vertebrados en la región 3'-UTR de *MYCN*.

Al estudiar la interacción entre miRNA que tienen sitios de unión en la región 3'-UTR de ARNm *MYCN* (n=45) y los niveles de expresión de *MYCN* de nuestro *array* hallamos 6 miRNAs inversamente correlacionados con la expresión de *MYCN* en neuroblastoma. Estos miRNAs se encontraban a su vez diferencialmente expresados de forma significativa ($p < 0.05$) en el análisis supervisado entre los tumores *MYCN* amplificados y no amplificados: hsa-let-7e-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-107 y hsa-miR-34a-5p. Todos ellos han sido descritos previamente en relación a la patogénesis del neuroblastoma²⁷⁷⁻²⁷⁹.

A continuación investigamos genes que tuvieran en la región 3'-UTR sitios de unión (MRE, *microRNA Response Element*) para miRNAs comunes con el ARNm *MYCN*. El objetivo era identificar genes cuya expresión pudiera estar afectada indirectamente por la sobreexpresión de *MYCN* vía una red de miRNAs comunes (Figura 7). Para ello aplicamos un procedimiento de análisis bioinformático que permite interconectar un ARNm con un conjunto de ARN mensajeros vía miRNAs comunes. Este procedimiento está basado el método *mutually targeted MRE enrichment analysis* (MuTaMe) previamente descrito por el laboratorio del Dr. PP. Pandolfi^{200, 215}. Identificamos 3,338 ARNm asociados con *MYCN* vía miRNAs comunes (Figura 7).

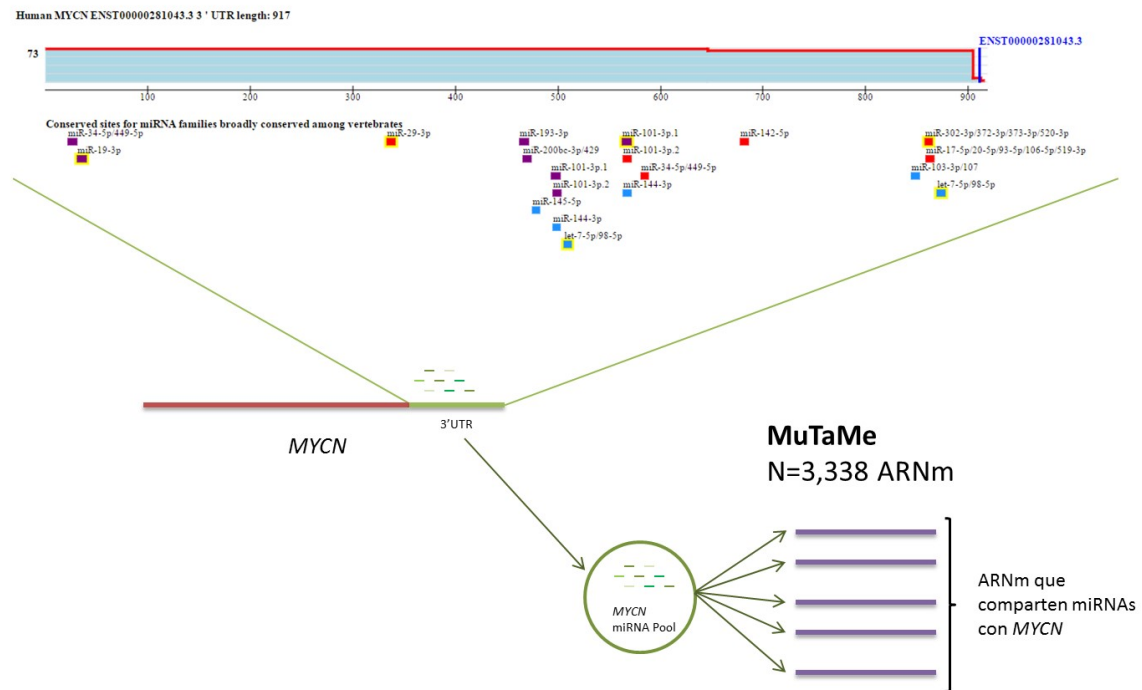


Figura 7: Esquema representativo del método MuTaMe para el gen *MYCN* (n=3,338).

A continuación procedimos a identificar que mRNAs diferencialmente expresados en neuroblastomas con distinto estado de *MYCN* se encontraban interconectados a través de los 6 miRNAs hallados con expresión diferencial en dichos subgrupos de tumores. Aplicando el análisis MuTaME identificamos 20 genes, incluyendo *MYCN*, presentes en la red de miRNA-ARNm y sobreexpresados en los neuroblastomas *MYCN* amplificados (Figura 8 y Tabla 1).

Correlación MYCN - miRNAs

Human Genome U219 - GeneChip miRNA 4.0

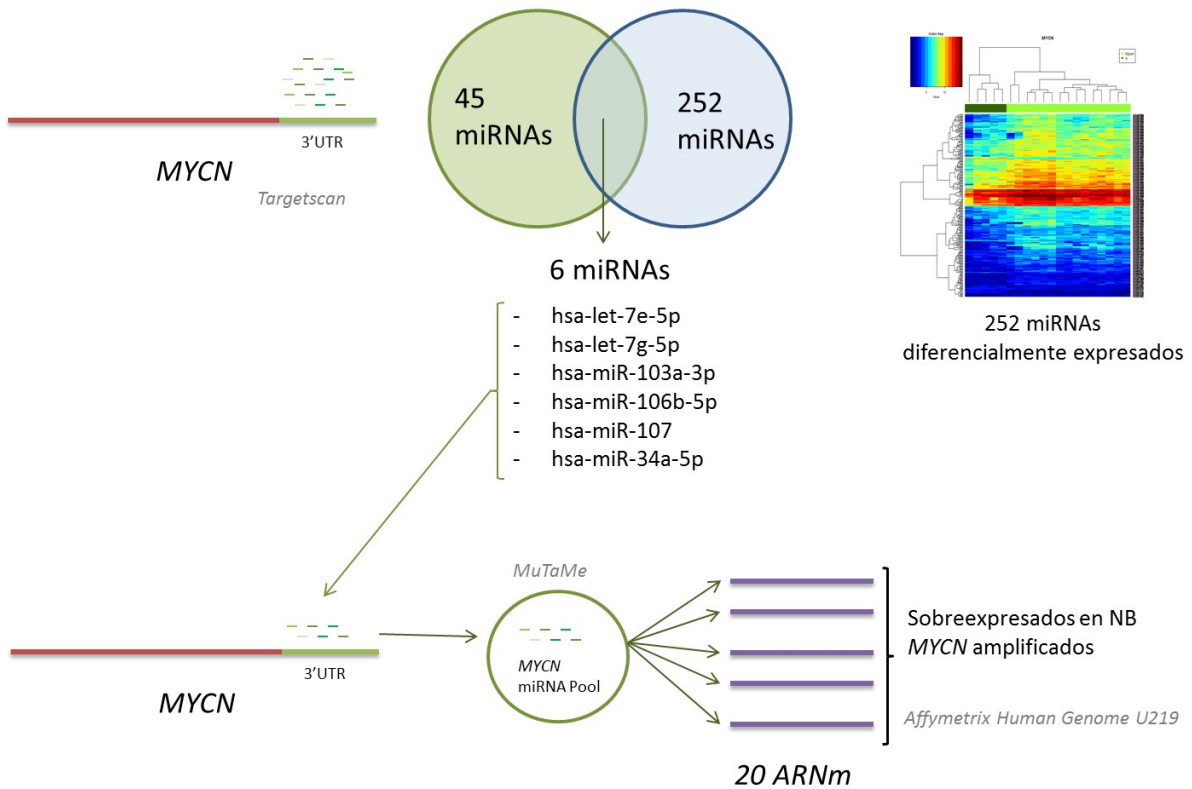


Figura 8: Diagrama del proceso de identificación de redes de interacción entre miRNAs y ARN mensajeros en el contexto de la amplificación del oncogén MYCN en neuroblastoma.



Tabla 1: Niveles de expresión de los 20 ARNm potencialmente interconectados con MYCN vía miRNAs comunes en neuroblastoma.

Estos genes mostraban un patrón de expresión génica claramente diferencial entre neuroblastomas MYCN amplificados, sobreexpresados, y no amplificados, infraexpresados. La mayoría de estos genes han sido descritos previamente en procesos de diferenciación celular o cáncer (80%) y una parte de ellos también en neuroblastoma. Entre ellos, 7 mostraban un

cambio de expresión de al menos 2 unidades de *fold-change*: *C2CD2*, *LMO3*, *PDGFRA*, *PRRG1*, *SLC2A4RG*, *SLC7A2* y *TWIST1*.

Nuestros resultados preliminares sugerían que el estado de amplificación de *MYCN* pudiera jugar un papel en la desregulación de los miRNAs afectando de forma indirecta la expresión de genes vía un efecto esponja de miRNAs compartidos²¹⁵. Actualmente estamos procediendo con la validación de los niveles de expresión, tanto de miRNAs como de ARN mensajeros, para después realizar ensayos funcionales que permitan estudiar la capacidad de los miRNA que hemos seleccionado de modular los niveles de expresión de genes de interés en la red de miRNA-ARNm identificada.

Conclusiones de nuestros resultados preliminares

- Existen cambios significativos de metilación del ADN en *loci* genómicos asociados a miRNAs en neuroblastoma y estos se asocian a subgrupos de relevancia clínica.
- Los neuroblastomas del alto riesgo clínico y/o *MYCN* amplificados se caracterizan por hipermetilación en *loci* genómicos asociados a miRNAs y una menor expresión de miRNAs.
- Los patrones expresión de miRNAs en neuroblastoma muestran una posible asociación con el estado de amplificación del oncogén *MYCN*.
- Generamos una herramienta que correlacionaba los miRNAs diferencialmente expresados con sus dianas de ARNm basándonos en la base de datos TargetScan.
- Identificamos una posible red de miRNAs-ARN mensajeros en base a la amplificación *MYCN* en la cual el ARNm del oncogén pudiera estar afectando de forma indirecta la expresión de genes en neuroblastoma vía un efecto esponja de miRNAs compartidos.

