



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

---

# GRADU AMAIERAKO LANA

## BIOTEKNOLOGIA

MOSAIZISMO EPIGENETIKOAREN  
KUANTIFIKAZIOA: PROTOKOLOAREN DISEINUA

**Ikaslea: Serna Alonso, Garazi**

**Data: 2015.ko uztaila**

**Zuzendaria**

**Guiomar Perez de Nanclares Leal dk.**

**Kurtso akademikoa**

**2014/2015**

## AURKIBIDEA:

1. SARRERA ETA HELBURUAK: .....	1
1.1 SARRERA:.....	1
1.2 HELBURUAK:.....	5
2. GARAPENA: .....	5
2.1 PAZIENTEAK: .....	5
2.2 METODOAK: .....	5
2.2.1 DNAREN ERAUZKETA ETA KUANTIFIKAZIOA .....	6
2.2.2 BISULFITOAREKIN TRATAMENDUA.....	7
2.2.3 PCR.....	7
2.2.4 ELEKTROFORESIA .....	8
2.2.5 BANDAREN PURIFIKAZIOA .....	9
2.2.6a PIROSEKUENTZIAZIOA.....	9
2.2.6b KLONAZIOA.....	9
2.3 EMAITZAK.....	11
2.4 EZTABAIDA .....	15
3. ONDORIOAK .....	17
4. BIBLIOGRAFIA:.....	18

# **1. SARRERA ETA HELBURUAK:**

## **1.1 SARRERA:**

### **Inpronta**

Epigenetika nukleotidoen sekuentzian aldaketarik jasan gabe geneen adierazpenean edo funtzioan sortzen diren aldaketa heredagarri mitotiko zein meiotikoen multzoa da. Aldaketa heredagarri horiek DNAREN metilazioek eta kromatinaren egituraren aldaketek ematen dituzte gehienbat (Bollati eta Baccarelli, 2010; Feil eta Fraga, 2012).

Inprontari esaten diogu jatorri alelikoaren arabera gene baten adierazpen selektiboari. Zelula diploide batean gene bakoitzaren bi kopia daude: kopia bat aitarengandik heredatutako kromosoman eta bestea amarengandik heredatutakoan. Gehienetan, alelo biek adierazpen maila berdintsua izaten dute. Baina badaude kasu batzuk zeinetan kopia bakarra adierazten den, bestea isilarazita dagoen bitartean (Watson *et al.*, 2005).

Inpronta amatiarra bada, amarengandik heredatutako aleloa inaktibatua dago eta inpronta aitatiarra bada, kontrakoa: aitarengandik heredatutako aleloa izango da inaktibatua egongo dena (Griffiths *et al.*, 2000). Geneen adierazpena erregulatzen duen mekanismo biologikoa da metilazioa. Hau da, eskualde bat metilatuta dagoenean, eskualde hori transkripzionalki inaktibatzen da. Gene inaktiboak, hortaz, aktiboak baino metilatuago daude (Baccarelli eta Bollati, 2009, Klug *et al.*, 2013).

Inprontaren ondorioa, beraz, gene hauek hemizigotikoak balira bezala adierazten direla da, nahiz eta zelula bakoitzean gene autosomiko hauen bi kopia egon. Inpronta gene gutxi batzuetan baino ez da ematen eta ehun motaren arabera desberdina da. Honen erantzulea, batez ere, DNAREN metilazioa da (Griffiths *et al.*, 2000).

DNAREN metilazioa zitosina (C) nukleotidoari metil talde bat gehitzean dantzan prozesu biokimiko bat da. Normalean zitosina horiek CpG irletan aurkitzen dira. Metilo taldea (CH<sub>3</sub>) atzetik guanina (G) bat duen zitosinaren 5. karbonoari batzen zaio 5-metilzitosina eratuz. Hau diferentzialki metilatutako guneean (DMR) gertatzen da. Diferentzialki metilatutako gunek, metilazio patroia desberdina duten

DNA guneak dira. Batzuk isildutako aleloan metilatzen dira beste batzuk kopia aktiboan metilatuak diren bitartean (Strachan eta Read, 2011; Feil eta Fraga, 2012; Klug *et al.*, 2013).

Gaur egun, 8 inpronta-gaixotasun ezagutzen dira gizakietan: Beckwith-Wiedemann sindromea (BWS, OMIM 130650), Silver-Russell sindromea (SRS, OMIM 180860), Prader-Willi sindromea (PWS, OMIM 176270), Angelman sindromea (AS, OMIM 105830), Temple sindromea (Buiting *et al.*, 2008), Kagami Ogata sindromea (OMIM 608149), jaioberrien diabete igarokorra (TNDM, OMIM 601410) eta pseudohipoparatiroidismoa 1B (PHP1B, OMIM 603233), baina gaixotasunen kopurua handituz doa (Abreu *et al.*, 2013).

### **Pseudohipoparatiroidismoa eta GNAS lokusa**

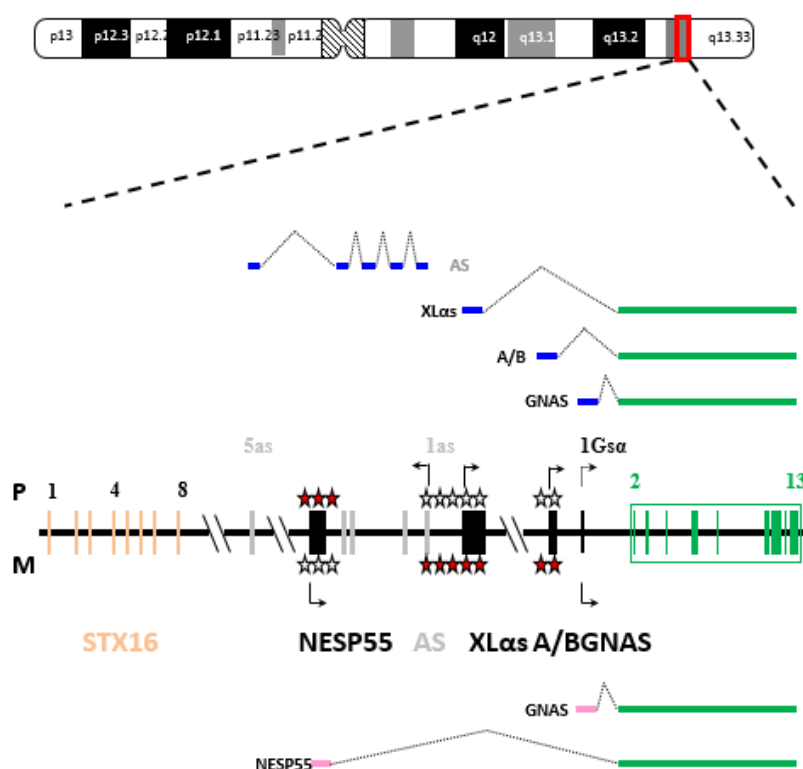
Pseudohipoparatiroidismoa (PHP) gaixotasun endokrino arraro bat da. Honen ezaugarriak hormona paratiroideoarekiko (PTH) erresistentzia, hipokaltzemia eta hipofosfemia dira (Bastepe eta Jüppner, 2000; Weinstein *et al.*, 2001; Levine, 2002).

Amaren aleloan, *GNAS* genean gerta daitezkeen mutazio desaktibakibatzaileak 1A motako pseudohipoparatiroidismoarekin (PHP1A) erlazionatzen dira. Aipatutako erresistentziaz gain, Albright-en osteodistrofia heredagarriaren (AHO) bereizgarria den fenotipoa dute (Albright *et al.*, 1942; Patten *et al.*, 1990; Weinstein *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2000b).

GNAS lokusean gertatzen diren metilazioaren aldaketak 1B pseudohipoparatiroidismoarekin (PHP1B) erlazionatzen dira.

GNAS inprontadun lokus konplexu bat da. *GNAS* geneak G proteina suspertzailearen ( $G\alpha$ ) alfa azpiunitatea kodetzen du.  $G\alpha$  hau hormona eta molekula endogeno askoren ekintzetarako funtsezkoa den proteina da (Bastepe eta Jüppner, 2000; Weinstein *et al.*, 2001; Levine, 2002).  $G\alpha$  geneak bi aleloren adierazpena dauka ia ehun gutzietan, baina aitaren aleloaren adierazpena isilarazita dago ehun gutxi batzuetan: giltzurrun-hodixka proximalak, jaioberrien ehun adiposo marroia, tiroidea, gonadak, hipotalamoaren eta pituitariaren nukleo parabentrikularra... (Campbell *et al.*, 1994; Hayward *et al.*, 2001; Mantovani *et al.*, 2002).

*GNAS* genea 20. kromosomaren beso luzean dago kokatuta gizakietan (Blatt *et al.*, 1988). *GNAS*ek bere barnean honakoak dauzka, besteak beste: 1) guanina nukleotidoekin lotura duen proteina suspertzailearen (G proteina) ( $G\alpha$ ) alfa azpiunitatea kodetzen duten transkriptoak, 2) oso luzea den  $G\alpha$  (*XL $\alpha$* ), 3) neuroendokrinoa den proteina jariatzailea 55 (NESP55), 4) kodetzekoak ez diren A/B eta 5) kontrako norabidea duten transkriptoak (GNAS-AS) (1. Irudia) (Bastepe eta Jüppner, 2000; Weinstein *et al.*, 2001; Levine, 2002).



**1.Irudia: GNAS lokusean antolamendua eta inpronta.** GNAS alelo aitatiarren (goian) eta amatiarren (behean) antolamendu eta inpronta patroi orokorrak agertzen dira. NESP55, XL, A/B eta Gas exoiak kutxa beltz moduan agertzen dira, 2 eta 13 exoiak kutxa berde moduan, ASren 5 exoiak kutxa gris moduan eta STX16 genearen 8 exoiak kutxa laranja moduan. Diferentzialki metilatutako gunek izartxo bezala agertzen dira (gorriz metilatuak eta zuriz metilatu gabekoak).

XLas, A/B eta AS transkriptoen promotoreek aitatiar adierazpena dute eta NESP55 transkriptoak amatiar adierazpena. Bestalde, promotore guztiek alelo inaktibatua metilatua dute (Hayward *et al.*, 1998a; Hayward *et al.*, 1998b; Peters *et al.*, 1999; Hayward eta Bonthron, 2000; Liu *et al.*, 2000a; Wroe *et al.*, 2000).

PHP1B gaixotasuna duten pazienteen %15-20k gutxi gora behera dute A/B DMRan metilazio galera (LOM). Metilazio galera hau *STX16* genean dauden delezio amatiarrekin lotuta dago (Bastepe *et al.*, 2003; Linglart *et al.*, 2005; Elli *et al.*, 2014).

PHP1B duten familia gutxi dituzte GNAS lokusean metilazio aldaketa nabariak (metilazio galera AS/NESPas-en, XLas-en eta A/Bn eta metilazio gehikuntza NESP55ean) eta delezio bat ASren 3 eta 4 exoiak kenduz, beste delezio bat NESPen eta ASn 4. introia ezabatuz edo NESPen delezio txikiak (Bastepe *et al.*, 2005; Chillambhi *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2012; Rezwani *et al.*, 2015).

PHP1B duten gaixo gehienek noizbehinkako gaitza dute, GNASen metilazio aldaketa zabal batekin, *STX16* eta AS geneetan mikrodeleziorik izan gabe eta kasu gutxi batzuetan UPD(20q)pat-rekin erlazionatuta dago. (Liu *et al.*, 2005; Bastepe *et al.*, 2001; Fernandez-Rebollo *et al.*, 2010; Bastepe *et al.*, 2011; Maupetit-Mehouas *et al.*, 2013; Dixit *et al.*, 2013).

PHP1B duten kasu batzuetan metilazioaren galera partziala izan daiteke baina ez dago argi zein den mosaizismo epigenetiko honen patroia eta arrazoia. Teknika kuantitatiboaren beharra dago aldaketa epigenetiko hau argitu ahal izateko.

### **Klonazioa:**

Klonazioari esker DNA zati baten kopia asko lortzen dira. Beraz, alelo bakoitzaren sekuentzia zehatza zein den jakin ahal izango da klonazioaren ostean sekuentziario bat eginez (Izquierdo, 1999a).

Klonazioak hainbat etapa ditu: DNA zatien eraketa (errestrikzio-endonukleasak erabilia), bektorearen eta DNA zatien edo insertoen lotura (ligasak erabilia), bektorea erreproduzitu dezakeen ostalarian sartzea eta genetikoki eraldatutako organismoaren hautaketa (Izquierdo, 1999b).

### **Pirosekuentziazioa:**

Pirosekuentziazioa luziferasa entzimak ATPa gastatuz igorriko duen argi ikusgarriaren neurketan oinarritzen da. Nukleotido desberdinak orden zehatz batean dispendentsatzen dira. Nukleotido hauek harizpiarekin elkartzean PPi askatuko da. PPi-ak ATP bihurtuko dira ATP sulfurilasari esker eta Adenosina 5'fosfosulfatoaren laguntzarekin. Luziferasa substratua oxiluziferina bihurtuko da orduan. Argi izpiak neurtu eta informazioa batuko da. Apirasak, bestalde, erabili ez diren nukleotidoak degradatuko ditu (Dejeux *et al.*, 2009).

Argi kantitatea sekuentziako nukleotido kopuruarekiko proportzionala da: honek ahalbidetzen du kuantifikazioa, hortaz. Sekuentziazio erreakzioan kimioluminiszentzia bidez sortzen den argia CCD kamerara bidaltzen du eta honek biltzen ditu irudiak (Dejeux *et al.*, 2009).

### **1.2 HELBURUAK:**

Lan honen helburua da DMRen metilazioaren galera partziala duten PHP1B pazienteen alelo bakoitzeko CpG posizio bakoitzaren metilazio maila neurtzea ahalbidetzen duen metodo azkar, erraz eta merke bat diseinatzea, garatzea eta balioztatzea.

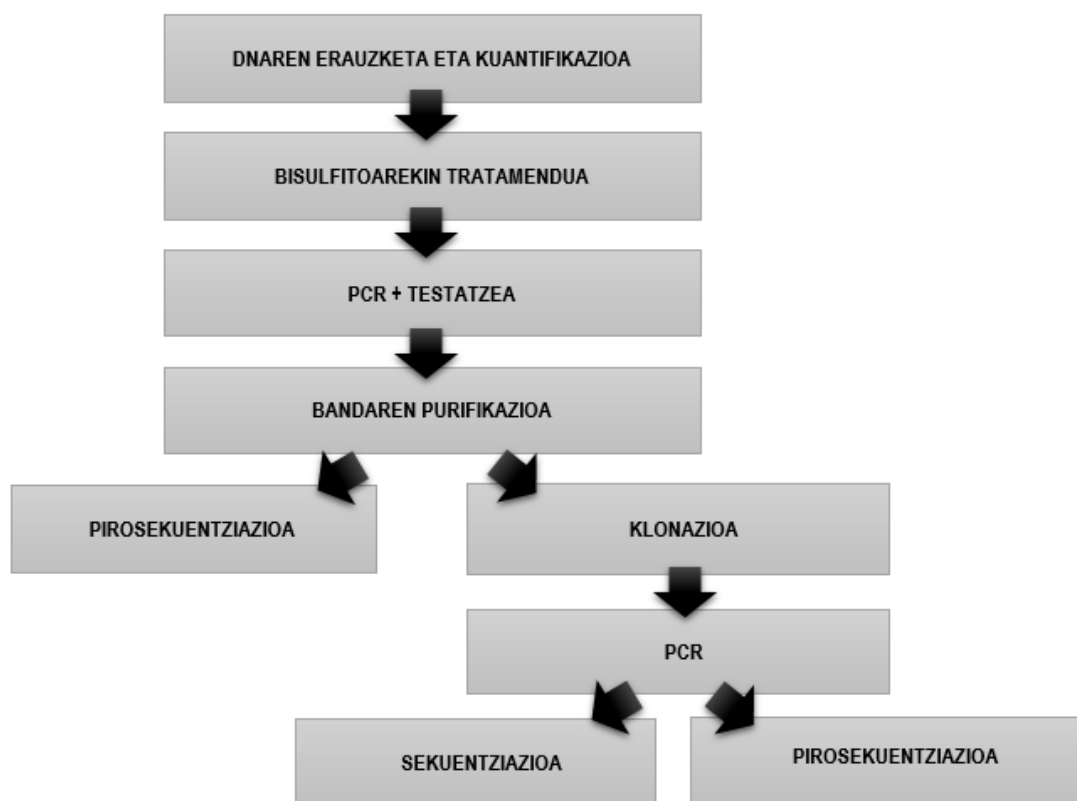
## **2. GARAPENA:**

### **2.1 PAZIENTEAK:**

PHP1B eta XLas-en metilazioaren galera partziala duen gaixo bat eta 8 kontrol osasuntsu (GNAS lokusean metilazioaren aldaketarik ez dutenak).

### **2.2 METODOAK:**

**2.irudian** azaltzen zaigu zein izan zen helburua aurrera eramateko erabili zen prozedura orokorra.



2. Irudia: egin zen prozeduraren eskema orokorra.

### 2.2.1 DNAREN erauzketa eta kuantifikazioa

DNAREN erauzketarako DNA QIACUBE (Qiagen, Düren, Alemania) protokoloa erabili zen, odoletik abiatuta. Lagin bakoitzeko 200  $\mu\text{L}$  odol erabili ziren eta 100  $\mu\text{L}$  TE indargetzailean eluitu zen erauzitako DNA.

DNAREN purutasuna, kalitatea eta kontzentrazioa NanoVue Plus espektrofotometroarekin frogatu ziren absorbantzien ratioa neurtuta  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ .



### 2.2.2 Bisulfitoarekin tratamendua

Metilazioaren egoera aztertzeko bisulfitoarekin tratamendua erabili zen. Honek metilatuak ez diren zitosinak urazilo bihurtzen ditu baina metilatutako zitosinetan ez du inolako eraginik eta beraz, zitosina izaten jarraitzen dute (Yuanyuan eta Trygve, 2011).

DNA bisulfitoarekin modifikatzeko “Ez DNA Methylation-Gold Kit” (Zymo Research, Irvine, CA) erabili zen egilearen argibideak jarraituz. Eluzio finalean 40µL erabili ziren 10µL erabili beharrean.

### 2.2.3 PCR

PCRaren bidez bisulfitatutako laginen anplifikazioa egin zen “PyroMark PCR Kit”-a erabilita, haien argibideak jarraituz, salbuespen bat izan ezik. 2.2.5 atalean 50 µL behar zirenez, PCR produktuen kantitateak bikoiztu ziren, 25 µL-tik 50 µL-ra pasatuz (**1. Taula**):

1. Taula: PCRan erabili ziren kantitateak.

	<b>1x</b>
<b>Primer mix (µL)</b>	5
<b>PyroMark PCR Master Mix, 2x (µL)</b>	25
<b>H<sub>2</sub>O (µL)</b>	16
<b>DNA (µL)</b>	4
<b>Guztira (µL)</b>	50

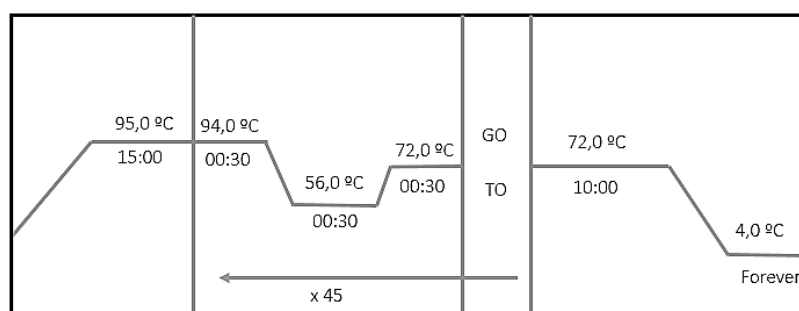
DMR bakoitzaren azterketa egiteko guk “PyroMark assay design v2.0” softwarearen bidez diseinatutako hasleen (*primer mix*) sekuentziak hurrengo taulan (**2. Taula**) agertzen dira. XL, A/B eta NESP aztertzeko komertzialki eskuragarri dauden entseguak erabili ziren (PyroMark Assay GNAS10, PyroMark Assay GNAS13,

PyroMark Assay GNAS16; PyroMark Assay GNAS04, PyroMark Assay GNAS05; PyroMark Assay GNAS-AS2; hurrenez hurren):

**2. Taula: DMR bakoitzerako Forward eta Reverse hasleen sekuentziak.** (\*) duten hasleak biotinizatuak daude.

DMR	Forward haslea	Reverse haslea
NESP1	GAGGAGGTAGATTTTGAGTTGT(*)	AAACTCCTCCCCTTCCCAAA
NESP2	GAAGGAGTTTAAGGAGGAGAAGTA	TTATGAAAATAAGGAGAATTTGGA (*)
AS	GGTGTGGGTATTTATTTTGGTTAGT(*)	TAATCAATCAACTCCTTTAACCCC

PCRaren baldintzak (denborak eta temperaturak) **3. Irudian** agertzen dira:



**3. Irudia: termozikladoreak PCRa egiteko behar zituen zikloak, temperatura eta denborekin.**

## 2.2.4 Elektroforesia

PCRaren ostean DNA zatien amplifikazioa ondo egin zela egiaztatzeko eta ondoren egin zen bandaren purifikazioa burutzeko, %1.5 agarosazko gel batean elektroforesi bat egin zen 20 minutuz 100V-tan.

### **2.2.5 Bandaren purifikazioa**

Bandaren purifikazioa “QIAquick Gel Extraction Kit Protocol”-ren bidez (Qiagen) egin zen, azkenean 30µl-tan eluituz.

Lortutako 30µl-ak erdibanatu ziren bi prozedura desberdin egiteko: pirosekuentziak alde batetik eta klonazioa bestetik.

#### **2.2.6a Pirosekuentziak**

Pirosekuentziak “PyroMark Q24” eta “PyroMark Q24 Vacuum Workstation” gailuetan egin zen. Pirosekuentziak erreakzio egiteko “PyroMark Q24 Vacuum Workstation quick-star guide” erabili zen eta datuak “PyroMark Q24 v2.0.6.20” softwarearen bidez aztertu ziren.

#### **2.2.6b Klonazioa**

##### 2.2.6b.1 Transformazioa

Klonazioa puntuan jartzeko 2 inserto mota erabili ziren. Bata 154 base paretakoa (Nesp 2) eta bestea 202 base paretakoa (GNAS04).

Inserto kantitate desberdinekin probatu zen ligazio-prozedura eraginkorra lortzeko. Anplifikatuaren 2µl, 3µl eta 4µl-rekin egin zen proba. Gainera, transformaziorako ligazio-produktuaren bolumen desberdinekin ere probak egin ziren (1µl, 1.5µl eta 3µl erabilita).

Transformaziorako egiteko “One Shot® chemical transformation” (Invitrogen, CA, EE.UU) protokoloa erabili zen, egilearen argibideak jarraituz.

##### 2.2.6b.2 Koloniaren PCR-a

Anpizilinarekin dauden LB/agar plaketako kolonien hazkuntza begiratu zen eta ausaz 100 aukeratu ziren.

Kolonia bakoitzaren amplifikazioa egin zen PCR bidez 2.2.3 atalean egin zen bezala baina kasu honetan azken bolumena 25µl-koa izanik.

PCR bidez lortutako 100 produktuetatik ausaz hamarretan ondo amplifikatu zirela baieztatu zen, elektroforesi bidez, 2.2.4 atalean egin zen bezala.

#### 2.2.6b.3a Sekuentziazioa

Kolonia bakoitzaren metilazioa aztertu zen sekuentziazio bidez. Horretarako hurrengo prozedura erabili zen:

Soberan zeuden dNTPak eta hasleak ExoSAP-IT® (Affimetrix USB, Santa Clara, CA) bidez kendu ziren hasteko. Honetarako, 5 µl PCR produktu eta 2 µl ExoSAP nahastu ziren. Erreakzioaren baldintzak honakoak izan ziren: 37°C-tan 15 minutu eta 80°Ctan 15 minutu.

Purifikatutako PCR produktuak Sanger metodo fluoreszentearen bidez sekuentziatuak izan ziren (fluoreszente ki markatutako ddNTPak erabili ziren gero elektroforesi kapilarraren bidez aztertu ahal izateko). Honetarako, “Applied Biosystems”-en “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit” erabili zen. Sekuentziazioa BioRad C1000 termozikladorean egin zen “Applied Biosystems” protokoloak azaltzen zuen bezala.

Prezipitazioa EtOH/EDTA/NaAc-rekin egin zen sekuentziazio erreakzioko produktua purifikatzeko. Pausu hau oso garrantzitsua da batu gabeko ddNTP fluoreszenteak kentzen baitira eta honela, aztertu beharreko DNA zatiak baino ez dira geratzen. “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Protocol, Part N° 4337035 Rev.A, 4. Kapitulu, 7-10 orrialdeak” protokoloa erabili zen honetarako.

Elektroforesi kapilar bat egin zen purifikatutako sekuentziazio-produktuekin ABI3500 sekuentziadore batean eta lortutako emaitzak “sequencing analysis v5.4” software baten bidez aztertu ziren.

#### 2.2.6b.3b Pirosekuentziazioa

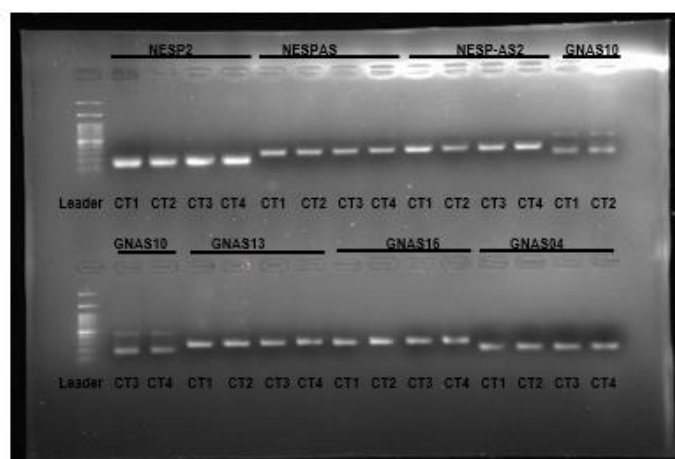
Kolonia bakoitzaren metilazioa aztertu zen pirosekuentziazio bidez. Prozedura 2.2.6a atalean azaldutakoaren berdina da.

## 2.3 EMAITZAK

Emaitzak bi ataletan banatuko dira. Lehenengoa protokoloa puntuan jartzea izango litzateke eta bigarrena, behin lehena lortuta, prozeduraren balioztatzea izango litzateke.

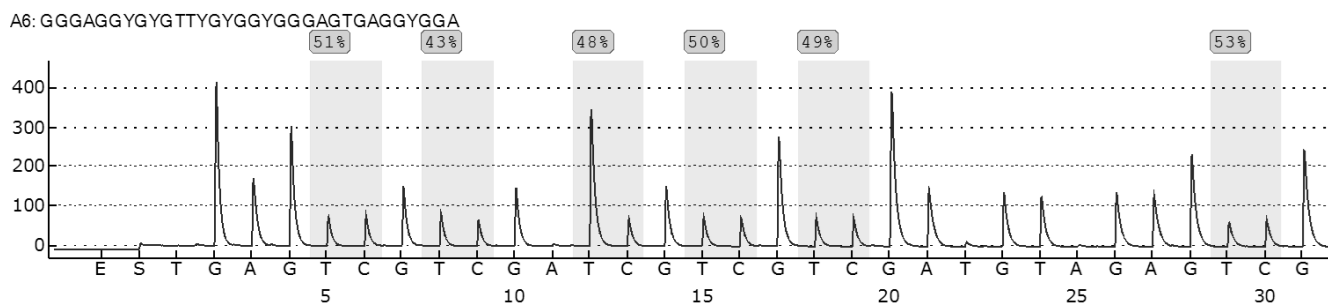
### 1. Protokoloa puntuan jartzea:

DMR guztientzako PCRa prest zegoela ikusteko, 1.5% agarosan elektroforesia egin zen. Elektroforesiaren emaitzak **4. Irudian** agertzen dira. DMR bakoitza aztertzeko lau kontrolen (CT1, CT2, CT3 eta CT4) anplifikazioa egin zen.



**4. Irudia:** PCR bidez egindako DMR bakoitza aztertzeko 4 kontrolen (CT1, CT2, CT3 eta CT4) anplifikazioaren emaitzak. 1.5% agarosa gelean egin zen. Kaleen azpian agertzen diren letrak kontrolei dagozkie eta goian agertzen direnak aztertzen diren DMRei. Lehen bi kaleetan (goian eta behean) markatzailea sartu zen.

Kontrolen metilazioa pirosekuentziazioz aztertu zen **5. Irudian** azaltzen den bezala eta CpG bakoitzean %50a metilatuta zegoela erakutsi zuen, espero zen moduan.



**5. Irudia: lehen pirosekuentziarioaren pirograma.** Honek, CpG bakoitzean dagoen metilazio maila erakusten du. Kasu honetan, CpG guztiek %50 inguruko metilazioa dute.

Klonazioa:

Intserto eta ligazio-produktuen arteko baldintzak finkatzeko zenbait proba egin ziren.

**3. taulan** erakusten da plaketan agertu ziren kolonien kopurua, baldintza desberdinetan.

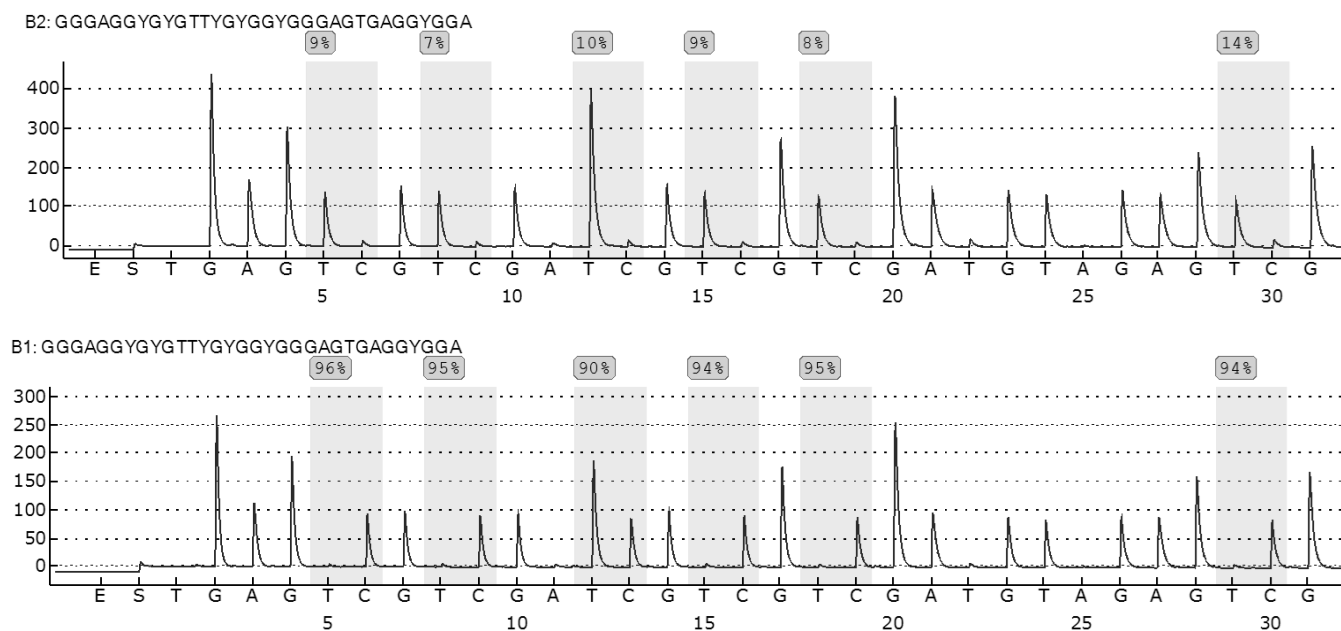
**3. Taula: baldintza desberdinetan plaketan agertu ziren kolonien kopurua agertzen da** (batuz bestekoa  $\pm$  desbideratze tipikoa).

		Intserto kantitatea		
		2 $\mu$ l	3 $\mu$ l	4 $\mu$ l
Ligazio-produktuaren kantitatea	1 $\mu$ l	9 $\pm$ 5 kolonia/plaka	13 $\pm$ 2 kolonia/plaka	51 $\pm$ 6 kolonia/plaka
	1,5 $\mu$ l	32 $\pm$ 6 kolonia/plaka	35 $\pm$ 4 kolonia/plaka	88 $\pm$ 12 kolonia/plaka
	3 $\mu$ l	76 $\pm$ 9 kolonia/plaka	90 $\pm$ 8 kolonia/plaka	128 $\pm$ 15 kolonia/plaka

Beraz, protokolorik onena 4 $\mu$ l intsertorekin eta 3 $\mu$ l ligazio-produkturekin lortu zen.

Alelo bakoitzaren metilazioa ikusteko, prozedurarik arinena sekuentziatzea da, aldi berean 96 lagin azter daitezkelako. Beraz, 48 kolonia hartu, PCRaren bidez amplifikatu eta zuzenean sekuentziatu ziren. Zoritxarrez lortutako emaitzak ez ziren

baliagarriak izan sekuentziaren seinalea eta zaratarena antzekoak zirelako (emaitzak ez dira erakusten). Beste 48 kolonia hartu, amplifikatu eta zuzenean pirosekuentziatu ziren eta oso emaitza onak lortu ziren **6. Irudian** ikusten den moduan.

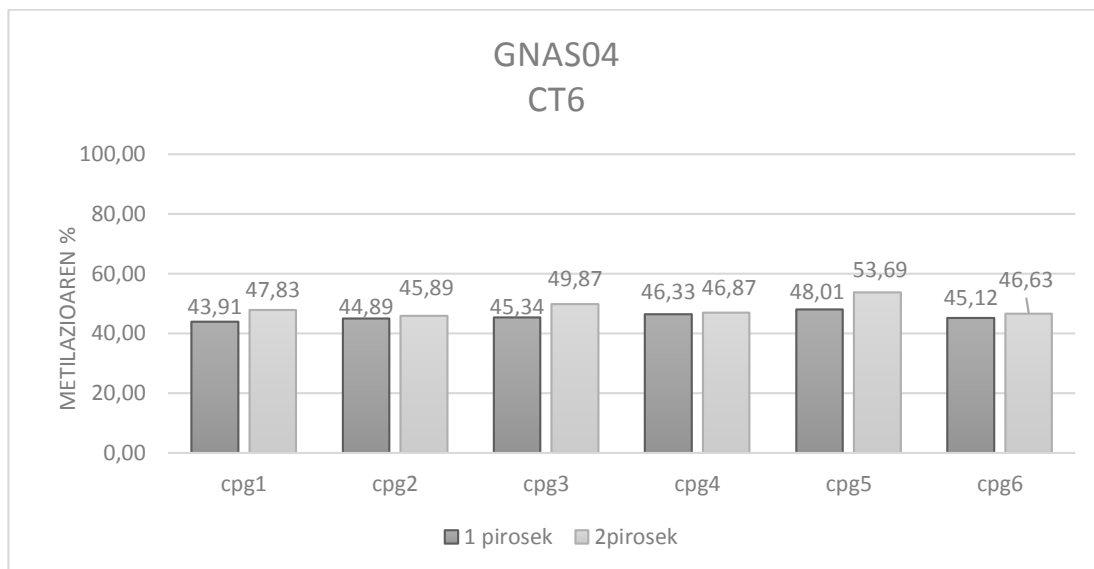


**6. Irudia: pirosekuentziarioaren pirogramak.** Hauek CpG bakoitzean dagoen metilazio maila erakusten dute. Goiko pirograman CpGak ez daude metilatuak. Behekoan, berriz, guztiz metilatuak daude.

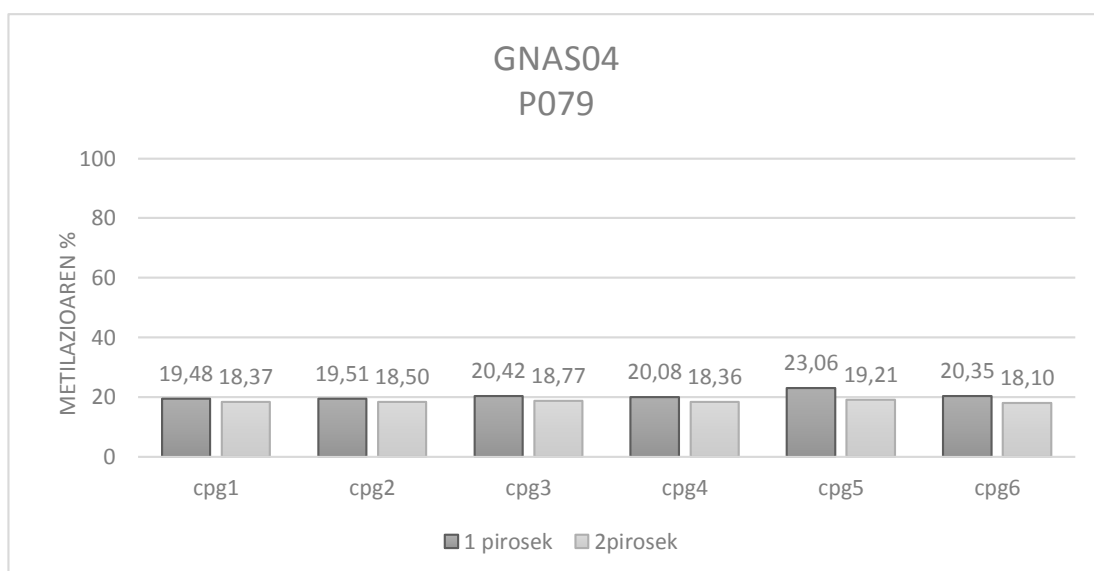
## 2. Balioztatzea:

Behin protokoloa diseinatuta zegoela kontrol osasuntsu batekin (CT6) eta gaixo batekin (079) balioztatu zen. Metilazioaren ehunekoak aztertu ziren egindako bi pirosekuentziatioetan.

CpG irla bakoitzaren metilazioen ehunekoak alderatzean ikusi zen emaitza oso antzekoak lortzen zirela DNA genomikoaren eta klonatu osteko PCR-produktuen artean (**7. eta 8. Irudiak**).



**7. Irudia: CT6 kontrolaren pirosekuentziaren emaitzak GNAS04rako.** Aztertutako eskualdearen CpG irla bakoitzeko metilazioaren ehunekoa adierazten da. Gris iluna (1 pirosek.) DNA genomikoaren azterketari dagokio eta gris argia (2 pirosek.) klonazioaren osteko 96 kolonien metilazioen batz bestekoari.



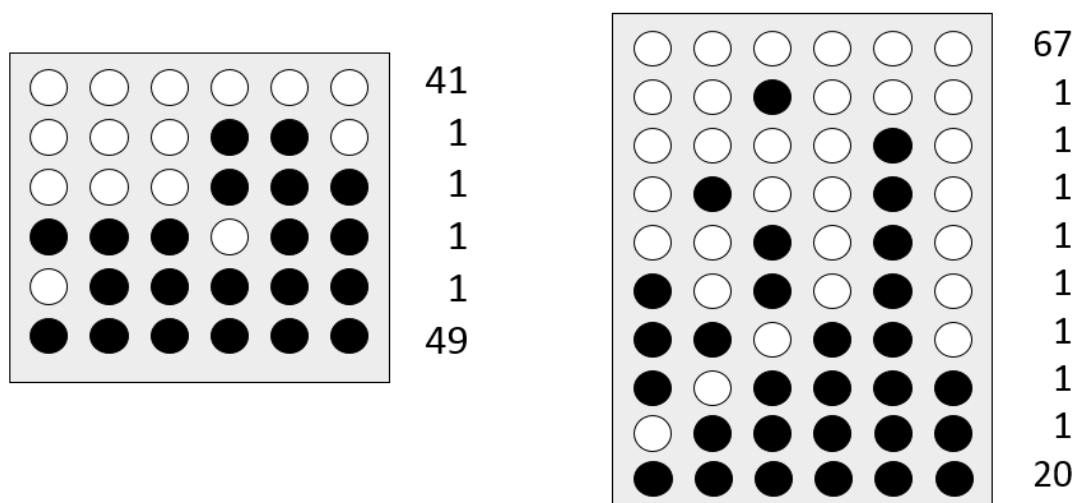
**8. Irudia: P079 gaixoaren pirosekuentziaren emaitzak GNAS04rako.** Aztertutako eskualdearen CpG irla bakoitzeko metilazioaren ehunekoa adierazten da. Gris iluna (1 pirosek.) DNA genomikoaren azterketari dagokio eta gris argia (2 pirosek.) klonazioaren osteko 96 kolonien metilazioen batz bestekoari.

Espero zen bezala, kontrolaren metilazioaren ehunekoa 50 ingurukoa izan zen eta metilazio galera duen gaixoaren kasuan %20 ingurukoa. Gainerako DMRen entseguen emaitzek aurretik lortutako emaitzak baieztatu zituzten, teknika balioztatuz.



Klonazioaren osteko pirosekuentziazioan 0 eta 100 absolutuak ez zeudenez (**6. Irudia**), %15a baino txikiagoak ziren ehunekoak 0 kontsideratu ziren eta %85 baino handiagoak zirenak 100 (Garin *et al.*, 2015). Horrela, klonazioaren azterketak entsegu honetan orokorrean metilazio patroia alelo osoan zehar mantentzen zela ikustea ahalbidetu zigun, bai kontrolean (**9. Irudia**, ezkerrean) eta baita gaixoan ere (**9. Irudia**, eskuinean).

Aipatzekoa da aleloa guztiz metilatuta edo guztiz metilatu gabea ez dagoenean, metilazio patroiak kontrolaren eta gaixoaren artean oso desberdinak direla.



**9. Irudia: GNAS04 entsegurako alelo desberdinen metilazio patroien banaketa.** CT6 kontrola ezkerrean eta 079 gaixo eskuinean. Borobil txuriek metilatu gabeko CpGak direla adierazten dute eta beltzek metilatuta daudela. Zenbakiak, bestalde, patroijakin hori zenbat koloniek duten adierazten dute.

## 2.4 EZTABAIDA

Inpronta gaixotasun (ID) gehienetan, lau aldaketa molekular berdin agertzen dira: gurasobakarreko disomia (UPD), desoreka kromosomikoa, ohikoa ez den metilazioa (epimutazioa) eta mutazio genomikoak inpronta duten geneetan. Funtsezkoa da aldaketa epigenetikoaren azpian dagoen mekanismo genetikoaren ezagutzea aholku genetiko egokia emateko.

Gainera, ID batzuetan diagnostikatzeko zaila den mosaizismo somatiko eta germinala ikusi da eta kontutan hartu behar da azterketa genetiko molekular zuzena egin ahal izateko (Mackay *et al.*, 2015).

Mosaizismo epigenetikoaren duten gaixoen metilazio patroia aztertzen duen lanik ez dago. Mosaizismo hau bi arrazoiengatik gerta liteke: lehenengoa, zatiketa mitotikoaren ostean zelula batzuetan metilazioaren finkaketan akatsen bat gertatzea izango litzateke. Ez da, beraz, zelula amaren patroia modu egokian kopiatzen eta aleloa guztiz metilatuta edo guztiz demetatuta duten zelula semeak egongo dira. Bigarren arrazoa, ordea, metilazioaren mantentzean akatsen bat gertatzea izango litzateke, CpG irla batzuetan eragina izanda eta beste batzuetan ez (Silva *et al.*, 1993).

Beraz, mosaizismo epigenetikoaren patroia eta arrazoiak zeintzun diren argi ez dagoenez, teknika kuantitatiboak behar dira aldaketa epigenetikoaren argitu ahal izateko. Zenbait teknika daude metilazioa kuantifikatzeko: MS-MLPA (Nygren *et al.*, 2005), MS-PCR (Licchesi eta Herman, 2009), Ms-SNuPE (Gonzalvo eta Jones, 1997), COBRA (Xiong eta Laird, 1997), pirosekuentziak (Dejeux *et al.*, 2009) eta klonazioa gehi sekuentziak.

Metodorik egokiena klonazioa gehi sekuentziak da baina denbora askoren beharra duenez pirosekuentziak izango litzateke aukerarik onena, honek kuantifikazioa MS-MLPAk, MS-PCRk, Ms-SNuPEk eta COBRAk baino hobeto egiten duelako (Lee *et al.*, 2013). Honen arazoa da ez duela alelo bakoitzaren metilazio patroia ikustea ahalbidetzen. Beraz, klonazio gehi sekuentziak bidez egitea proposatu zen baina emaitza oso txarrak lortu zirenez, klonazio gehi pirosekuentziak egitea erabaki zen mosaizismo epigenetikoaren kuantifikazioa egiteko.

Prozedura hau era erraz, merke eta azkar batean egin ahal izateko hainbat proba egin ziren protokolo egokia finkatu zen arte. Jakina da intserto eta plasmido erlazio egoki bat izatea garrantzitsua dela ligazioa ondo burutu dadin. Bestalde, transformatu den ligazio-produktuaren kantitatea kontrolatu behar da. (Allison, 2007).

Lan honetan egin diren saiakuntzek aditzera eman dute 150-200 base paretakeo intsertoentsako 4µl intserto eta 3µl ligazio-produktu direla baldintzarik egokienak.

Zenbat eta intserto gehiago egon, orduan eta ligazio hobea izango da saturazio puntu batera heltzen ez den bitartean.

Bestalde, aurretik aipatu den bezala, sekuentziazioa pirosekuentziazioa baino azkarragoa da (sekuentziazioak aldi berean 96 lagin azter ditzakeen bitartean, pirosekuentziazioak 24 aztertzen ditu) Gure esperimentuetan emaitza oso txarrak lortu ziren eta horregatik baztertu genuen. Ziurrenik honen arrazoia honakoa izango litzateke: PCR eta sekuentziazioan hasle bera erabili izana. Izan ere, agarosan ikusezina den banda ez-espezifikoren bat egotekotan, hau ere sekuentziazioan litzateke eta honek seinalean eragina izango luke. Pirosekuentziazioan, ordea, azken erreakzioan barrurago dagoen haslea erabili zen.

DNA genomikoaren metilazio maila eta klonatu eta gero ikusten ziren metilazioaren ehunekoak alderatu ziren eta ehunekoak oso antzekoak ziren. Beraz, lan honetan puntuan jarri dugun protokolo hau erabilgarria da GNASen edozein DMR aztertzeko.

Klonazio osteko pirosekuentziazioak alelo bakoitzeko CpG irlen metilazio patroia ezartzea ahalbidetzen digunez, gure emaitzetatik hurrengoa ondoriozta dezakegu: nahiz eta metilazio galera duen gaixoaren alelo gehienetan metilazioaren finkaketan akatsen bat gertatu den dirudien, zelula gutxi batzuetan metilazioaren mantentzean akatsen bat gertatu dela dirudi. Gaixo gehiagotan egindako entsegu gehiago egin behar dira protokolo honekin hipotesi hau berretsi ahal izateko.

### **3. ONDORIOAK**

Metilazioaren galera partziala duten PHP1B pazienteen alelo bakoitzeko CpG posizio bakoitzaren metilazio maila neurtzea ahalbidetzen duen prozedura honakoa izango litzateke: ligazioan 4µl intserto nahastu behar dira 1µl bektorerekin eta transformazioan 3µl ligazio-produktu gehitu behar zaizkie 25µl bakteriei. Klonazioaren ostean pirosekuentziazioa erabiliko da.

Protokolo azkar, erraz eta merke bat diseinatu, garatu eta balioztatu da modu honetan mosaizismo epigenetikoaren kuantifikazioa egin ahal izateko.

#### 4. BIBLIOGRAFIA:

Abreu, A.P., Dauber, A., Macedo, D.B., Noel, S.D., Brito, V.N., Gill, J.C., Cukier, P., Thompson, I.R., Navarro, V.M., Gagliardi, P.C., Rodrigues, T., Kochi, C., Longui, T., Kochi, C., Longui, M.D., Dominique, M.D., Francis de Zegher, D., de Zegher, F., Montenegro, L.R., Mendonca, B.B., Carroll, R.S., Hirschhorn, J.N., Latronico, A.C., Kaiser, U.B. 2013. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med.* 368: 2467 – 75.

Albright, F., Burnett, C.H., Smith, P.H., Parson, W. 1942. Pseudohypoparathyroidism- an example of "Seabright syndrome". *Endocrinology.* 30 922-32.

Allison, L.A.. 2007. Recombinant dna technology and molecular cloning in Allison, L.A fundamental molecular biology Wiley. Pp 180-231

Griffiths A.J.F., Richard C. Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C. 2000. Regulacion de la transcripcion in Griffiths A.J.F., *Genética moderna-n.* McGraw-Hill Interamericana, Madrid.

Baccarelli, A. eta Bollati, V. 2009. Epigenetics and Enviromental Chemicals. National Institut of Health. 21(2):243-251

Bastepe, M., Jüppner, H. 2000. Pseudohypoparathyroidism: new insights into an old disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 29: 569– 589.

Bastepe, M., Lane, A.H., Juppner, H. 2001. Paternal uniparental isodisomy of chromosome 20q--and the resulting changes in GNAS1 methylation--as a plausible cause of pseudohypoparathyroidism. *Am J Hum Genet.* 68:1283-9.

Bastepe, M., Frohlich, L.F., Hendy, G.N., Indridason, O.S., Josse, R.G., Koshiyama, H., Körkkö, J., Nakamoto, J.M., Rosenbloom, A.L., Slyper, A.H., Sugimoto, T., Tsatsoulis, A., Crawford, J.D., Jüppner, H. 2003. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS. *J Clin Invest.* 112:1255-63.

Bastepe, M., Fröhlich, L.F., Linglart, A., Abu-Zahra, H.S., Tojo, K., Ward, L.M., Jüppner, H. 2005. Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type Ib. *Nature genetics*. 37:25-7.

Bastepe, M., Altug-Teber, O., Agarwal, C., Oberfield, S.E., Bonin, M., Juppner, H. 2011. Paternal uniparental isodisomy of the entire chromosome 20 as a molecular cause of pseudohypoparathyroidism type Ib (PHP-Ib). *Bone*. 48:659-62.

Blatt, C., Eversole-Cire, P., Cohn, V.H., Zollman, S., Fournier, R.E., Mohandas, L.T., Nesbitt, M., Lugo, T., Jones, D.T., Reed, R.R., Weiner, L.P., Sparkes, R.S., Simon, M.I. 1988. Chromosomal localization of genes encoding guanine nucleotide-binding protein subunits in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 7642–7646.

Bollati, V. eta Baccarelli, A. 2010. Environmental Epigenetics. *Nature*. *Heredity* 105, 105-112.

Buiting, K., Kanber, D., Martin-Subero, J.I., Lieb, W., Terhal, P., Albrecht, B., Purmann, S., Gross, S., Lich, C., Siebert, R., Horsthemke, B., Gillessen-Kaesbach G. 2008. Clinical features of maternal uniparental disomy 14 in patients with an epimutation and a deletion of the imprinted DLK1/GTL2 gene cluster. *HumMutat*. 29: 1141 – 6

Campbell, R., Gosden, C.M., Bonthron, D.T. 1994. Parental origin of transcription from the human GNAS1 gene. *JMedGenet*. 31:607-14.

Chillambhi, S., Turan, S., Hwang, D.Y., Chen, H.C., Juppner, H., Bastepe, M. 2010. Deletion of the noncoding GNAS antisense transcript causes pseudohypoparathyroidism type Ib and biparental defects of GNAS methylation in cis. *J Clin Endocrinol Metab*. 95:3993-4002.

Dixit, A., Chandler, K.E., Lever, M., Poole, R.L., Bullman, H., Mughal, M.Z., Steggall, M., Suri, M. 2013. Pseudohypoparathyroidism type 1b due to paternal uniparental disomy of chromosome 20q. *J Clin Endocrinol Metab*. 98:E103-8.

Elli, F.M., de Sanctis, L., Peverelli, E., Bordogna, P., Pivetta, B., Miolo, G., Beck-Peccoz, P., Spada, A., Mantovani, G. 2014. Autosomal dominant

pseudohypoparathyroidism type Ib: a novel inherited deletion ablating STX16 causes loss of imprinting at the A/B DMR. *J Clin Endocrinol Metab.* 99:E724-8.

Dejeux, E., El abdalaoui, H., Glynne, G.I., Tost, J. 2009. Identification and Quantification of Differentially Methylated Loci by Pyrosequencing Technology; in Tost, J. *DNA Methylation: Methods and Protocols*, second edition, vol.507. Humana Press pp 189-205

Feil, R., eta Fraga, M.F. 2012. Epigenetics and the environment: emergin patterns and implication. *Nature Genetics.* Vol 13. 97-109.

Fernández-Rebollo, E., Lecumberri, B., Garin, I., Arroyo, J., Bernal-Chico, A., Goñi, F., Orduña, R.; Spanish PHP Group, Castaño, L., de Nanclares, G.P. 2010. New mechanisms involved in paternal 20q disomy associated with pseudohypoparathyroidism. *Eur J Endocrinol.* 163:953-62.

Garin, I., Mantovani, G., Aguirre, U., Barlier, A., Brix, B., Elli, F.M., Freson, K., Grybek, V., Izzi, B., Linglart, A., de Nanclares, G.P., Silve, C., Thiele, S., Werner, R. 2015. European guidance for the molecular diagnosis of pseudohypoparathyroidism not caused by point genetic variants at GNAS: an EQA study. *Eur J Hum Genet.* 23(4):560.

Gonzalgo, M.L., Jones, P.A. 1997. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.* 25(12):2529-31.

Hayward, B.E., Kamiya, M., Strain, L., Moran, V., Campbell, R., Hayashizaki, Y., Bonthron, D.T. 1998a. The human GNAS1 gene is imprinted and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 10038–10043.

Hayward, B.E., Moran, V., Strain, L., Bonthron, D.T. 1998b. Bidirectional inpronta of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 15475–15480.

Hayward, B.E., Bonthron, D. 2000. An imprinted antisense transcript at the human GNAS1 locus. *Hum Mol Genet.* 9: 835–841.

Hayward, B.E., Barlier, A., Korbonits, M., Grossman, A.B., Jacquet, P., Enjalbert, A., Bonthron, D.T. 2001. Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *J Clin Invest.* 107:R31-R6.

Izquierdo, M. 1999a. Conceptos basicos de genetica molecular; in Izquierdo M *Ingeniería Genética y Transferencia Génica.* Pirámide. pp. 21-40

Izquierdo, M. 1999b. Amplificacion de secuencias por metodos de ingenieria genetica y obtencion de DNA recombinante; in Izquierdo M. *Ingeniería Genética y Transferencia Génica.* Pirámide. pp 101-146

Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A. eta Palladino, M.A. 2013. *Conceptos de genética.* 10. edizioa. Pearson (103, 203)

Lee, B.H., Kim, G.H., Oh, T.J. 2013. Quantitative analysis of methylation status at 11p15 and 7q21 for the genetic diagnosis of Beckwith–Wiedemann syndrome and Silver–Russell syndrome. *J Hum Genet*; 58: 604–610.

Levine, M.A. 2002. Pseudohypoparathyroidism; in Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology.* New York, Academic Press, pp 1137–1163.

Licchesi, J.D.F., Herman, J.G. 2009. Methylation-Specific PCR in Jörg Tost. *DNA Methylation: Methods and Protocols*, second edition, vol. 507. Pp 305-323

Linglart, A., Gensure, R.C., Olney, R.C., Juppner, H., Bastepe, M. 2005. A novel STX16 deletion in autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib redefines the boundaries of a cis-acting imprinting control element of GNAS. *Am J Hum Genet.* 76:804-14.

Liu, J., Yu, S., Litman, D., Chen, W., Weinstein, L. 2000a. Identification of a methylation imprint mark within the mouse Gnas locus. *Mol Cell Biol.* 20: 5808–5817.

Liu, J., Litman, D., Rosenberg, M.J., Yu, S., Biesecker, L.G., Weinstein, L.S. 2000b. A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type IB. *J Clin Invest.* 106:1167-74

Liu, J., Nealon, J.G., Weinstein, L.S. 2005. Distinct patterns of abnormal GNAS imprinting in familial and sporadic pseudohypoparathyroidism type IB. *Hum Mol Genet.* 14:95-102.

Mackay, D.J., Eggermann, T., Buiting, K., Garin, I., Netchine, I., Linglart, A., de Nanclares, G.P. 2015. Multilocus methylation defects in imprinting disorders. *Biomol Concepts.* Mar;6(1):47-57.

Mantovani, G., Ballare, E., Giammona, E., Beck-Peccoz, P., Spada, A. 2002. The *gsalpha* gene: predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:4736-40.

Maupetit-Méhouas, S., Azzi, S., Steunou, V., Sakakini, N., Silve, C., Reynes, C., Perez de Nanclares, G., Keren, B., Chantot, S., Barlier, A., Linglart, A., Netchine, I. 2013. Simultaneous hyper- and hypomethylation at imprinted loci in a subset of patients with GNAS epimutations underlies a complex and different mechanism of multilocus methylation defect in pseudohypoparathyroidism type 1b. *Human mutation.* 34:1172-80.

Nygren, A.O., Ameziane, N., Duarte, H.M., Vijzelaar, R.N., Waisfisz, Q., Hess, C.J., Schouten, J.P., Errami, A. 2005. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* 33(14):e128.

Patten, J.L., Johns, D.R., Valle, D., Eil, C., Gruppuso, P.A., Steele, G., Smallwood, P.M., Levine, M.A. 1990. Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N Engl J Med.* 322:1412-9.

Peters, J., Wroe, S.F., Wells, C.A., Miller, H.J., Bodle, D., Beechey, C.V., Williamson, C.M., Kelsey, G. 1999. A cluster of oppositely imprinted transcripts at the *Gnas* locus in the distal inpronta region of mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 3830–3835.

Richard, N., Abeguilé, G., Coudray, N., Mittre, H., Gruchy, N., Andrieux, J., Cathebras, P., Kottler, M.L. 2012. A new deletion ablating NESP55 causes loss of



maternal imprint of A/B GNAS and autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b. *J Clin Endocrinol Metab.* 97:E863-7.

Rezwan, F.I., Poole, R.L., Prescott, T., Walker, J.M., Karen, I., Mackay, D.J. 2015. Very small deletions within the NESP55 gene in pseudohypoparathyroidism type 1b. *Eur J Hum Genet.* 23:494-9.

Strachan, T. eta Read, A. 2011. *Human Molecular Genetics.* 4th edition. 279-285

Silva, A.J., Ward, K., White, R. 1993. Mosaic methylation in clonal tissue. *Dev Biol.* Apr;156(2):391-8.

Watson, James D. 2005. Regulacion genica en los eucariontes in Watson, James, D., *Biología Molecular del Gen.* Editorial Médica Panamericana. pp 595-600

Weinstein, L.S., Gejman, P.V., Friedman, E., Kadowaki, T., Collins, R.M., Gershon, E.S., Spiegel, A.M. 1990. Mutations of the Gs alpha-subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:8287-90.

Weinstein, L.S., Yu, S., Warner, D.R., Liu, J. 2001. Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic inpronta. *Endocr Rev.* 22: 675– 705.

Wroe, S.F., Kelsey, G., Skinner, J.A., Bodle, D., Ball, S.T., Beechey, C.V., Peters, J., Williamson, C.M. 2000. An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 3342–3346.

Xiong Z, Laird PW. 1997. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 25(12):2532-4.