

ARTÍCULO

Recibido el 5 de diciembre de 2016 | Aceptado el 4 de mayo de 2017 | Publicado el 15 de junio de 2017

DOI: 10.1038/ncomms15816

El paisaje genómico de la esclerosis tuberosa complejo

Katie R. Martin¹, Wanding Zhou², Megan J. Bowman³, Juliann Shih⁴, Kit Sing Au⁵, Kristin E. Dittenhafer-Reed¹, Kellie A. Sisson¹, Julie Koeman⁶, Daniel J. Weisenberger⁷, Sandra L. Cottingham⁸, Steven T. DeRoos⁹, Orrin Devinsky¹⁰, Mary E. Winn³, Andrew D. Cherniack⁴, Hui Shen², Hope Northrup⁵, Darcy A. Krueger¹¹ y Jeffrey P. MacKeigan^{1,12}

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es una enfermedad genética rara que causa un crecimiento multisistémico de

Tumores benignos y otras lesiones hamartomatosas, que dan lugar a diversas y debilitantes

Síntomas clínicos. Los pacientes nacen con mutaciones TSC1 o TSC2 y la inactivación somática de

Los alelos de tipo salvaje impulsan la activación de MTOR; sin embargo, los segundos impactos en TSC1/TSC2 no siempre son

observado. Aquí, presentamos el panorama genómico de los hamartomas de TSC. Determinamos que

Las lesiones de TSC contienen una carga mutacional somática baja en relación con los carcinomas, una característica de subconjunto

aberraciones cromosómicas a gran escala y firmas moleculares altamente conservadas para cada una

El tipo existe. Análisis de las firmas moleculares acoplado con enfoques computacionales.

Revela aspectos únicos de la heterogeneidad celular y el origen celular. Utilizando conjuntos de datos inmunitarios,

Identificar neuroinflamación significativa en tumores cerebrales asociados a TSC. En conjunto, esto

El catálogo molecular de TSC sirve como recurso sobre el origen de estos hamartomas y

Proporciona un marco que unifica las dimensiones genómicas y transcriptómicas para enfermedades complejas.

tumores.

¹ 2 Centro de Cáncer y Biología Celular, Instituto de Investigación Van Andel, 333 Bostwick Avenue NE, Grand Rapids, Michigan 49503, EE. UU.

⁴ Instituto, 333 Bostwick Avenue NE, Grand Rapids, Michigan 49503, EE. UU.

Centro de Epigenética,

³ Núcleo de Bioinformática y Bioestadística, Van Andel Research

Programa de Cáncer, Instituto Broad de Harvard y MIT, 415 Main Street, Cambridge,

Massachusetts 02142, EE. UU. ⁵Departamento de Pediatría, Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en la Facultad de Medicina de Houston-McGovern, 6431 Fannin,

⁶ Houston, Texas 77030, Estados Unidos. Núcleo de Citogenética y Patología, Instituto de Investigación Van Andel, 333 Bostwick Avenue NE, Grand Rapids, Michigan 49503,

EE. UU. ⁷Norris Comprehensive Cancer Center, Universidad del Sur de California, 1450 Biggy Street, Los Ángeles, California 90033, EE. UU. ⁸Departamento de

Patología, Spectrum Health System, 100 Michigan Street NE, Grand Rapids, Michigan 49503, EE. UU. ⁹División de Neurología Pediátrica, Helen DeVos Children's

Hospital, Spectrum Health System, 100 Michigan Street NE, Grand Rapids, Michigan 49503, EE. UU. ¹⁰Departamento de Neurología, Facultad de Neurología de la Universidad de Nueva York

de Medicina, 223 E 34 Street, Nueva York, Nueva York 10016, EE. UU. ¹¹División de Neurología, Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati, 3333 Burnet Avenue,

¹² Cincinnati, Ohio 45229, EE. UU.

Facultad de Medicina Humana, Universidad Estatal de Michigan, 220 Trowbridge Road, East Lansing, Michigan 48824, EE. UU.

La correspondencia y las solicitudes de materiales deben dirigirse a JPM (correo electrónico: mackeig1@msu.edu).

Enfermedad genética autosómica dominante que afecta a B1 en 6.000 El complejo de los genes *TSC1* y *TSC2* es una enfermedad neuromuscular altamente variable de tumores benignos y otras lesiones hamartomatosas que causan diversos problemas clínicos⁵.

Los crecimientos cerebrales anormales son una de las características más comunes de la esclerosis tuberosa y provocan epilepsia, retraso en el desarrollo, deterioro cognitivo, autismo, problemas de conducta e hidrocefalia.

Las más prevalentes son los tubérculos corticales, malformaciones principalmente estáticas de la corteza cerebral, presentes al nacer y asociadas con actividad convulsiva^{3,6}. Aproximadamente el 80 % de los pacientes desarrollan nódulos subependimarios (SEN) en las paredes del ventrículo lateral, que pueden progresar a astrocitomas subependimarios de células gigantes (SEGA), tumores más grandes y bien delimitados cerca del foramen de Monro. Diversos estudios han sugerido una asociación entre lesiones cerebrales y síntomas neurológicos en pacientes con CET, lo que subraya la necesidad de comprender y reducir estos crecimientos para mejorar la calidad de vida^{7–10}.

Otros órganos importantes afectados por lesiones de CET son la piel, el riñón, el pulmón y el corazón. Las lesiones cutáneas incluyen máculas hipomelanóticas y angiofibromas faciales, que constituyen características diagnósticas importantes de la CET y afectan a casi todos los pacientes con esta enfermedad. Los angiomiolipomas renales (AR) afectan a más del 70 % de los pacientes y suelen ser lesiones benignas que pueden causar disfunción renal y requerir tratamiento si son significativamente grandes, abundantes o susceptibles a hemorragias^{¹¹}. De hecho, los AR son la causa más común de mortalidad en pacientes adultos con CET^{¹²}. Finalmente, los tumores cardíacos denominados rabdomiomas cardíacos (CRM) constituyen otra característica diagnóstica importante de la CET, ya que pueden detectarse prenatalmente y son más comunes en lactantes.

Aunque la TSC puede ser hereditaria (familiar), con mayor frecuencia es el resultado de mutaciones de novo (esporádicas) de la línea germinal en uno de dos genes supresores de tumores, *TSC1* (que codifica TSC1, también conocido como hamartina) y *TSC2* (que codifica TSC2 o tuberina)^{13–15}. Se han identificado mutaciones de la línea germinal puramente heterocigóticas, así como mutaciones en mosaico, en pacientes con TSC^{16–19}. Junto con TBC1D7, *TSC1* y *TSC2* forman un complejo físico que sustenta la actividad de la proteína activadora de GTPasa (GAP) de *TSC2* hacia la pequeña GTPasa, RHEB, un regulador directo y positivo de MTOR (específicamente, el complejo MTOR I o MTORC1)²⁰. MTORC1 integra señales de factores de crecimiento, aminoácidos y energía para promover el crecimiento, la división y la supervivencia celular. En consecuencia, las mutaciones de pérdida de función en *TSC1* o *TSC2* provocan una activación constitutiva de MTORC1 desacoplada de las señales de entrada. Este conocimiento molecular condujo a la evaluación de los inhibidores de MTOR en ensayos clínicos y a la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su uso terapéutico en pacientes con CET (Cepa de la Esclerosis Múltiple)^{21–25}. A pesar de su considerable potencial, los inhibidores de MTOR no presentan una eficacia universal en la población con CET, no logran mantener la reducción tumoral tras la interrupción del tratamiento y pueden estar asociados a efectos secundarios indeseables^{23,25,26}. Por lo tanto, persiste la necesidad crítica de desarrollar opciones terapéuticas adicionales para la CET, incluyendo aquellas dirigidas al complejo de los genes *TSC1* y *TSC2*.

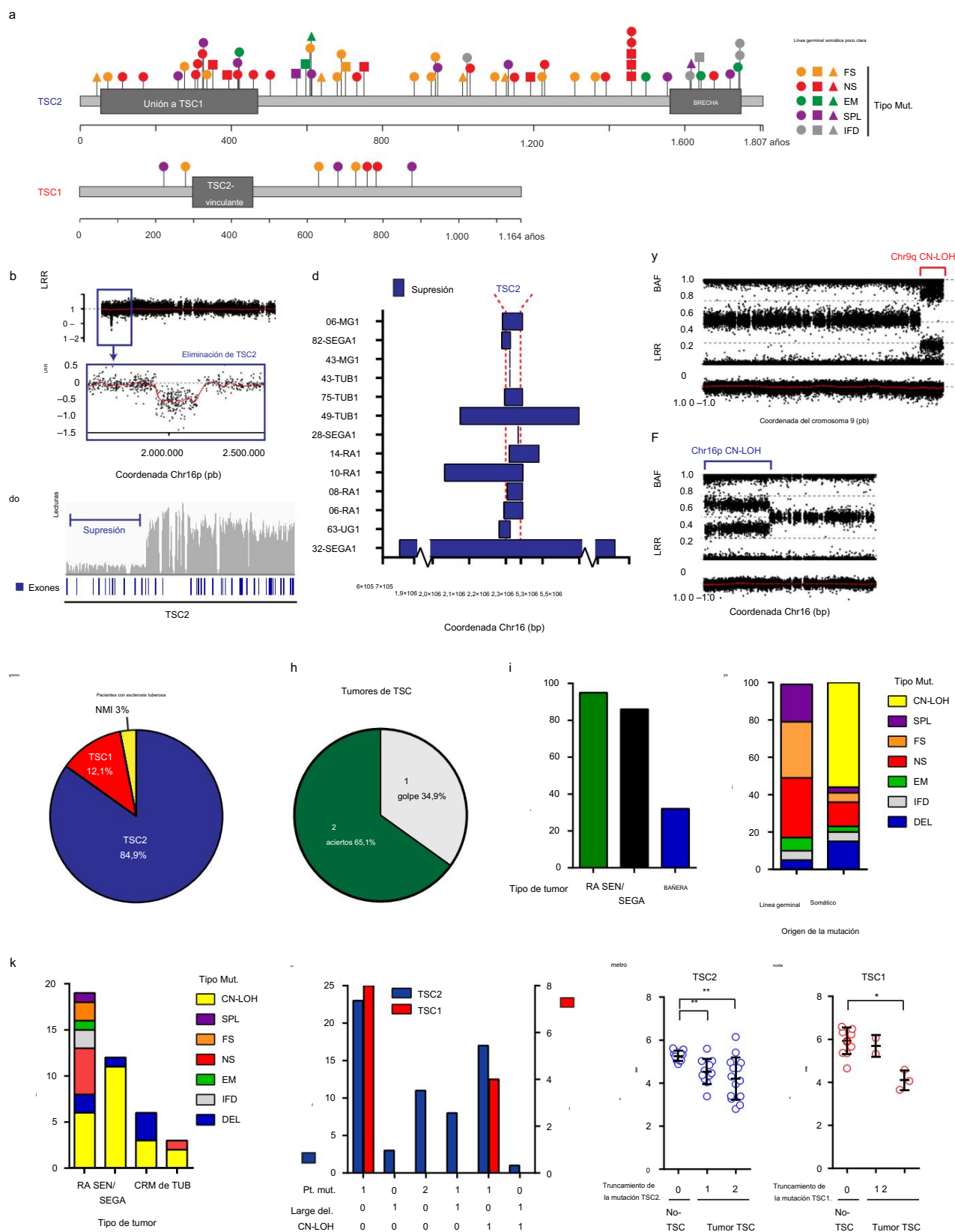
Si bien las lesiones de CET pueden desarrollarse por inactivación somática de *TSC1/TSC2*, no siempre se observan mutaciones secundarias, especialmente en lesiones cerebrales, lo que sugiere que otros mecanismos podrían contribuir a su crecimiento^{27–32}. Además, se desconocen los cambios moleculares colectivos que subyacen al crecimiento tumoral de CET, pero son esenciales para comprender la etiología de la enfermedad y desarrollar terapias. Para abordar esto, implementamos un estudio genómico exhaustivo para caracterizar el panorama molecular de la CET.

Evaluamos 111 tejidos asociados a TSC para determinar el estado de *TSC1/TSC2*, mutaciones del ADN, aberraciones en el número de copias, expresión génica diferencial y patrones de metilación del ADN. Observamos que, a diferencia de la mayoría de las AR y SEN/SEGA, solo un tercio de los tubérculos corticales se ven impulsados por la inactivación somática de *TSC1/TSC2*, lo que sugiere

Una mutación monoalélica puede ser suficiente para causar una malformación cortical. Además, descubrimos que la mayoría de las lesiones de TSC tienen una baja carga mutacional somática, a diferencia de los tumores malignos. En cambio, se encuentran grandes aberraciones cromosómicas a nivel de brazo en tumores de un subconjunto de pacientes (11%). Descubrimos firmas de expresión génica conservadas para cada tipo de lesión y utilizamos la clasificación celular computacional para identificar componentes individuales de tumores pleiotrópicos. Además, identificamos una firma de expresión inmunitaria sustancial en tumores cerebrales asociados a TSC, particularmente SEN/SEGA, que está respaldada por inmunohistoquímica. En conjunto, este estudio proporciona un panorama genómico completo de TSC, conocimiento sobre la célula de origen y unifica las firmas moleculares de estos tumores complejos.

Resultados Espectro mutacional de *TSC1* y *TSC2*. Se aislaron ADN genómico y ARN total de 78 lesiones de TSC congeladas en fresco, incluyendo 31 tubérculos corticales (TUB), 20 RA, 20 SEN/SEGA (2 SEN y 18 SEGA, que representan un continuo del mismo tumor), 5 CRM y 2 lesiones cutáneas. Además, se incluyeron 33 tejidos no tumorales asociados a TSC y 16 tejidos cerebrales y renales no TSC (normales). Cuando el material genético lo permitió, las muestras se analizaron en las siguientes plataformas: secuenciación de exoma completo (WES), matrices de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) Illumina Infinium Omni2.5, BeadArrays Illumina Infinium HumanMethylation450 (HM450), secuenciación profunda dirigida de *TSC1/TSC2* y secuenciación de ARNm (RNAseq). Los prefijos de los nombres de las muestras corresponden a los identificadores de los pacientes y los sufijos indican muestras de tejido individuales (por ejemplo, 01-RA1 denota la muestra de AR 1 del paciente 01). Toda la información disponible sobre las muestras se presenta en los Datos Suplementarios 1.

Nuestro primer objetivo fue caracterizar el espectro mutacional de *TSC1* y *TSC2* (refs 2,14). Para ello, utilizamos WES para definir mutaciones puntuales (variantes de un solo nucleótido o SNV) y pequeñas inserciones o deleciones (INDEL), y matrices de SNP de alta resolución para identificar grandes deleciones y regiones de pérdida de heterocigosidad de copia neutral (CN-LOH). También sospechamos que una pequeña fracción de las mutaciones de *TSC1/TSC2* podría pasar desapercibida con estas dos plataformas, incluyendo mutaciones sistémicas en mosaico o somáticas subclonales que ocurren con bajas frecuencias alélicas, deleciones de tamaño mediano más allá de la captura de WES y ausentes en la segmentación del número de copias a mayor escala basada en matrices de SNP, y mutaciones encontradas en regiones de baja cobertura (por ejemplo, mutaciones de empalme dentro de intrones). Para abordar esto, implementamos una secuenciación profunda dirigida de todos los loci *TSC1* y *TSC2*, incluidos los elementos aguas arriba y aguas abajo, intrones y exones, para detectar mejor dichas mutaciones. En conjunto, identificamos 57 mutaciones de ADN únicas (SNV e INDEL) en *TSC2* y ocho en *TSC1* de tejidos normales y lesionados (Fig. 1a y Datos suplementarios 2). La mayoría de las mutaciones se observaron en un solo individuo, con la excepción de dos mutaciones *TSC2*, que fueron compartidas por dos de los mismos pacientes no relacionados. Las mutaciones se distribuyeron en cada locus sin enriquecimiento en dominios específicos o puntos calientes³³. La secuenciación dirigida identificó mutaciones puntuales en tejido no tumoral de tres pacientes que no fueron detectadas por WES. Estas incluyeron una mutación de empalme de línea germinal heterocigótica en un límite exón-intrón en *TSC1* (62-UG1) y dos mutaciones aparentemente en mosaico encontradas en <5% de frecuencia alélica (en los pacientes 57 y 74). También identificamos dos mutaciones somáticas de baja frecuencia en *TSC2* en tejidos tumorales: una mutación por desplazamiento del marco de lectura en 18-RA1 y una mutación sin sentido en 06-RA1. Esta última coincidió con una mutación somática en *TSC2* ya identificada por WES, lo que sugiere que segundos impactos independientes impulsaron el crecimiento subclonal.



Dentro del tumor. Este enfoque también permitió el mapeo preciso de las deleciones observadas inicialmente mediante la matriz de SNP y la detección de deleciones intragénicas por debajo de los límites de detección de la matriz de SNP, incluyendo una deleción que abarca un solo exón en el paciente

(Fig. 2 suplementaria). Mediante matrices de SNP, se encontraron deleciones mayores (4100 pb) en TSC2 en once pacientes, con un tamaño que oscilaba entre 462 pb y 4,8 Mb, con una mediana de 48,6 kb (Fig. 1b-d y Datos suplementarios 2). Además, se utilizaron matrices de SNP para

Detectamos regiones de CN-LOH, identificadas como áreas donde las frecuencias del alelo B (BAF) divergen del estado heterocigoto, mientras que el número de copias (cociente log-R) permanece estable (Fig. 1e,f y Datos Suplementarios 2). Estas afectaron a TSC2 (cromosoma 16p13) en 18 lesiones y a TSC1 (cromosoma 9q34) en 4. Finalmente, utilizamos matrices HM450 para evaluar los perfiles de metilación del ADN en todo el genoma, centrándonos en los promotores y los cuerpos génicos de TSC1/TSC2. No encontramos evidencia de silenciamiento epigenético de TSC1 ni de TSC2 en ningún tejido (Fig. Suplementaria 1).

En conjunto, identificamos mutaciones en TSC1/TSC2 en 64 de 66 (97%) pacientes (84,9% TSC2 y 12,1% TSC1), dejando a dos pacientes (3%) sin mutación identificada (NMI), un porcentaje menor que las estimaciones previas basadas en pruebas moleculares convencionales^{15,33} (Fig. 1g). No se encontraron mutaciones en otros genes de la vía MTOR en estos dos pacientes NMI, ni tampoco se encontraron genes con variantes germinales y somáticas, lo que respalda la hipótesis de que no existe un tercer locus causante de TSC («TSC3»).

Dado que se cree que las lesiones de TSC surgen según el modelo de tumorigénesis de dos impactos de Knudson, investigamos específicamente el origen germinal y somático de las mutaciones TSC1/TSC2 presentes en estos tejidos. En el caso de las lesiones sin muestras normales compatibles con el paciente, realizamos predicciones sobre el origen somático o germinal de las mutaciones (indicadas con asteriscos en los Datos Suplementarios 2; véase Métodos) basándonos principalmente en las frecuencias alélicas. Descubrimos que aproximadamente dos tercios de los hamartomas de pacientes con TSC1/TSC2 albergaban dos hits de TSC, incluyendo la mayoría de los AR y SEN/SEGA, mientras que se encontraron segundos hits en solo el 35% de los tubérculos corticales (Fig. 1h,i). Los INDEL por cambio de marco de lectura y las mutaciones de splicing rara vez ocurrieron somáticamente, a pesar de representar más de la mitad de las mutaciones de la línea germinal. En cambio, los eventos CN-LOH, que surgen de errores en la recombinación mitótica, fueron el tipo más común de segundo hit y casi el evento somático exclusivo en SEN/SEGA (Fig. 1j,k). Tanto para TSC1 como para TSC2, las lesiones con mutaciones puntuales únicas o mutaciones puntuales en combinación con CN-LOH fueron las más comunes, aunque también se encontraron lesiones TSC2 con dos mutaciones puntuales y combinaciones que involucraban grandes deleciones, en contraste con TSC1 (Fig. 1l). Finalmente, quisimos determinar si la expresión de TSC1 y TSC2 disminuía en lesiones con mutaciones que predecían una disminución o truncamiento de los transcritos. A pesar de la considerable heterogeneidad, los tumores con una o dos mutaciones truncantes en TSC2 mostraron niveles reducidos de transcritos de ARNm de TSC2 en comparación con los tejidos sin TSC (pruebas t de Welch pareadas; p ajustada por FDR = 0,01) (Fig. 1m). De manera similar, los tumores con dos mutaciones truncadas de TSC1 mostraron un nivel más bajo de ARNm de TSC1 en comparación con el tejido sin TSC (pruebas t de Welch por pares; P ajustada por FDR ¼ 0,03) (Fig. 1n).

El panorama mutacional de los tumores TSC es discreto. Además de TSC1/TSC2, planteamos la hipótesis de que las lesiones pueden adquirir mutaciones en otros genes, incluyendo aquellos que afectan el crecimiento tumoral. Para comprobarlo, perfilamos el genoma codificante de 42 lesiones.

Se compararon con muestras normales mediante WES. Se observó una tasa mediana de mutación somática de 0,31 mutaciones por megabase (Mb) de ADN (rango: 0,16-3,8 mutaciones por Mb), incluyendo SNV silenciosas y no silenciosas e INDEL pequeños, con una fracción alélica variante (FVA) mediana de 0,13 (Fig. 2a y Datos suplementarios 3). Esta tasa de mutación es sustancialmente menor que la de casi todos los tipos de tumores malignos, con la excepción de la leucemia mieloide aguda (LMA) (Fig. 2b). Se observó que 10 de 42 tumores (24%) contenían al menos una mutación somática en un candidato o

gen impulsor de tumores de alta confianza³⁴, aunque no hubo enriquecimiento en tumores que carecían de inactivación somática de TSC1/TSC2 (es decir, tumores con menos de dos mutaciones de TSC1/TSC2) (Datos suplementarios 3). Además, no se observaron mutaciones específicas recurrentes en los pacientes y solo dos genes presentaron mutación somática en más de un paciente. Cabe destacar que tampoco se encontraron mutaciones somáticas en ningún otro gen de la vía MTOR.

Un subconjunto de tumores TSC alberga grandes aberraciones cromosómicas. Dada esta baja carga mutacional, nuestro siguiente objetivo fue determinar si existen grandes aberraciones del número de copias cromosómicas (CNA) que puedan desempeñar un papel en el desarrollo tumoral. Además de las deleciones y los eventos CN-LOH que involucran a TSC1/TSC2, descubrimos que nueve lesiones de ocho pacientes con TSC albergaban CNA grandes (a nivel de brazo o cromosoma completo) en otras ubicaciones cromosómicas (Fig. 2c,d y Datos suplementarios 4 y 5). Esto incluía CNA de los cromosomas 1 y 12 en cuatro tumores cada uno, y CNA de los cromosomas 5, 7, 11, 17 y 19 en dos tumores cada uno. Las CNA restantes no se compartían entre múltiples tumores. Estas CNA se encontraron en cada uno de los principales tipos de lesión estudiados (RA, TUB, SEN/SEGA), así como en CRM, y no se encontraron en ningún tejido normal (sin lesión). Cinco de estos tumores portadores de CNA también mostraron CN-LOH TSC1/TSC2, y en todos los casos, una mayor fracción de ADN se vio afectada por el evento CN-LOH que estos CNA, lo que sugiere que se produjeron posteriormente a un evento LOH desencadenante. Cabe destacar que utilizamos hibridación in situ fluorescente (FISH) en secciones tumorales recién congeladas para confirmar 24 de los 25 (96%) eventos a nivel de brazo detectados molecularmente (Fig. 2e y Tabla Suplementaria 1).

Los AR presentan características adiposas y de PEComa. Nuestro siguiente objetivo fue definir las firmas moleculares de cada tipo de lesión hamartomatosa de TSC mediante la metilación del ADN a nivel de todo el genoma y el perfil de transcripción. La agrupación no supervisada de los datos de la matriz de metilación del ADN reveló que las lesiones de cada tipo se agrupaban entre sí y se separaban de sus homólogos de tejido normal (no TSC), lo que sugiere un alto grado de conservación molecular dentro de cada una (Fig. 3 del Suplemento). Para investigar la metilación específica del tumor, calculamos la fracción de hipermetilación de cada lesión como la fracción de sondas metiladas que carecen de metilación en un panel de tejidos normales. Entre las lesiones de TSC, los AR presentaron la fracción de hipermetilación más alta (Fig. 3a). Si bien este nivel fue solo una fracción de la hipermetilación observada en tumores malignos.

Figura 1 | Espectro mutacional de TSC1 y TSC2 en muestras de pacientes con CET. (a) SNV e INDEL en TSC2 y TSC1 (cada mutación se muestra solo una vez por paciente). (b) Gran deleción de TSC2 en 10-RA1 identificada mediante matriz de SNP. Puntos negros: razones log-R (LRR) de las intensidades de la sonda; panel inferior: ampliación de la región recuadrada. (c) Deleción intragénica de TSC2 en 63-UG1 identificada mediante secuenciación dirigida; barras grises: recuentos de lecturas a lo largo de TSC2; barras azules: exones. (d) Barras azules: grandes deleciones en TSC2. El eje X está roto para acomodar la deleción de 32-SEGA1. (e,f) Ejemplo de eventos CN-LOH que involucran a TSC1 en el cromosoma 9q en 38-SEGA1 (e) y a TSC2 en el cromosoma 16p en 27-SEGA1 (f). (g) Porcentaje de 66 pacientes con TSC con una mutación en TSC1, TSC2 o ninguna (NMI). (h) Porcentaje de tumores con 1 o 2 mutaciones en TSC1/TSC2 identificadas. (i) Porcentaje de tumores mutantes en TSC1/TSC2 con 2 hits. Solo se incluyeron lesiones de 1 hit con las 3 plataformas de ADN completadas (Datos Suplementarios 2). (j) Porcentaje de mutaciones germinales y somáticas en TSC1/TSC2 de cada tipo. (k) Número total de mutaciones en TSC1/TSC2 de cada clase para cada tipo de lesión. (l) Combinaciones de mutaciones en tumores mutantes en TSC1 y TSC2. (m,n) Expresión relativa de ARNm de TSC2 (m) y TSC1 (n) en tejidos no TSC (n ¼ 11) y lesiones TSC agrupadas por estado mutacional (mutación TSC2: 1 (n ¼ 11) o 2 (n ¼ 14); mutación TSC1: 1 (n ¼ 2) o 2 (n ¼ 3)). Valores P ajustados por FDR de pruebas t de Welch individuales: **P^{0,01}; *P^{0,05}. Los círculos abiertos representan tumores individuales y las barras representan media y DE CN-LOH, pérdida de heterocigosidad neutral en cuanto a copia; CPM, conteos por millón; DEL, deleción; FS, cambio de marco; IFD, deleción en marco; MS, sin sentido; Mut, mutación; NMI, ninguna mutación identificada; NS, sin sentido; SPL, empalme.

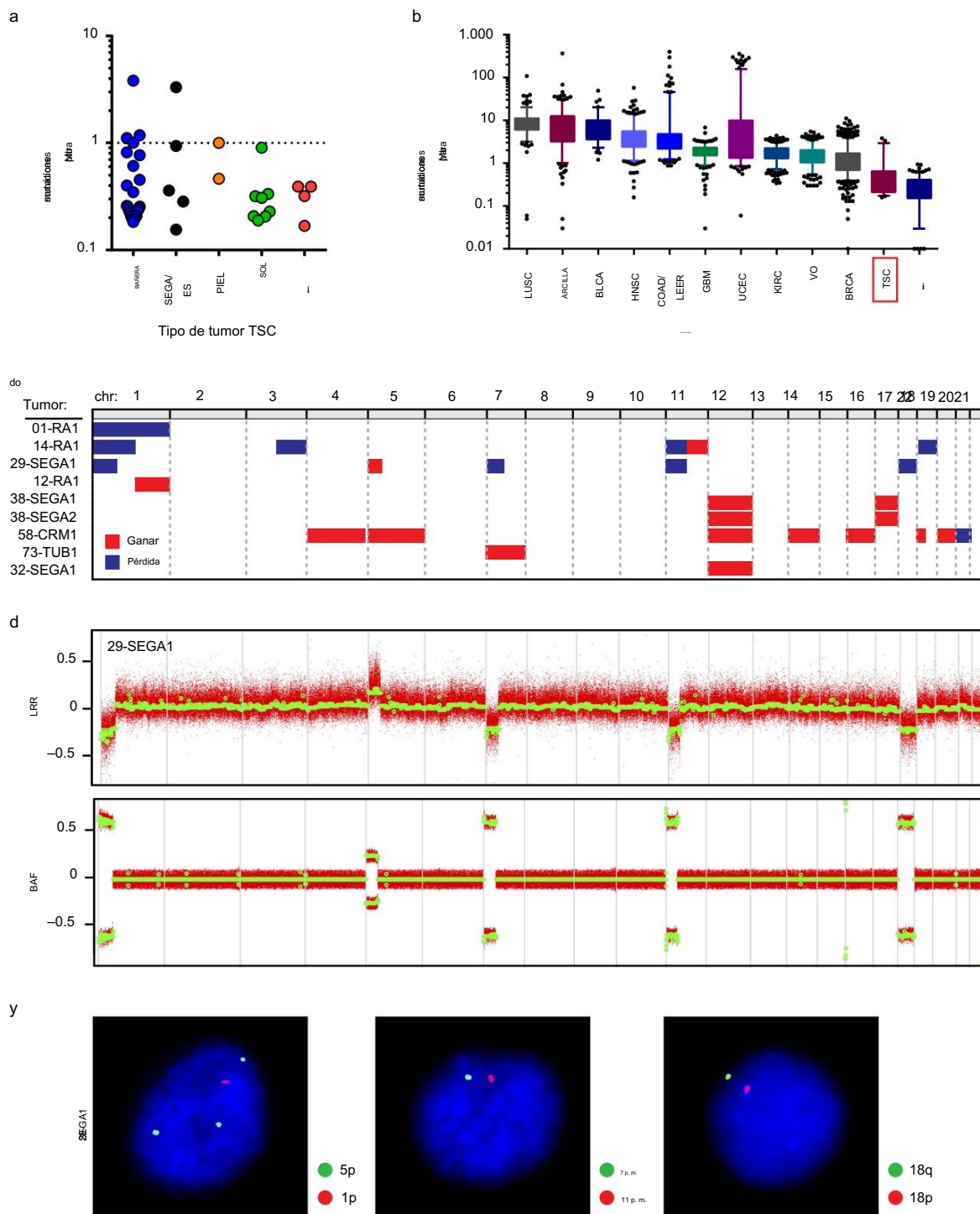


Figura 2 | Las lesiones de TSC mutan con poca frecuencia, con grandes aberraciones cromosómicas identificadas en un subconjunto. (a) Cada símbolo representa el número de mutaciones somáticas, incluyendo mutaciones puntuales e INDEL, por Mb de ADN genómico. (b) Las mutaciones somáticas por Mb para lesiones cancerosas y de TSC se muestran como cuadros (percentil 25 al 75) y bigotes (percentil 5 al 95). Los valores atípicos se muestran como puntos de datos individuales. (c) Se utilizó GISTIC para llamar a los CNA completos y a nivel de brazo utilizando datos de matriz de SNP procesados. Las ganancias (3n) se muestran en rojo y las pérdidas (1n) se muestran en azul. (d) Todos los CNA se confirmaron visualmente con gráficos LRR y BAF de todo el genoma. Se muestra 29-SEGA1 como ejemplo. (e) Se utilizó FISH para confirmar los CNA grandes. Los núcleos representativos, teñidos con DAPI en azul, muestran un único punto fluorescente utilizando sondas en los cromosomas 1p, 11p, 7p, 18p y 18q, y tres puntos fluorescentes utilizando una sonda en el cromosoma 5p, lo que confirma pérdidas y ganancias, respectivamente. AML, leucemia mieloide aguda; BLCA, carcinoma urotelial de vejiga; BRCA, carcinoma invasivo de mama; COAD, adenocarcinoma de colon; GBM, glioblastoma multiforme; HNSC, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; KIRC, carcinoma renal de células claras; LUAD, adenocarcinoma de pulmón; LUSC, carcinoma de células escamosas de pulmón; OV, cistadenocarcinoma seroso de ovario; READ, adenocarcinoma de recto; TSC, complejo de esclerosis tuberosa; UCEC, carcinoma endometrial del cuerpo uterino.

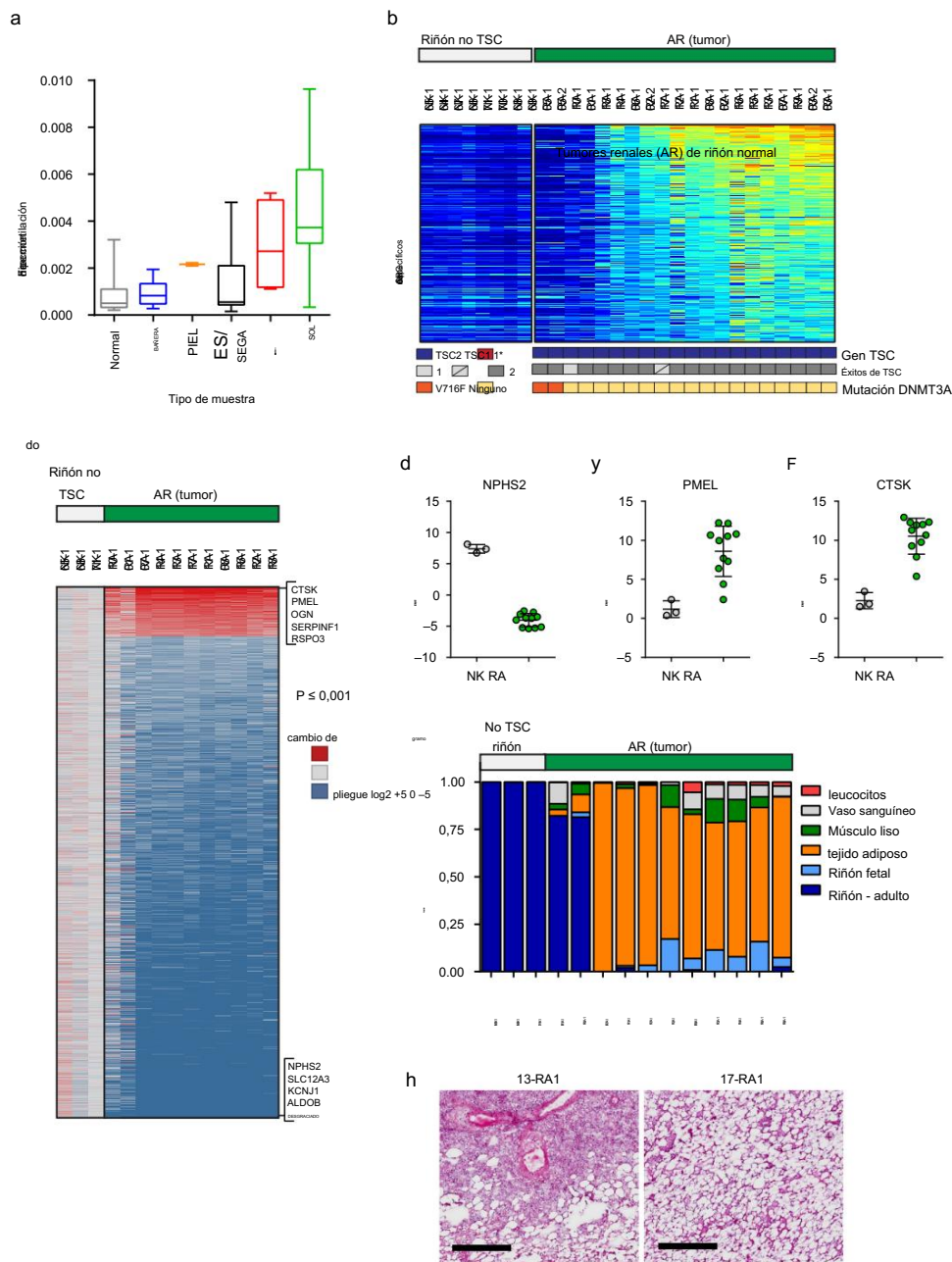


Figura 3 | Metilación compartida y características transcripcionales de angiomiolipomas. (a) Fracción de hipermetilación de tumores TSC (recuadros: percentil 25 a 75; bigotes: mínimo a máximo; línea: mediana). (b) 240 sondas específicas de AR. Intensidad de señal de la sonda mostrada de baja (azul) a alta (rojo). Muestras anotadas para mutación germinal (azul: TSC2; rojo: TSC1), 1 o 2 coincidencias de TSC (mutación germinal + somática) con '1' indicando solo 1 mutación encontrada, pero datos de la secuenciación dirigida de TSC1/TSC2 no disponibles, y estado de DNMT3A (amarillo: tipo silvestre; naranja: mutación somática V716F). (c) Genes expresados diferencialmente en tumores AR comparados con muestras de riñón no-TSC (log2 fold-change $p < 0,001$ ajustada) coloreados por log2 fold-changes según la escala (azul: bajo; rojo: alto). Se indican los 5 DEG principales sobreexpresados y desexpresados. (d-f) Valores de CPM log2 normalizados para NPHS2, PMEL y CTSK para riñón no-TSC (NK; gris) y AR (verde). Los símbolos representan muestras individuales. Línea: media; barras de error: DE ($n = 3$ riñón no-TSC; $n = 11$ AR). (g) Fracción relativa de tipos celulares estimada por CIBERSORT (rojo: leucocitos; gris: vaso sanguíneo; verde: músculo liso; naranja: adiposo; azul claro: riñón fetal; azul oscuro: riñón adulto). (h) Secciones de tejido de 13-RA1 teñidas con hematoxilina y eosina (que muestran músculo liso que rodea la vasculatura y bolsas de tejido adiposo) y 17-RA1 (tejido adiposo casi exclusivamente). Barras de escala, 500 μ m.

(Fig. 4a suplementaria), identificamos 240 sondas CpG, que asignan a 149 genes, con metilación enriquecida en AR en comparación con riñones normales sin TSC (Fig. 3b y Datos suplementarios 6). Se sabe que varios genes metilados, incluidos WT1, SIX2, SLIT2, EMX2 y OSR1, desempeñan funciones en el desarrollo renal^{35,36}. Para determinar si esta metilación está asociada con diferencias (es decir, disminuciones) en la expresión genética, las cruzamos con los niveles de transcripción relativos determinados

Mediante RNAseq. De los 127 genes metilados detectados en nuestro ensayo de RNAseq, 13 se expresaron de forma significativamente diferencial en los AR, y todos, excepto uno, mostraron una expresión reducida en tumores (Fig. Suplementaria 4b). Si bien no se detectó una asociación estadísticamente significativa entre la hipermetilación y la expresión diferencial en todos los genes ($w(2, n = 16.408) = 1,873, p = 0,17$), la disminución de la expresión de 12 de 13 (92%) genes hipermetilados y expresados de forma

Tabla 1 | Análisis de red de los principales DEG en AR.

Proceso biológico GO*	Total genesw	Genes coincidentes	Valor P adj.
Disminución de la expresión			
Transporte transmembrana	769	50	3.74 10 ⁻¹⁸
Transporte transmembrana de aniones	61		3.49 10 ^{-5.80}
Transporte de iones	321	11	10 1.06 10 ⁻⁹
Transporte de iones de sodio	104	22	1.61 10 ^{-2.13}
Transporte transmembrana de iones de sodio	89	14	10 ⁻⁹
Excreción	40	13	12
Proceso metabólico de moléculas pequeñas	1.551	12	6.41 10 ^{-1.08}
Proceso metabólico xenobiótico	176	54 15	10 ⁻⁷

*Procesos biológicos de GO significativamente más enriquecidos (FDR ajustado (adj.) P<0,0001) de hasta 300 DEG (log2 fold-changes p / 42; adj. P<0,001). Solo aquellos procesos entre los 10 principales con Se muestran 410 genes coincidentes. La anidación se realiza según las relaciones padre-hijo de la ontología GO.
wNúmero total de genes en el proceso biológico GO.
zNúmero de genes en el proceso biológico GO que son DEG.
Valores de yP ajustados para comparaciones múltiples.

consistente con el silenciamiento inducido por metilación. Cuatro AR carecían de la firma de metilación compartida por la mayor parte de los AR, dos de que (del paciente 05) puede atribuirse a un problema somático. Se prevé que la mutación DNMT3A-V716F afecte a la metiltransferasa actividad (Fig. 3b)³⁷.

A continuación, interrogamos al transcriptoma de RA para establecer Si los patrones de expresión génica podrían brindar información sobre sus desarrollo. Para este esfuerzo, utilizamos datos de ARNseq de un panel de riñones normales no TSC y 11 muestras de AR para identificar 1.395 genes expresados diferencialmente (DEG; definidos por el cambio de log2) p / 42 y estadística t moderada por limma ajustada por FDR Po0,001) (Fig. 3c y Datos suplementarios 7)³⁸. Genes con La disminución más sustancial en la expresión incluyó a aquellos con funciones en la función renal normal, como NPHS2 (Fig. 3d), lo que refleja la pérdida de tejido renal normal. Consistentemente, la parte superior Los procesos biológicos significativamente enriquecidos entre los genes disminuyeron En los AR se relacionaron principalmente con el desarrollo normal de los riñones y Función (Tabla 1). Los AR se clasifican como PEComas, tumores que surgen de células epitelioideas perivasculares (PEC) que coexpresan marcadores de melanocitos, hueso, cartílago y músculo liso, probablemente lo que refleja un origen de la cresta neural³⁹. En consonancia con esto, los dos Los genes de AR más expresados fueron CTSK, que ha sido propuesto como un biomarcador robusto de PEComa, y PMEL, que codifica una proteína premelanosoma específica de los melanocitos (Fig. 3e,f)⁴⁰. De hecho, PMEL codifica la proteína diana de HMB-45 (gp100), un anticuerpo de diagnóstico utilizado para identificar AR y otros PEComas clínicamente⁴¹.

Para estimar la proporción relativa de diferentes tipos de células en RAs, empleamos CIBERSORT, un marco computacional para Clasificación virtual de mezclas celulares complejas mediante la expresión génica data⁴². Creamos una firma genética personalizada que diferencia las células. tipos que sospechamos que comprenden los AR: (a) tejido adiposo, liso músculo y vaso sanguíneo, que definen histológicamente las AR; (b) riñón adulto y fetal, con la hipótesis de que los AR pueden se parecen más al riñón fetal que al adulto; y (c) leucocitos, que frecuentemente se infiltran en el tumor microambientes. Como se esperaba, CIBERSORT predijo Las muestras de riñón no TSC deben estar compuestas exclusivamente de riñones normales. riñón adulto y, de manera similar, los dos AR con firmas DEG menos Al igual que los otros RA (01-RA1 y 10-RA1), también se Se prevé que contenga una cantidad significativa de tejido normal. (Fig. 3g). El resto de los AR se asemejaban a mezclas de tejido adiposo. tejido, músculo liso, vasos sanguíneos, leucocitos y riñón fetal tejido, y la mayoría muestra un enriquecimiento sorprendente en tejido adiposo (Fig. 3g). La pérdida de tejido renal normal y la presencia de la tres componentes conocidos de la AR, incluido el lipoma El fenotipo de muchos, fue apoyado por la histología (Fig. 3h).

Las lesiones cerebrales muestran evidencia de neuroinflamación significativa. De manera similar al enfoque que adoptamos para los RA, a continuación realizamos Análisis de la expresión génica diferencial de las dos clases principales de lesiones cerebrales asociadas a TSC, tubérculo cortical (n ¼ 15) y SEN/SEGA (n ¼ 15), utilizando tejidos cerebrales normales no TSC como controles negativos. Identificamos 3692 DEG (log2 fold-change) p / 42; estadística t moderada por limma ajustada por FDR Po0,001) en SEN/SEGAs y 297 DEGs en tubérculos corticales (Fig. 4a,b y Datos suplementarios 8 y 9). Casi todos los genes con disminución La expresión en los tubérculos corticales también disminuyó en SEN/SEGA, Ambos tipos de lesiones muestran una expresión disminuida de genes. relacionado con la transmisión sináptica (Fig. 4c y Tabla 2). Los SEN/SEGA mostraron una gran cantidad de genes disminuidos de forma única, que se asociaron con otros sistemas nerviosos normales procesos (Tabla 2).

Descubrimos que los genes aumentaron significativamente su expresión En ambos tipos de lesiones cerebrales se relacionaron con el sistema inmunológico. y la inflamación (Tabla 2). Procesamiento de antígenos y Presentación, específicamente, la clase principal de histocompatibilidad (MHC) II—fue un proceso mayor que se enriqueció significativamente entre los mayores SEN/SEGA DEGs (Tabla 2), que destacamos por Codificar por colores un mapa molecular de esta red según Cambios de plegamiento promedio en SEN/SEGA (Fig. 4d). La mayoría de los genes El aumento de expresión en los tubérculos también aumentó en expresión en SEN/SEGA, lo que refleja esta inmunidad compartida Firma (Fig. 4c). Para identificar genes con expresión discordante Entre los dos tipos de lesiones cerebrales, realizamos una última Análisis de la expresión génica diferencial entre el tubérculo cortical y SEN/SEGA. Si bien los genes disminuyeron de forma única en su expresión en SEN/SEGA nuevamente mapeado a procesos normales del sistema nervioso, Encontramos que la endocitosis y la angiogénesis mediadas por receptores fueron enriquecido entre genes aumentados en SEN/SEGA en comparación con tubérculo cortical (Tabla Suplementaria 2). Esta angiogénesis La firma puede contribuir a la naturaleza vascularizada conocida de SEGA. Cabe destacar que, si bien la señalización relacionada con MTOR... no fue identificado como enriquecido en este análisis, pudimos detectar un enriquecimiento de redes MTORC1 en SEN/SEGA (pero no TUB o RA) utilizando un segundo análisis de enriquecimiento de la vía (MetaCore) con menor rigor en nuestro análisis (Tabla Suplementaria 3).

Finalmente, queríamos explorar la neuroinflamación. fenotipo adicional que comenzamos empleando CIBERSORT para estimar la proporción de tipos de células que constituyen estas lesiones. Los tubérculos corticales mostraron una mezcla relativamente igual de neuronas adultas. y astrocitos, similares al tejido cerebral normal no TSC, junto con una pequeña fracción de leucocitos (<1%) (Fig. 5a). Mientras tanto, SEN/ Se estimó que los SEGA estaban enriquecidos en menos diferenciados

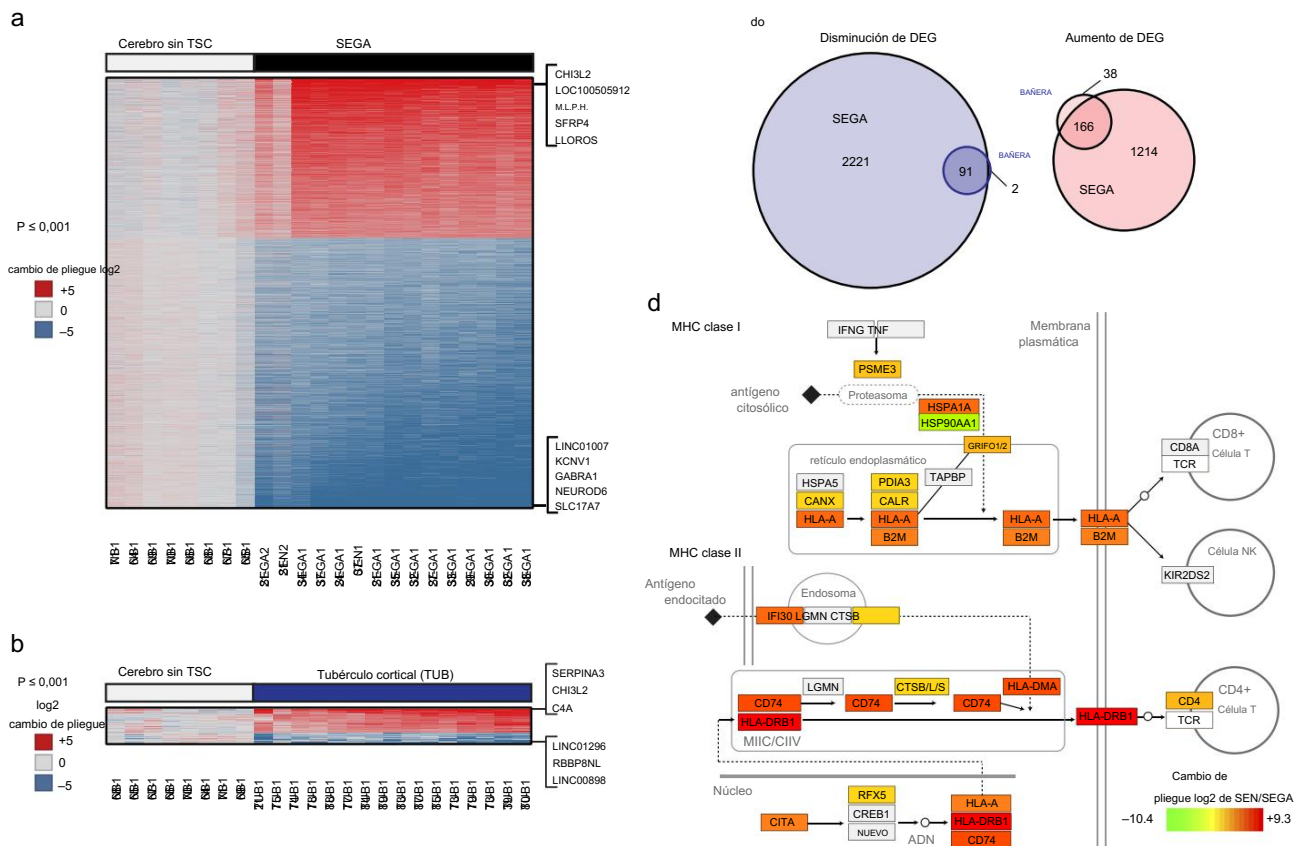


Figura 4 | Características compartidas de expresión génica de lesiones cerebrales asociadas a TSC. (a, b) Los genes expresados diferencialmente en SEN/SEGA (a) o tubérculos corticales (TUB) (b) en comparación con muestras de cerebro sin TSC (NB) ($\log_2$ fold-change $p / 42$; $P < \sup>0.001 </sup>$ ajustada) están coloreados por los fold-changes transformados en $\log_2$ de acuerdo con la escala (azul: bajo; rojo: alto). Los 5 y los 3 principales DEG aumentados y disminuidos se indican para SEGA (a) y tubérculos corticales (b), respectivamente. (c) Diagramas de Venn que muestran similitud en DEG entre TUB y SEGA (azul: DEG disminuidos; rojo: DEG aumentados). Los círculos están dimensionados de acuerdo con el número de DEG. (d) Mapa molecular del procesamiento y presentación de antígenos modificado de KEGG ID hsa04612. Los genes están coloreados de acuerdo con los fold-changes $\log_2$ en SEN/SEGA según la leyenda.

neuronas y astrocitos, un resultado corroborado por la disminución de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal conocidos (Fig. 5b). Además, los SEN/SEGA mostraron evidencia de niveles sustanciales de leucocitos (media del 12,3 %) (Fig. 5a). Para predecir la abundancia relativa de los componentes celulares inmunitario individuales encontrados en la fracción leucocitaria de las muestras de SEN/SEGA, utilizamos una firma genética que distingue 22 tipos de células inmunitarias⁴². Identificamos tres tipos de células inmunitarias con fracciones relativas que difieren más del triple entre el cerebro sin CET y los SEN/SEGA (pruebas t de Student bilaterales; $P < 0,05$ ajustada a FDR) (Datos suplementarios 10). En comparación con el tejido cerebral normal, se predijo que los SEN/SEGA estarían enriquecidos en monocitos y albergarían una población de macrófagos que cambiaron de un estado de reposo (M0) a uno activado (M2) (Fig. 5c). Mediante inmunohistoquímica (IHC) en secciones de un SEGA derivado de paciente fresco congelado, confirmamos la presencia de esta población de macrófagos activados (microglía) utilizando CD68 (marcador de macrófagos) y HLA-DR (un antígeno MHC de clase II), así como AIF1/IBA1 (marcador de microglía).

(Figura 5d).

Discusión:

Hemos presentado el retrato molecular más completo del TSC hasta la fecha, añadiendo información genómica más allá de los loci TSC1 y TSC2 bien descritos. Los genomas de las lesiones asociadas al TSC son relativamente simples, con tasas de mutación somática inferiores a las de la mayoría de los tumores malignos. La carga mutacional de las lesiones de TSC sugiere un bajo índice mitótico, en consonancia con su naturaleza de crecimiento lento y la falta de...

Exposición a terapias genotóxicas. En cambio, la característica más notable del ADN de los genomas de CET fueron las ganancias y pérdidas cromosómicas completas o a nivel de brazo, observadas en cuatro tipos de tumores diferentes en poco más del 10 % de los pacientes de nuestro estudio. Estas, en general (siete de nueve tumores), coexistieron con grandes aberraciones en TSC1/TSC2 (grandes deleciones o CN-LOH), lo que sugiere que ciertos genomas podrían ser menos estables estructuralmente. Se requieren estudios futuros para establecer el papel de estos CNA en el crecimiento tumoral de CET.

Al integrar la secuenciación profunda dirigida que abarcó intrones y exones con matrices de SNP de alta resolución, pudimos identificar mutaciones patógenas de TSC1/TSC2 en casi el 94% de los pacientes, dejando solo dos clasificados como NMI. Los casos restantes pueden explicarse por (a) mosaicismo, en el que solo una porción de células (y, por lo tanto, ADN) se ve afectada por una mutación; (b) un tercer locus de TSC (TSC3); o (c) mutaciones de TSC1/TSC2 a las que aún no se les ha atribuido patogenicidad, por ejemplo, mutaciones intrónicas que pueden afectar el splicing. Esta última parece la más plausible, ya que nuestras plataformas integradas demostraron ser sensibles para detectar mutaciones de baja frecuencia, incluido el mosaicismo de bajo nivel, y nuestro análisis WES no proporcionó evidencia de TSC3. Además, identificamos mutaciones intrónicas raras de TSC2 de significado desconocido en uno de los pacientes con NMI. Las pruebas genéticas de los progenitores biológicos y la evaluación bioquímica de estos mutantes determinarán si alguna de estas variantes es realmente patógena. En general, nuestros datos coinciden con una evaluación exhaustiva reciente de 53 pacientes con NMI mediante secuenciación profunda dirigida, que concluyó que el 85 % de los casos podrían explicarse por mutaciones en mosaico de baja frecuencia o mutaciones en intrones¹⁷.

Tabla 2 | Análisis de red de los principales DEG en lesiones cerebrales asociadas a TSC.

Proceso biológico GO*	Total genesw	SEGA		BAÑERA	
		Emparejado génesis	Valor P ajustado génesis	emparejado génesis	Valor P adj.
Aumento de la expresión					
Respuesta inmune	408	41	1.69 10 ⁻²¹	20	5.27 10 ^{-3.15} 9
Regulación de la respuesta inmune	146	—	—	12	10 3.01 10 ⁻⁸
Respuesta inmune innata	869	—	—	33	— 11
Vía de señalización mediada por interferón gamma	77	13	2.88 10 ^{-5.56} 10	—	—
Activación del complemento			10 4.37 10 ⁻¹⁰	—	—
Activación del complemento, vía clásica	51	11	4.33 10 ⁻¹⁰	—	—
Procesamiento y presentación de antígenos	64	12	15	—	—
Procesamiento de antígenos y presentación de antígenos peptídicos exógenos mediante MHC de clase II	62 93	16 12	2.64 10 ⁻⁸	—	—
Respuesta inflamatoria	360	22	4.29 10 ^{-1.03} 8	17	1.32 10 ⁻⁷
Organización de la matriz extracelular	316	20	10 ⁻⁷	—	—
Vía de señalización mediada por citocinas	279	—	—	14	8.67 10 ⁻⁷
Disminución de la expresión					
Transmisión sináptica	432	59	6.86 10 ^{-1.50} 38	10	1.58 10 ⁻⁵
Exocitosis de vesículas sinápticas	50	13	10 3.10 10 ⁻¹²	—	—
Transporte de neurotransmisores	36	10	2.48 10 ⁻¹⁰	—	—
secreción de neurotransmisores	65	14	5.87 10 ^{-1.75} 12	—	—
Exocitosis de neurotransmisores dependiente de iones calcio	33		10 2.54 10 ⁻¹²	—	—
Regulación del potencial de membrana	127	11	7.43 10 ⁻¹³	—	—
Transporte de iones	321	19	6.79 10 ⁻¹⁴	—	—
Regulación de la exocitosis dependiente de iones calcio		29	11	—	—
Proceso del sistema neurológico	31 52	10 11	10	—	—

*Procesos biológicos de GO significativamente más enriquecidos (FDR ajustado (adj.) P<0,0001) de hasta 300 DEG (log2 fold-changes $\geq$ 4; adj. P<0,001). Solo aquellos procesos entre los 10 principales con Se muestran 410 genes coincidentes. La anotación se realiza según las relaciones padre-hijo de la ontología GO. wNúmero total de genes en el proceso biológico GO. Número de genes en el proceso biológico GO que son DEG. '—' indica que no hay enriquecimiento significativo. Valores de yP ajustados para comparaciones múltiples. '—' indica que no hay enriquecimiento significativo.

Además de encontrar mutaciones en la línea germinal, también proporcionamos una Descripción detallada del segundo impacto del paisaje.

Tumores de estirpe tumoral (TSC). Nuestra observación de una diseminación somática de TSC. Inactivación en AR y segundos impactos menos frecuentes en tubérculos corticales es consistente con estudios previos27–32,43. Silenciamiento epigenético de Se ha postulado que TSC1/TSC2 explica una parte del 1-hit tumores y, de hecho, ha habido alguna evidencia de que TSC1/TSC2 están sujetos a metilación44,45. Sin embargo, encontramos No hay evidencia de metilación del promotor en 63 tejidos asociados a TSC analizado, reduciendo la probabilidad de que este mecanismo contribuya significativamente a la inactivación de TSC1/TSC2 en TSC.

Aunque nuestra segunda tasa de éxito en los tubérculos corticales (35%) fue mayor que la mayoría de los estudios anteriores, la inactivación somática de TSC en La formación de tubérculos corticales es claramente un fenómeno menos frecuente y más esporádico. Esto sugiere que sólo una pequeña porción del tubérculo es afectado por un segundo impacto (por ejemplo, un componente celular, como las células gigantes), lo que dificulta su identificación o que sea monoalélica. La inactivación de TSC1/TSC2 es suficiente para la malformación cortical.

Esto último está respaldado por el hecho de que los tubérculos corticales se forman prenatalmente, se encuentran en la mayoría de los pacientes con CET, y a pesar de Algunas evidencias de proliferación46, carecen de un crecimiento apreciable en tamaño o número a lo largo del tiempo. Estas características son consistentes con una origen del desarrollo en lugar de formación neoplásica a través de la adquisición esporádica de mutaciones somáticas TSC1/TSC2 a lo largo del tiempo. Este concepto de haploinsuficiencia es consistente con otros Características de esta enfermedad, como las cognitivas y conductuales. deficiencias y, en cierto grado, epilepsia47–49. El segundo

Los impactos encontrados en una minoría de tubérculos corticales pueden contribuir a la formación de tubérculos. patología, aunque es poco probable que representen un requisito para su formación.

Curiosamente, dos de las mutaciones somáticas de TSC en la corteza Los tubérculos (44-TUB1 y 50-TUB1) eran inusuales y parecían

Implican la pérdida de intrones TSC1 o TSC2. Los intrones eliminados eran continuos y los puntos de interrupción parecían estar precisamente en límites exón-intrón, lo que plantea la posibilidad de que sean la consecuencia de eventos de retroduplicación somática donde Se integran copias transcritas inversamente de genes que carecen de intrones en el genoma, formando un pseudogén procesado. Tales eventos están ampliamente presentes en la evolución de la línea germinal humana, pero también tienen Recientemente se ha informado que se presenta en cánceres50–52. Una capa adicional de La intriga surge del hecho de que uno de estos eventos afectó a TSC1. pero se encontró en un paciente con una línea germinal patógena TSC2 mutación. Se informó previamente de un caso similar en el que un Se identificó una mutación somática de baja frecuencia TSC1 en el fibroma periungueal de un paciente con TSC2 en mosaico53. Mientras que Los autores sugirieron que era poco probable que una mutación monoalélica en TSC1 podría cooperar con una mutación de la línea germinal TSC2 para impulsar Activación de MTOR, sentimos que juntos, nuestros informes con similares Las observaciones de pacientes únicos respaldan la idea de que Las mutaciones transheterocigóticas TSC1/TSC2 pueden contribuir a tumorigénesis en TSC. Curiosamente, los ratones heterocigotos compuestos Tsc1 β / ;Tsc2 β / muestran un mayor número de astrocitos hipocampales GFAP-positivos en comparación con cualquiera de los dos ratones heterocigotos únicos, lo que sugiere una posible epistasis interacción entre la mutación monoalélica de los dos genes54.

A pesar de que los genomas de ADN son generalmente estables, las lesiones de TSC fueron definida por cambios marcados y uniformes en la expresión génica. En De hecho, los DEG que identificamos en SEN/SEGA constituyen casi el 20% de todos los genes identificados en nuestro ensayo de ARNseq. Estos ARN Las firmas fueron compartidas por los tumores independientemente de TSC1/TSC2 estado mutacional o presencia de segundos hits. Mientras se enriquece Se observó la señalización de MTORC1 en SEN/SEGA, fue solo significativo cuando se redujo la rigurosidad del análisis de la vía y No se detectó en AR ni TUB. Este resultado puede ser un

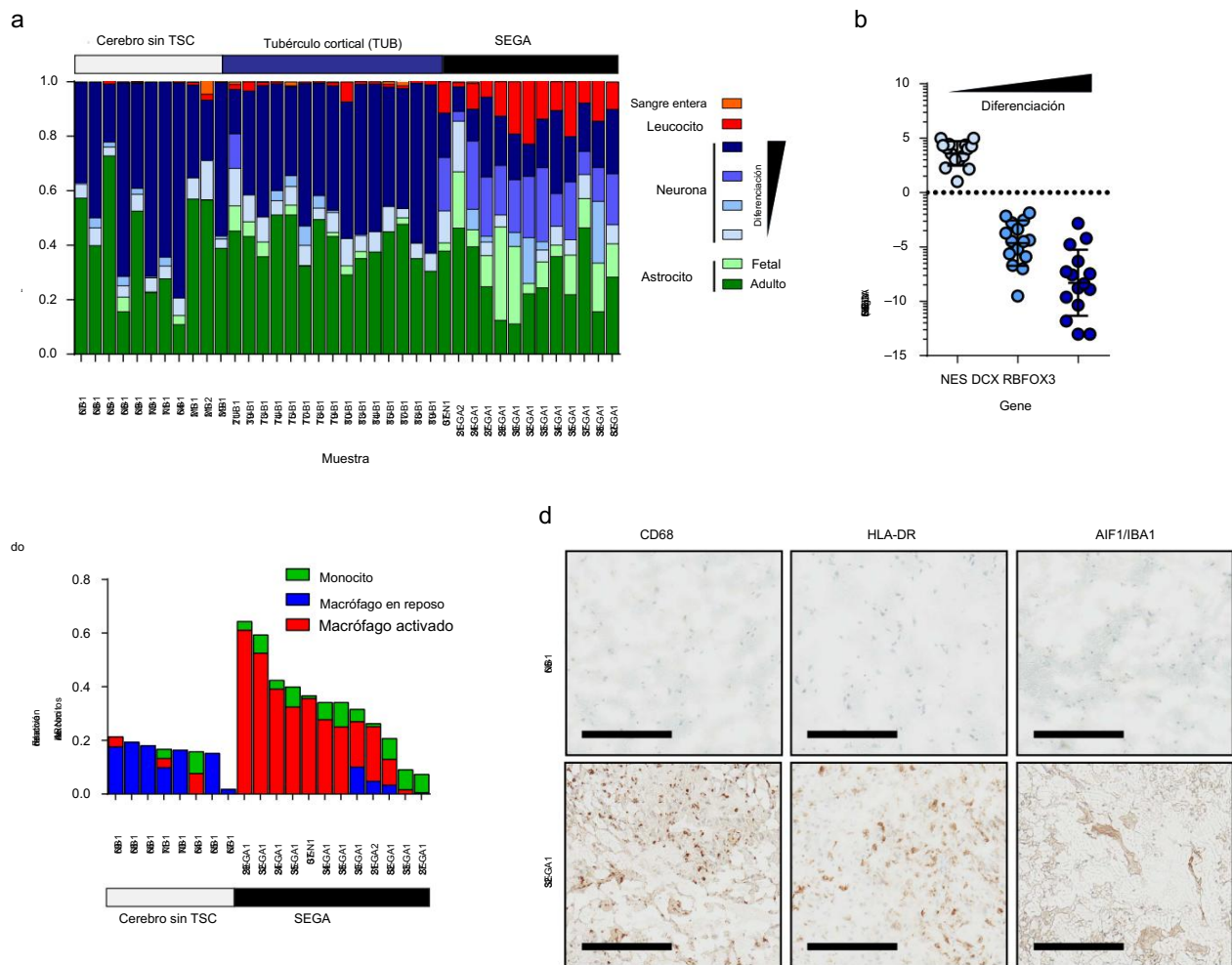


Figura 5 | Se observa la respuesta inmunitaria en lesiones cerebrales de TSC. (a) Fracción relativa de tipos celulares estimada por CIBERSORT ($P < 0.05$). Naranja: sangre completa; rojo: leucocitos; azul oscuro: neurona diferenciada; azul claro: neurona indiferenciada; verde claro: astrocito fetal; verde oscuro: astrocito adulto. (b) Cambio en la abundancia de transcritos en cerebros con SEN/SEGA en comparación con cerebros sin TSC para tres marcadores de diferenciación neuronal. Líneas: medias; barras de error: DE. (c) Fracciones relativas de 22 tipos de células inmunitarias estimadas por CIBERSORT. Aquellos significativamente enriquecidos en SEN/SEGA en comparación con NB ($P < 0.05$ ajustada por FDR) se muestran como su fracción relativa de ARN leucocitario por muestra. (d) Secciones de tejido fresco congelado de NB y SEGA se inmunotincionaron para CD68 (macrófagos), HLA-DR (MHC de clase II) y AIF1/IBA1 (microglía). Se muestran 66-NB1 y 32-SEGA1. Barras de escala: 200 mM.

consecuencia de la heterogeneidad tumoral (es decir, si solo una parte de un tumor o células específicas, como las células gigantes, soportan segundos impactos y están fuertemente impulsadas por la señalización de MTORC1) y también es consistente con el papel molecular que la regulación de MTOR desempeña en el control de la traducción (versus la transcripción)⁵⁵. Además, esta dramática firma de expresión también sugiere que una fuerte (y común) firma de expresión de célula de origen puede estar dominando sobre cambios adicionales de señalización molecular. Esto se ve mejor respaldado por la firma de expresión de RA, que mostró características de varios tipos de células que se sabe que derivan de la cresta neural, la célula de origen propuesta para esta lesión⁵⁶. Además, la firma de expresión del gen SEN/SEGA mostró evidencia de neuronas y glía menos diferenciadas, consistente con su derivación propuesta de células madre progenitoras neurales (NSPC), precursoras tempranas y compartidas de ambos tipos de células^{57,58}.

A lo largo de este estudio, empleamos CIBERSORT para generar estimaciones computacionales de la proporción relativa de tipos celulares en lesiones de CET utilizando datos de expresión génica. Si bien el informe original de esta metodología utilizó datos de microarrays y se centró en tipos de células inmunitarias, hemos extendido su uso a datos de RNAseq y a una serie de tipos celulares adicionales. Cabe destacar que CIBERSORT

Solo se pueden generar predicciones utilizando los tipos celulares de entrada; por lo tanto, podrían existir componentes celulares adicionales de estos tumores, además de los que analizamos. Utilizamos estas herramientas moleculares para detectar la neuroinflamación asociada con las lesiones cerebrales de CET.

La inflamación se ha documentado previamente en lesiones de CET, tanto en el cerebro de modelos animales de CET como en tejidos de pacientes^{59–62}. El trabajo de Zhang et al.⁶² sugirió que esta inflamación está directamente relacionada con la señalización hiperactiva de MTORC1 y no es simplemente resultado de la actividad convulsiva. Incluso se ha detectado inflamación en lesiones cerebrales prenatales de TSC, lo que sugiere que es una característica temprana y persistente de la patología de TSC⁶³. En nuestro estudio, descubrimos inflamación tanto en los tubérculos corticales como en las SEN/SEGA, aunque la extensión de la inflamación fue mucho mayor en las SEN/SEGA.

De hecho, la clasificación computacional de los datos de RNAseq estimó que hasta un 20 % de la fracción de ARNm de los tejidos SEN/SEGA estaba asociada con leucocitos, con un enriquecimiento específico de macrófagos activados. Postulamos que esta firma macrófaga refleja en gran medida la activación de la microglía cerebral, el principal componente celular inmunitario del sistema nervioso central (SNC) y conocido mediador de la neuroinflamación, lo cual se ve respaldado por una expresión positiva de AIF1/IBA1.

Tinción en tejido SEGA. Los astrocitos reactivos, conocidos mediadores clave de la inmunidad innata en el SNC y la neuroinflamación, probablemente también contribuyan a la firma inmunitaria detectada. Si bien la inflamación puede desempeñar un papel protector en respuesta a una lesión cerebral aguda, desencadenando la angiogénesis y promoviendo la reparación tisular, la neuroinflamación crónica puede, en cambio, ser destructiva y contribuir al daño neuronal, como ocurre en patologías del SNC como el Alzheimer y el Parkinson. Futuros trabajos importantes deberían centrarse en definir la relación entre la neuroinflamación y los síntomas neurológicos de la CET, incluyendo la actividad convulsiva y el deterioro cognitivo, así como en la evaluación de agentes antiinflamatorios en el tratamiento de la CET.

Métodos

Pacientes y muestras. Las muestras de pacientes con CET o donantes de órganos sin CET se adquirieron del Repositorio de Cerebro y Tejidos del NIH NeuroBioBank en la Universidad de Maryland, la Facultad de Medicina Houston-McGovern de la Universidad de Texas, el Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati, la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York y el Hospital Infantil Helen DeVos. Todos los tejidos utilizados en este estudio se congelaron en fresco y se recolectaron en el momento de la cirugía o el procedimiento o post mortem (consulte los Datos suplementarios 1 para obtener más información). Este estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB) del Van Andel Research Institute (VARI). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes humanos que proporcionaron muestras. Las muestras fueron revisadas por un patólogo clínico certificado para confirmar el tipo de tejido y evaluar la integridad, siempre que fuera posible (las muestras con diagnósticos inconsistentes, con pocas probabilidades de ser consistentes o poco claros se excluyeron del estudio). También se excluyeron las muestras si no producían datos utilizables en dos de las tres plataformas de ADN (WES; matriz SNP y secuenciación de TSC dirigida), con la excepción de una muestra de tejido no tumoral en la que se identificó la mutación de la línea germinal en la plataforma completa (eliminando la necesidad de completar las plataformas adicionales).

Inmunohistoquímica. Para la inmunohistoquímica, se fijaron secciones de tejido fresco congelado de 5 mm y se tiñeron con anticuerpos primarios (CD68: 1:100; HLA-DR: 1:40; AIF1/IBA1: 1:500), anticuerpos secundarios (Ultramap anti-multímero de HRP de ratón) y reactivo de detección (Ventana Chromomax DAB). Los portaobjetos se procesaron en la plataforma Discovery Ultra (Ventana) y se obtuvieron imágenes con el escáner digital de portaobjetos de patología ScanScope XT (Aperio).

Aislamiento de ADN y ARN. El método específico para el aislamiento de ADN y ARN se indica en los Datos Suplementarios 1. En la mayoría de los tejidos congelados, se aislaron simultáneamente ADN y ARN utilizando una versión modificada del método descrito en Pena-Llopis y Brugaras64. Brevemente, los tejidos se lisaron y homogeneizaron utilizando el tampón de lisis del kit mirVana (Ambion), un micropistola y columnas QIAshredder (Qiagen). El ADN se aisló utilizando columnas AillPrep (Qiagen), mientras que el ARN se aisló mediante flujo continuo mediante extracción ácida con fenol-cloroformo y el kit mirVana (Ambion). La integridad del ADN se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa y la del ARN con un BioAnalyzer 2100 (Agilent). Las concentraciones de ADN y ARN se determinaron con un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

Secuenciación del exoma completo. La secuenciación de ADN se realizó en el Laboratorio de Servicios Genómicos (GSL) del Instituto HudsonAlpha de Biotecnología (HAIB) o en el Instituto de Genómica de Beijing (BGI) del Hospital Infantil de Filadelfia. En resumen, el ADN exónico se enriqueció utilizando una biblioteca de exoma humano SeqCap EZ v3.0 (NimbleGen) o el kit de captura SureSelect Human All Exon (Agilent) a partir de ADN genómico. Las bibliotecas se agruparon y agruparon a 16-18 pM en el HiSeq 2500 o HiSeq 2000 con celdas de flujo de alto rendimiento y se secuenciaron a 100PE según los protocolos de Illumina. Los archivos Fastq se generaron utilizando el software de Illumina, se alinearon con el genoma hg19 con BWA-MEM y las variantes se identificaron utilizando Haplotype Caller en GATK. Las variantes filtradas se anotaron con el Predictor de Efectos de Variante (VEP) y se importaron a GEMINI.

Los métodos detallados se pueden encontrar en Métodos suplementarios.

Métodos estadísticos. Para el análisis de la expresión de TSC1/TSC2, se realizaron pruebas t de Welch por pares (en GraphPad Prism 6 para Windows, versión 6.07) de 5 grupos de datos (Fig. 1m: tejido no TSC; tumores NMI y TSC1; 0, 1 o 2 mutaciones truncadas en TSC2; Fig. 1n: tejido no TSC; tumores NMI y TSC2; 0, 1 o 2 mutaciones truncadas en TSC1) seguidas de una corrección de la tasa de falsos descubrimientos (TDF) (en R) para generar valores p corregidos. Este enfoque se adoptó porque las muestras no superaron la prueba de Bartlett para la homogeneidad de varianzas, lo que descartó el ANOVA como opción.

Las mutaciones truncantes incluyeron mutaciones sin sentido, mutaciones con cambio de marco, mutaciones por empalme y grandes deleciones.

Los tumores con mutaciones germinales truncantes y CN-LOH se clasificaron como portadores de dos mutaciones truncantes (ya que CN-LOH duplica el alelo mutante germinal). Como prioridad para la visualización, solo se mostraron en las figuras 1m, n el tejido no TSC y uno o dos grupos de mutaciones truncantes, aunque todos se incluyeron en

Análisis estadístico. Para el análisis de tipos de células inmunitarias mediante CIBERSORT (Fig. 5c), la fracción relativa de cada tipo celular en SEN/SEGA se dividió entre la fracción en cerebro sin CET. Los valores de p individuales de la prueba t de Student bilateral se ajustaron mediante el método FDR utilizando R. Los tipos celulares con cambios de $p/4$ veces y una $P < 0.05$ ajustada por FDR se incluyeron en el panel. Para evaluar la asociación entre la hipermetilación y la expresión diferencial, identificamos los genes cubiertos tanto por HM450 como por nuestro ensayo de ARNseq y los categorizamos como hipermetilados y DEG (13) o no DEG (114), o no hipermetilados y DEG (1156) o no DEG (15125). Estos valores se ingresaron en una tabla de contingencia 2x2 y se realizó una prueba χ^2 en GraphPad Prism 6.

Secuenciación dirigida de TSC1/TSC2. Diseñamos un kit de enriquecimiento dirigido personalizado (SeqCap EZ Choice Library, NimbleGen) con una cobertura completa de TSC1 y TSC2, incluyendo elementos en secuencia ascendente y descendente (incluida PKD1), exones e intrones. Las muestras en el tratamiento de la CET (Fig. 1m) y se secuenciaron de forma similar a la anterior en el HAIB GSL utilizando reactivos Illumina y el HiSeq 2500. El alineamiento, la identificación de variantes y la anotación se realizaron de forma similar a la secuenciación en cadena de la polimerasa (WES). Además, exploramos mutaciones presentes con frecuencias alélicas bajas, de hasta el 0,5 %, en el experimento de secuenciación profunda mediante la recuperación de mutaciones con LoFreq65 y VarDict66. Puede encontrar información detallada en Métodos Suplementarios.

Llamada de mutación de TSC1/TSC2. Para ser incluidas en los Datos Suplementarios 2, las variantes de TSC1/TSC2 (410 lecturas en total) debían estar publicadas en la Base de Datos Abierta de Variaciones de Leiden para la esclerosis tuberosa (LOVD; www.LOVD.nl/TSC2; www.LOVD.nl/TSC1) (v2.0, compilación 36) como patógenas o probablemente patógenas, o, si no estaban presentes en la LOVD (o su patogenicidad era desconocida en la LOVD), se habían determinado como raras (no presentes en la base de datos de 1000 genomas) y con impacto en la función génica (SNV o INDEL de impacto medio/moderado o alto). Se consideraron todas las grandes deleciones y eventos CN-LOH que afectaron a TSC1 y TSC2 como perjudiciales para la función génica, por lo que se incluyeron. En el caso de tejidos no tumorales (normales) (n = 33) o tumores emparejados con tejido no tumoral del mismo paciente (n = 42), se pudo determinar con certeza el origen germinal o somático de las mutaciones. Posteriormente, utilizamos la información de estas muestras para establecer las características de las mutaciones germinales y somáticas con el fin de predecir el origen de las mutaciones en tumores no emparejados (n = 36), lo cual se describe en detalle en la sección Métodos Suplementarios.

Análisis de mutaciones somáticas. Las SNV somáticas se identificaron mediante MuTect con la configuración predeterminada y se anotaron con VEP y GEMINI67. Los INDEL se detectaron y caracterizaron tanto en muestras tumorales como normales emparejadas mediante Pindel68. Para determinar un INDEL somático, se requirió una cobertura de 45 tanto en muestras tumorales como normales, 45 lecturas que respaldaran el alelo variante en el tumor con 0 lecturas en la muestra normal emparejada y una fracción alélica variante de 40,10 en la muestra tumoral. Las tasas de mutación somática se determinaron normalizando el número combinado de SNV somáticas e INDEL por el número total de bases con una profundidad de lectura de 45 tanto en muestras tumorales como normales. Se excluyeron las lecturas con una calidad de base de ≥ 20 en cada locus de mutación. Las tasas de mutación para cánceres presentadas en la Fig. 2b se obtuvieron de Kandath et al.34. Los Datos suplementarios 3 incluyen solo SNV e INDEL que pasan criterios más estrictos: los SNV requirieron una profundidad de lectura de 410 en la posición de la variante y 0 lecturas de variante en las muestras normales; todos los INDEL somáticos se inspeccionaron manualmente en Integrative Genomics Viewer (Broad Institute) y se excluyeron los artefactos claros.

Secuenciación de ARN y análisis de expresión génica diferencial. La secuenciación de ARN se realizó en el HAIB GSL. En resumen, se prepararon bibliotecas de ARN mensajero (ARNm) con reactivos NEBNext (New England BioLabs) y las muestras se sometieron a secuenciación direccional en el Illumina HiSeq 2500 mediante lecturas de extremos emparejados de 100 pb. Las lecturas con filtro de calidad se alinearon con el genoma hg19 mediante Subread. Los recuentos de lecturas sin procesar obtenidos con FeatureCounts se importaron a R para el análisis de expresión diferencial mediante limma38, donde se calcularon los recuentos por millón (CPM) y se transformaron en $\log^2$ mediante voom69, seguido de la normalización de la media recortada de los valores M (TMM). Se utilizó GeneAnalytics (LifeMap Sciences; geneanalytics.genecards.org) para el análisis primario de enriquecimiento del conjunto de genes70. Se utilizó un máximo de 300 símbolos génicos y se incluyeron en los resultados hasta 10 procesos biológicos GO con puntuaciones de coincidencia medias o altas ($P < 0.05$ ajustada por FDR). En las Tablas 1 y 2 solo se mostraron los procesos con al menos 10 genes coincidentes. Se realizó un análisis de enriquecimiento posterior para buscar firmas relacionadas con MTORC1 mediante MetaCore. Para ello, los cambios de pliegue a nivel genético y los valores P ajustados se importaron a MetaCore versión 6.29 compilación 68613 (Thomson Reuters) para el análisis de la vía. El análisis de la vía se realizó utilizando el análisis de un clic de Pathway Maps en genes con un cambio absoluto de log-fold de 41 y un valor P ajustado por FDR de 0,001. Los mapas de vías con un valor P ajustado por FDR < 0.05 se consideraron significativos. La identificación de variantes de ARNseq se realizó con GATK (v3.0) utilizando los parámetros de Mejores Prácticas sugeridos y con un método de alineamiento STAR de dos pasadas (v2.4.2a) con el genoma hg19. Las variantes de ADN identificadas en ARNseq se indican en el Suplemento. Datos 2.

CIBERSORT. Se utilizó CIBERSORT42 para estimar la fracción relativa de tipos de células. Los datos de secuenciación de ARN disponibles públicamente se descargaron del NCBI Short

Archivo de lecturas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) (consulte Métodos complementarios para obtener información detallada). Los valores de las neuronas iPSC se duplicaron en dos columnas para cumplir con los requisitos de entrada de CIBERSORT. La calidad de las lecturas se evaluó con FASTQC v. 0.11.3 (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas se alinearon con el genoma hg19 mediante Subread (v1.4.5) con los parámetros predeterminados. Los recuentos de lecturas sin procesar se obtuvieron como se describe para la secuenciación de ARN. Para los tipos de células inmunitarias, se utilizó la firma genética LM2241. Solo se reportaron las muestras con estimaciones con valores de $p < 0,05$.

Matrices de SNP y análisis del número de copias. El análisis del número de copias se realizó utilizando matrices Infinium HumanOmni2.5S (Illumina) en la HAIB GSL. Brevemente, se identificaron los genotipos y se estimó el número total de copias, la razón log-R (LRR) y la frecuencia del alelo B (BAF) para cada SNP utilizando archivos IDAT en GenomeStudio (v2011.1, Illumina). Las estimaciones del número total de copias de todo el genoma se refinaron utilizando la normalización tangente y las estimaciones del número de copias individuales se sometieron a segmentación por muestra; las razones de copias a nivel de brazo y a nivel de gen se identificaron a partir de datos segmentados utilizando GISTIC. Las estimaciones de pureza y ploidia, y el número de copias entero alélico (incluidas las regiones de pérdida de heterocigosidad neutral respecto a la copia) se calcularon a partir de las LRR y las BAF utilizando ASCAT. Los eventos de número de copias a nivel de brazo determinados por GISTIC 2.0 se validaron visualmente en gráficos LRR y BAF de todo el genoma generados por ASCAT 2.4. Los cromosomas 9 y 16, así como la región del cromosoma 9q que contiene TSC1 y la región del cromosoma 16p que contiene TSC2, se inspeccionaron visualmente mediante genoCN para validar los loci con pérdida de heterocigosidad y deleciones focales, según lo informado por ASCAT 2.4 y/o GISTIC. También se registraron eventos de número de copias detectados solo visualmente debido a baja pureza tumoral o baja señal.

Ensayo de metilación de ADN basado en matrices. El perfil de metilación de ADN se obtuvo utilizando los BeadChips Infinium HumanMethylation450 (Illumina) en el Centro de Epigenoma de la Universidad del Sur de California. Estos perfiles se analizaron utilizando el mismo proceso empleado para el proyecto Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA). En resumen, la conversión de ADN genómico con bisulfito se realizó con el kit de metilación de ADN EZ-96 (Zymo Research). Tras el control de calidad, el ADN convertido con bisulfito se amplificó y fragmentó en su genoma completo antes de la hibridación con BeadArrays, que se escanearon con la tecnología iScan de Illumina. Se utilizaron archivos IDAT para extraer las intensidades y calcular los valores beta de cada sonda y muestra con el paquete methylumi basado en R. Se calculó el valor de AP comparando la intensidad de cada sonda con el nivel de fondo y los puntos de datos con valores de P de detección de 0,05 se consideraron no significativamente diferentes de las mediciones de fondo. Puede encontrar información detallada en Métodos Suplementarios.

Hibridación in situ fluorescente. Las sondas FISH se prepararon a partir de clones BAC purificados (Centro de recursos BACPAC; bacpac.chori.org); consulte los Métodos suplementarios para sondas BAC específicas e información detallada. Brevemente, cada clon se marcó con Green-dUTP, Orange-dUTP o Red-dUTP mediante traducción de mella. Se realizaron preparaciones de contacto tumoral en portaobjetos de vidrio, que se fijaron, secaron, envejecieron, digirieron y lavaron. Los portaobjetos se colocaron en formaldehído al 1%, se lavaron y deshidrataron en una serie de etanol. A continuación, los portaobjetos se desnaturalizaron, se lavaron y se secaron al aire. Las sondas FISH se desnaturalizaron y se aplicó una sonda a cada portaobjetos de muestra. Se adhirieron los cubreobjetos y los portaobjetos se hibridaron durante la noche en un sistema de hibridación ThermoBrite (Abbott Molecular). Tras la hibridación, los portaobjetos se lavaron con 2 SSC y se enjuagaron brevemente con agua. Los portaobjetos se secaron y se contratiñeron con medio de montaje VectaShield con 40-6 -diamidino-2-fenilindol (DAPI). La adquisición de imágenes se realizó a 600 o 1000 aumentos con una cámara COOL-1300 SpectraCube (Applied Spectral Imaging-ASI) montada en un microscopio Olympus BX43. Las imágenes se analizaron con el software FISHView v7 (ASI) y se registraron al menos 200 núcleos en interfase de cada muestra.

Disponibilidad de los datos. Todos los datos brutos se han depositado en la Base de Datos de Genotipos y Fenotipos (dbGaP) con el código de acceso phs001357.v1.p1. El resto de los datos están disponibles en el artículo y los archivos suplementarios, o se pueden solicitar a los autores.

Referencias 1.

Osborne, JP, Fryer, A. y Webb, D. Epidemiología de la esclerosis tuberosa. Ann. Académico de Nueva York. Ciencia. 615, 125-127 (1991).

2. Consorcio Europeo de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16. Identificación y caracterización del gen de la esclerosis tuberosa en el cromosoma 16. Cell 75, 1305–1315 (1993).

3. Gómez, MR. Criterios de diagnóstico en la esclerosis tuberosa. (ed. Gómez, MR) 10–23 (Raven Press, 1988).

4. Roach, ES, Gomez, MR y Northrup, H. Complejo de esclerosis tuberosa Conferencia de consenso: criterios de diagnóstico clínico revisados. J. Child Neurol. 13, 624–628 (1998).

5. Krueger, DA y Northrup, H. Complejo Internacional de Esclerosis Tuberosa Grupo de Consenso. Vigilancia y manejo del complejo de esclerosis tuberosa:

Recomendaciones de la Conferencia Internacional de Consenso sobre el Complejo de Esclerosis Tuberosa de 2012. Pediatr. Neurol. 49, 255–265 (2013).

6. Crino, PB, Nathanson, KL y Henske, EP El complejo de esclerosis tuberosa. N. inglés. J. Med. 355, 1345-1356 (2006).

7. Gallagher, A. et al. Disminución de la lateralidad del lenguaje en el complejo de esclerosis tuberosa: Relación entre la dominancia del lenguaje y la localización de la tuberosidad, así como el antecedente de epilepsia. Epilepsy Behav. 25, 36–41 (2012).

8. Goodman, M. et al. Recuento de tubérculos corticales: un biomarcador que indica la gravedad neurológica del complejo de esclerosis tuberosa. J. Child Neurol. 12, 85–90 (1997).

9. Kassiri, J., Snyder, T. J., Bhargava, R., Wheatley, B. M. y Sinclair, D. B. Tubérculos corticales, cognición y epilepsia en la esclerosis tuberosa. Pediatr. Neurol. 44, 328–332 (2011).

10. Kothare, SV et al. Gravedad de las manifestaciones en el complejo de esclerosis tuberosa en Relación con el genotipo. Epilepsia 55, 1025–1029 (2014).

11. Bernstein, J. y Robbins, TO. Afectación renal en la esclerosis tuberosa. Ann. N. Y. Acad. Sci. 615, 36–49 (1991).

12. Shepherd, CW, Gomez, MR, Lie, JT y Crowson, CS. Causas de muerte en pacientes con esclerosis tuberosa. Mayo Clin. Proc. 66, 792–796 (1991).

13. Dabora, SL et al. El análisis mutacional en una cohorte de 224 pacientes con esclerosis tuberosa indica una mayor gravedad de la enfermedad por TSC2, en comparación con la enfermedad por TSC1, en múltiples órganos. Am. J. Hum. Genet. 68, 64–80 (2001).

14. van Sleighthorst, M. et al. Identificación del gen de la esclerosis tuberosa TSC1 en el cromosoma 9q34. Science 277, 805–808 (1997).

15. Sancak, O. et al. Análisis mutacional de los genes TSC1 y TSC2 en un contexto diagnóstico: correlaciones genotipo-fenotipo y comparación de técnicas diagnósticas de ADN en el complejo de esclerosis tuberosa. Eur. J. Hum. Genet. 13, 731–741 (2005).

16. Verhoef, S. et al. Alta tasa de mosaicismo en el complejo de esclerosis tuberosa. Am. J. Tararear. Ginetá. 64, 1632-1637 (1999).

17. Tyburczy, ME et al. Las mutaciones en mosaico e intrónicas en TSC1/TSC2 explican la mayoría de los pacientes con TSC sin mutación identificada mediante pruebas convencionales. PLoS Genet. 11, e1005637 (2015).

18. Kozłowski, P. et al. Identificación de 54 grandes deleciones/duplicaciones en TSC1 y TSC2 mediante MLPA y correlaciones genotipo-fenotipo. Hum. Genet. 121, 389–400 (2007).

19. Kwiatkowska, J., Wigowska-Sowinska, J., Napierala, D., Slomski, R. & Kwiatkowski, DJ Mosaicismo en la esclerosis tuberosa como posible causa del fracaso del diagnóstico molecular. N. Engl. J. Med. 340, 703–707 (1999).

20. Dibble, CC et al. TBC1D7 es una tercera subunidad del complejo TSC1-TSC2. aguas arriba de mTORC1. Mol. Cell 47, 535–546 (2012).

21. Franz, DN et al. Eficacia y seguridad del everolimus para los astrocitomas subependimarios de células gigantes asociados con el complejo de esclerosis tuberosa (EXIST-1): ensayo multicéntrico, aleatorizado y controlado con placebo de fase 3. Lancet 381, 125–132 (2013).

22. Krueger, DA et al. Everolimus para astrocitomas subependimarios de células gigantes en esclerosis tuberosa. N. Engl. J. Med. 363, 1801–1811 (2010).

23. Bissler, JJ et al. Sirolimus para el angiomiolipoma en el complejo de esclerosis tuberosa o linfangioleiomiomatosis. N. Engl. J. Med. 358, 140–151 (2008).

24. Bissler, JJ et al. Everolimus para el angiomiolipoma asociado al complejo de esclerosis tuberosa o linfangioleiomiomatosis esporádica (EXIST-2): un ensayo multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. Lancet 381, 817–824 (2013).

25. McCormack, FX et al. Eficacia y seguridad del sirolimus en linfangioleiomiomatosis. N. Engl. J. Med. 364, 1595–1606 (2011).

26. Krueger, DA et al. Tratamiento a largo plazo de la epilepsia con everolimus en la esclerosis tuberosa. Neurology 87, 2408–2415 (2016).

27. Green, AJ, Johnson, PH y Yates, JR El gen de la esclerosis tuberosa en El cromosoma 9q34 actúa como supresor del crecimiento. Hum. Mol. Genet. 3, 1833–1834 (1994).

28. Sepp, T., Yates, JR y Green, AJ Pérdida de heterocigosidad en hamartomas de esclerosis tuberosa. J. Med. Genet. 33, 962–964 (1996).

29. Chan, JA et al. Patogénesis de los astrocitomas de células gigantes subependimarios de la esclerosis tuberosa: la inactivación bialélica de TSC1 o TSC2 conduce a la activación de mTOR. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63, 1236–1242 (2004).

30. Henske, EP et al. La pérdida alélica es frecuente en las lesiones renales de la esclerosis tuberosa, pero rara en las lesiones cerebrales. Am. J. Hum. Genet. 59, 400–406 (1996).

31. Niida, Y. et al. Estudio de mutaciones somáticas en el complejo de esclerosis tuberosa Los hamartomas de células madre de la esclerosis múltiple (TSC) sugieren diferentes mecanismos genéticos para la patogénesis de las lesiones de TSC. Am. J. Hum. Genet. 69, 493–503 (2001).

32. Knudson, JR AG Mutación y cáncer: estudio estadístico del retinoblastoma. Proc. Natl Acad. Sci. Estados Unidos 68, 820–823 (1971).

33. Au, KS et al. Correlación genotipo/fenotipo en 325 personas remitidas para diagnóstico de complejo de esclerosis tuberosa en Estados Unidos. Genet. Med. 9, 88–100 (2007).

34. Tamborero, D. et al. Identificación integral de factores mutacionales que impulsan el cáncer. Genes en 12 tipos de tumores. Sci. Rep. 3, 2650 (2013).

35. Patel, SR y Dressler, GR. Genética y epigenética del desarrollo renal. Semin. Nephrol. 33, 314–326 (2013).

36. Brunskill, EW et al. Atlas de expresión génica en el riñón en desarrollo con resolución microanatómica. *Dev. Cell* 15, 781–791 (2008).
37. Hollink, IH et al. Baja frecuencia de mutaciones de DNMT3A en la leucemia mieloide aguda (LMA) pediátrica e identificación de la línea celular OCI-AML3 como modelo in vitro. *Leukemia* 26, 371–373 (2012).
38. Ritchie, ME et al. Análisis de expresión diferencial de potencias limma para Estudios de secuenciación de ARN y microarrays. *Nucleic Acids Res.* 43, e47 (2015).
39. Fernandez-Flores, A. Evidencia sobre el origen de los PEComas en la cresta neural. *Rom. J. Morf. Embrión.* 52, 7–13 (2011).
40. Martignoni, G. et al. Expresión de cathepsina K en el espectro de lesiones de células epitelioides perivasculares (CEP) renales. *Mod. Pathol.* 25, 100–111 (2012).
41. Bonetti, FP et al. La célula epitelioides perivascular y lesiones relacionadas. *Adv. Anat. Pathol.* 4, 343–358 (1997).
42. Newman, AM et al. Enumeración robusta de subconjuntos celulares a partir de la expresión tisular. *perfiles. Nat. Methods* 12, 453–457 (2015).
43. Giannikou, K. et al. La secuenciación completa del exoma identifica la pérdida bialélica de TSC1/TSC2 como el factor desencadenante principal y suficiente para el desarrollo del angiomiolipoma renal. *PLoS Genet.* 12, e1006242 (2016).
44. Lesma, E. et al. La metilación del promotor TSC2 subyace al crecimiento anormal de células musculares lisas derivadas de angiomiolipomas TSC2. *Am. J. Pathol.* 174, 2150–2159 (2009).
45. Jiang, WG et al. La tuberina y la hamartina se expresan de forma aberrante y se relacionan con el pronóstico clínico en el cáncer de mama humano: el papel de la metilación del promotor de los genes de las CET. *Eur. J. Cancer* 41, 1628–1636 (2005).
46. Lee, A. et al. Los marcadores de proliferación celular se expresan en los tubérculos corticales. *Ann. Neurol.* 53, 668–673 (2003).
47. Lozovaya, N. et al. La supresión selectiva de la expresión excesiva de GluN2C rescata la epilepsia temprana en un modelo murino de esclerosis tuberosa. *Nat. Commun.* 5, 4563 (2014).
48. Ehninger, D. et al. Reversión de los déficits de aprendizaje en un modelo murino de esclerosis tuberosa con Tsc2+. *Nat. Med.* 14, 843–848 (2008).
49. Goorden, SM, van Woerden, GM, van der Weerd, L., Cheadle, JP y Elgersma, Y. Déficits cognitivos en ratones Tsc1+/− en ausencia de lesiones cerebrales y convulsiones. *Ann. Neurol.* 62, 648–655 (2007).
50. Cooke, SL et al. Pseudogenes procesados adquiridos somáticamente durante el cáncer. *desarrollo. Nat. Commun.* 5, 3644 (2014).
51. Kazazian, Jr. HH. Inserciones de pseudogenes procesados en células somáticas. *ADN de la multitud.* 5, 20 (2014).
52. Ewing, AD et al. La retrotransposición de transcritos génicos produce variación estructural en genomas de mamíferos. *Genome Biol.* 14, R22 (2013).
53. Tyburczy, ME et al. La exposición solar causa mutaciones somáticas de segundo impacto y el desarrollo de angiofibroma en el complejo de esclerosis tuberosa. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2023–2029 (2014).
54. Uhlmann, EJ et al. La heterocigosidad para los productos génicos del complejo de esclerosis tuberosa (TSC) resulta en un aumento del número de astrocitos y una disminución de la expresión de células Mecanismos moleculares de p27-Kip1 en TSC2 p / 55. Ma, XM y Blenis, J. la traducción mediada por mTOR. *control. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 307–318 (2009).
56. Delaney, SP, Julian, LM y Stanford, WL. El linaje de la cresta neural como factor determinante de la heterogeneidad de la enfermedad en el complejo de esclerosis tuberosa y la linfangioleiomiomatosis. *Portada. Cell Dev. Biol.* 2, 69 (2014).
57. Zhou, J. et al. Las células madre/progenitoras neurales mutantes Tsc1 exhiben migración Los déficits pueden dar lugar a lesiones subependimarias en el ventrículo lateral. *Genes Dev.* 25, 1595–1600 (2011).
58. Magri, L. et al. La activación sostenida de la vía mTOR en células madre neurales embrionarias conduce al desarrollo de lesiones asociadas al complejo de esclerosis tuberosa. *Cell Stem Cell* 9, 447–462 (2011).
59. Maldonado, M. et al. Expresión de ICAM-1, TNF-alfa, NF kappa B y MAP quinasa en tubérculos del complejo de esclerosis tuberosa. *Neurobiol. Dis.* 14, 279–290 (2003).
60. Boer, K. et al. Procesos inflamatorios en tubérculos corticales y subependimarios. Tumores de células gigantes del complejo de esclerosis tuberosa. *Epilepsy Res.* 78, 7–21 (2008).
61. Boer, K. et al. El análisis de la expresión génica de los tubérculos corticales del complejo de esclerosis tuberosa revela un aumento en la expresión de factores de adhesión e inflamatorios. *Brain Pathol.* 20, 704–719 (2010).
62. Zhang, B., Zou, J., Rensing, N.R., Yang, M. y Wong, M. Inflamatorio Mecanismos que contribuyen a las manifestaciones neurológicas del complejo de esclerosis tuberosa. *Neurobiol. Dis.* 80, 70–79 (2015).
63. Prabowo, AS et al. Lesiones cerebrales fetales en el complejo de esclerosis tuberosa: activación de TORC1 e inflamación. *Brain Pathol.* 23, 45–59 (2013).
64. Pena-Llopis, S. y Brugarolas, J. Aislamiento simultáneo de ADN, ARN, miARN y proteínas de alta calidad de tejidos para aplicaciones genómicas. *Nat. Protoc.* 8, 2240–2255 (2013).
65. Wilm, A. et al. LoFreq: un llamador de variantes ultrasensible que reconoce la calidad de la secuencia para descubrir la heterogeneidad de poblaciones celulares a partir de conjuntos de datos de secuenciación de alto rendimiento. *Nucleic Acids Res.* 40, 11189–11201 (2012).
66. Lai, Z. et al. VarDict: un novedoso y versátil llamador de variantes para la secuenciación de nueva generación en la investigación del cáncer. *Nucleic Acids Res.* 44, e108 (2016).
67. Cibulskis, K. et al. Detección sensible de mutaciones puntuales somáticas en muestras de cáncer impuras y heterogéneas. *Nat. Biotechnol.* 31, 213–219 (2013).
68. Ye, K., Schulz, MH, Long, Q., Apweiler, R. y Ning, Z. Pindel: un enfoque de crecimiento de patrones para detectar puntos de ruptura de delecciones grandes e inserciones medianas a partir de lecturas cortas de extremos emparejados. *Bioinformática* 25, 2865–2871 (2009).
69. Law, CW, Chen, Y., Shi, W. y Smyth, GK voom: Las ponderaciones de precisión desbloquean herramientas de análisis de modelos lineales para el recuento de lecturas de ARN-seq. *Genome Biol.* 15, R29 (2014).
70. Ben-Ari Fuchs, S. et al. GeneAnalytics: una herramienta integral de análisis de conjuntos de genes para secuenciación de próxima generación, RNAseq y datos de microarrays. *OMICS* 20, 139–151 (2016).

Agradecimientos Agradecemos

a todos los pacientes y familias que contribuyeron a este estudio.

Una porción de tejido humano se obtuvo del Repositorio de Cerebro y Tejidos del NeuroBioBank de los NIH en la Universidad de Maryland (Baltimore, MD). Agradecemos a los miembros del laboratorio MacKeigan y al Consejo Asesor Externo de TSC Pathway of Hope (Peter Laird, Peter Saltonstall y Len Post) por sus valiosos comentarios y comentarios.

También agradecemos a Nicole Doppel por la gestión del proyecto; a Jennifer Webb, Sarah Nota, Molly Griffith y Maxwell Mays por la coordinación clínica; a Alejandro Salah por la información clínica; y a Braden Boone, Lisa Turner y Jennifer Kordich por la asistencia técnica y los conocimientos experimentales. Este trabajo contó con el apoyo de subvenciones y financiación del Fondo Estratégico de Michigan, el Instituto de Investigación Van Andel, la Alianza para la Esclerosis Tuberosa, la Fundación Blue Cross Blue Shield de Michigan, Great Lakes Scrip, Rockford Construction, Colliers International, el Equipo Hannah para TSC y donantes individuales.

JPM cuenta con el apoyo de investigación del Instituto Nacional del Cáncer de los NIH (R01CA197398) y la Alianza para la Esclerosis Tuberosa. DAK cuenta con el apoyo de investigación del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares de los NIH (U01-NS082320, U54-NS092090 y P20-NS080199) y la Alianza para la Esclerosis Tuberosa.

Contribuciones de los autores

KRM, DAK y JPM conceptualizaron el estudio; WZ, MJB, KRM, JPM y MEW analizaron los datos de secuenciación de ADN, HS y DJW analizaron los datos de la matriz de metilación de ADN; JS, MEW y ADC analizaron los datos de la matriz de número de copias; MJB, KRM, MEW y JPM analizaron los datos de RNAseq, KRM, KED-R, KAS, JK y JPM realizaron experimentos biológicos; SLC realizó la histopatología; KRM y JPM escribieron el manuscrito con aportes de todos los autores; JPM obtuvo financiación para este estudio; OD, STD, KSA, HN y DAK proporcionaron muestras; MEW, HN, HS, ADC y JPM supervisaron el estudio.

Información adicional La

información complementaria acompaña a este documento en <http://www.nature.com/comunicaciones de la naturaleza>

Intereses en conflicto: Los autores declaran no tener intereses financieros en conflicto.

La información sobre reimpressiones y permisos está disponible en línea en <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Cómo citar este artículo: Martin, KR et al. El panorama genómico del complejo de esclerosis tuberosa. *Nat. Commun.* 8, 15816 doi: 10.1038/ncomms15816 (2017).

Nota del editor: Springer Nature se mantiene neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales en los mapas publicados y las afiliaciones institucionales.



Acceso abierto. Este artículo está bajo la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional, que permite su uso, intercambio, adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre que se otorgue el crédito correspondiente al autor o autores originales y a la fuente, se proporcione un enlace a la licencia Creative Commons y se indique si se realizaron cambios. Las imágenes u otro material de terceros en este artículo están incluidos en la licencia Creative Commons del artículo, a menos que se indique lo contrario en una línea de crédito del material. Si el material no está incluido en la licencia Creative Commons del artículo y el uso previsto no está permitido por la normativa legal o excede el uso permitido, deberá obtener permiso directamente del titular de los derechos de autor. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

r El autor(es) 2017