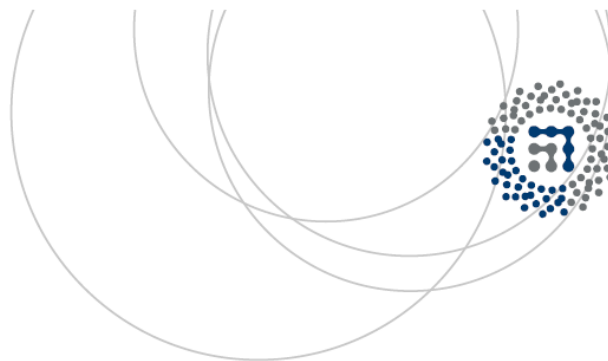




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



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



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado

Biologiako Gradua / Grado en Biología

ADINAK OZITOETAN ERAGINDAKO GENE ADIERAZPEN ALDAKETA

Egilea/Autor:

Puy Ancin

Zuzendaria/Director/a:

Asier Fullaondo

© 2015, se puede proteger poniendo "nombre y apellidos/izen abizenak" ezarriz babez zaitezke edo Lizentzia CC batekin babestu/o con una Licencia CC:

<http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

AURKIBIDEA

1. Laburpena.....	3
2. Sarrera.....	4
3. Metodoak	
3.1. Laginen prestaketa.....	6
3.2. Datuen lanketa.....	6
3.3. Analisi estatistikoak.....	6
4. Emaitzak eta eztabaida	
4.1. PCA (Principal Component Analysis).....	8
4.2. SAM analisi estatistikoaren abantailak.....	8
4.3. Oozito gazte eta zaharren gene adierazpen konparaketa.....	10
4.4. I eta II meiosiko gene adierazpen konparaketa	10
4.5. Adierazpen aldaketa jasan duten geneen funtzio biologikoa: adina.....	11
4.6. Adierazpen aldaketa jasan duten geneen funtzio biologikoa: I eta II meiosia.....	12
4.7. Gene espezifikoaren azterketa.....	13
4.8. Pan et al., 2008 lortutako emaitzen konparaketa.....	15
4.9. Etorkizunera begira.....	15
5. Bibliografia.....	17

LABURPENA

Ikusi da herrialde garatuetan gizakiek umeak gero eta beranduago izaten dituztela, azken urteetan umeak izateko arazoak dituzten bikoteen kopurua asko handitu da. 30-40 urtetako emakumeek oozito akastun gehiago ekoizten dituzte, uste da gene adierazpen aldaketak akats horiek nola eman diren azaldu dezakeela. Horregatik, sagu gazte eta zaharrei oozitoak erauziko zaizkie eta mikroarray bidez geneen adierazpena aztertuko da. Adinak eta meiosi fase desberdinek duten gene adierazpen aldakortasuna konparatzean ikusi da meiosi fase desberdinen artean aldakortasun handiagoa dagoela. Adinarekin erlazionatuak dauden geneek elektroizazio katean, ziklo zelularra eta garraio zelularrean parte hartzen dute. Meiosi fase desberdinetan adierazpen maila desberdina duten geneek gene adierazpenean, prozesu metabolikoetan, ziklo zelularretan eta erregulazio zelularretan parte hartzen dute.

SARRERA

Gaur egun, herrialde garatuetan bikoteek umeak gero eta beranduago eta gutxiago izaten dituzte. Emakumeek haurdun gelditu aurretik ikasi, lanpostu finkoa eskuratu eta etxebizitza eduki nahi dute, nahiko zaila da lortzea, honek haurdun oso berandu gelditzea ekartzen du. Umeak edukitzeko adin biologiko egokia 20-30 urtekoa da, baina gaur egun 30-40 urterekin edukitzen dituzte. Emakumeek lehenengo umea 31 urterekin izaten dute eta gizonek 34 urterekin (bataz bestekoa), eta azken urteetan gizonetan gehiago handitu da emakumeetan baino. Obulutegiak adin hauetan zaharkituak daude eta bakarrik jaiotzean zituzten oozitoen %10a dute. Emakumeen kasuan, beranduago haurdun gelditzeak hainbat arazo ekartzen ditu: abortu natural gehiago, ume goiztiar gehiago jaiotzeak, garun-paralisia, pisu gutxiko umeak jaiotzeak, ... Esan beharra dago gizonak gero eta helduago izan esperma kalitatea gero eta txarragoa dela, honek umeak gaixotasun batzuk izateko probabilitatea handitzen du. Ikusi da adinak ernalkortasunean eragina duela. Gizakietan egindako hainbat ikerketen arabera oozitoak eta espermatozoideak dira antzutasunaren eragileak. Antzutasunaren emendioa 35 urtetik aurrera behatu da (Hassold and chiu, 1985; Hassold and Hunt, 2001). Adinak oozitoetan sortutako aldaketak abortoa eragin dezake, eta enbrioaren garapena aurrera joatekotan garapenean akatsak sortu ditzake.

Adibide moduan, 20 urteko emakumeen oozitoetan aneuploidia intzidentzia %2koa den bitartean 40 urteko emakumeetan %35ekoa da. Aneuploidia I meiosian sortutako akatsen bidez ematen da (Laamb et al., 2005; Pellestor et al., 2002). Izan ere, adinak I meiosian ardatz mitotikoan eta kromosomen banaketan akatsak sortzen dituela ikusi da (Battaglia et al., 1996). Zatiketa zelularrean oso garrantzitsua da kromosomak banatu baino lehen mikrotubuluaren eta kromosomen arteko lotura ematea (Musacchio and Hardwick, 2002). Anafasea hasi egiten bada lotura hauek eman aurretik kromosomak ez dira modu asimetriko batean banatuko, zelula aneuploidikoak sortuz (Musacchio and Salmon, 2007). Meiosiaren kontrol puntuak (SAC) mikrotubuluaren eta kromosomen lotura kontrolatzen du, aneuploidia SAC egonkortasunaren galerarekin erlazionatuta dagoela uste da. Behatu da oozito zaharrak gazteak baino lehenago sartzen direla meiosi leian eta honek ekartzen duela SAC egonkortasuna galtzea (Eichenlaub-Ritter and Boll, 1989).

Ikerketa honetan sagua modelo gisa erabiliko da, ugaztuna da eta haurdunaldi bakoitzean 10-20 kume izaten dituztenez, oozito ekoizpena oso handia dute, honek oozitoak ikertzea errazagoa bilakatzen du. Ikerketa honetan sagu gazteak (6-12 aste) eta zaharrak (66 aste) erabili dira, oozitoak erauzi eta mikroarrayaren bidez geneen adierazpena aztertuko da.

Mikroarraya 90 hamarkadaren bukaeran erabiltzen hasi zen, sekuentzia ezaguna duten milaka zundez osatutako matrizea da eta lagin bateko DNA determinatzeko eta kuantifikatzeko erabiltzen da. Mikroarrayaren bidez esperimentu bakar baten bitartez organismo baten milaka geneen adierazpen azterketa egin daiteke. Lagina matrizean jarri egiten da eta osagarriak diren sekuentziak hibridatu

egiten dira. Zundak oligonukleotidoak, cDNA edo PCR produktuak izan daitezke. Azido nukleikoak metodo desberdinen bitartez markatu egiten dira: fluoreszentzia, entzimakoak, ... Hibridazioan lagineko material genetiko markatua txipean dauden zundekin hibridatu egiten dira. Ondoren, mikroarray garbiketa bat egiten da, eta eskaner optiko baten bitartez argi intentsitatea neurtu egiten da, intentsitatea eta adierazpen maila erlazionatuak daude. Mikroarraya kolore bakarra (txuri-beltza) edo 2 kolorekoa (gorria eta berdea) izan daiteke. 2 koloretako mikroarrayetan aldi berean bi baldintza desberdinetako laginen gene adierazpena aztertu daiteke, kolore bakarrekoan berriz, baldintza bakarra. Hainbat aplikazio ditu: geneen adierazpenaren analisia, mutazio eta polimorfismo detekzioa, sekuentziakzioa,...

Mikroarrayak aztertzeo analisi estatistiko desberdinak daude, SAM (Significance Analysis of Microarrays) mikroarray aztertzeo analisi estatistiko berria da eta gene adierazpen desberdina duten bi laginen arteko konparaketa egiteko erabiltzen da. SAM analisia erabilgarria da kokapen desberdina duten laginen edo tratamendu desberdinak jaso duten laginen azterketarako. FDR (False Discovery Rate) da SAMek duen ezaugarri garrantzitsua, nahiz eta geneak esangarriak ez izan esangarriak direla agertu deneko proportzioa da eta delta parametroarekin erlazionatuta dago. Delta parametroaren bidez geneen adierazpen banaketa ikusi ondoren esangarri eta ez-esangarri arteko muga doitu daiteke.

Ikerketa honetan ArrayExpressetik datuak hartu egingo dira, ikerketarekin hasi aurretik funtsezkoa da jakitea datuen lorpena nolakoa izan den. Lehendabizi, geneen adierazpen aztertzeo 6-8 eta 12-16 asteko saguak (*Mus musculus*) hartu eta besikula germinal faseko (I meiosis) eta II meiosis 25 oozito erauzi zaizkie. Guztira meiosi fasea eta adina kontuan hartuta 4 talde desberdin egin dira, taldeak hurrengoak dira: oozito gazte I meiosis, oozito gazte II meiosis, oozito zahar I meiosis eta oozito zahar II meiosis. Talde bakoitzetik 4 erreplika egin dira eta 25 oozitoetatik lortutako cRNA nahastetik lortu dira, lagin teknikoak dira. 25 oozitoei RNA erauzi, anplifikatu eta biotinatutako cRNA lortu egin da, 25 oozitotik lortutako cRNA MOE430 v2 GeneChips-an hibridatu egin da. MOE430 v2 GeneChip-ak 45101 transkriptok osatzen dute (Pan et al., 2008).

Helburua

Ikusi da emakumeak gero eta helduagoak izan ekoizten dituzten oozito akasdun kopurua handiagoa dela, uste da gene adierazpen aldaketek oozitoetan hainbat funtzioen aldaketak eragiten dituztela eta funtzio aldaketek oozitoak akasdunak izatea eragiten dutela. Horregatik, mikroarray bidez sagu gazte eta zaharren oozitoen gene adierazpena aztertuko da.

Ikerketa honetan mikroarraya aztertzeo 2008. urtean Pan et al. erabili ez zuten analisi estatistiko berriago bat erabiliko da, SAM. Bestetik, aztertuko da zeintzuk gene daude adinarekin erlazionatuta eta gene hauek parte hartzen duten funtzioak. Amaitzeko, I eta II meiosi artean desberdin adierazten diren geneak aztertuko dira eta hauek dituzten funtzioak.

METODOAK

3.1. Laginen prestaketa.

Lortutako datuak Array Express datu biltegira igo dituzte, horrela beste ikertzaile batzuk hauekin lan egin dezakete. ArrayExpress (Kolesnikov et al., 2015) ikerketa bultzatzeko datuak dituen aldizkari zientifiko nagusiek gomendatzen duten biltegia da. Ikerketak zuzenean ArrayExpressean aurkezten dira edo NCBI base datutik eskuratu daitezke. Hainbat entsegu eta esperimientuen datuak biltzen ditu, kopurua aldakorra da une oro ikerketa desberdinetako datuak sartzen baitira. Datu baseen bilaketa zuzenean edo iragazki baten bitartez egin daiteke, kasu honetan organismoa, esperimientua, molekula mota eta teknologia hautatzeko aukera ematen du. Esperimientua hautatzean ikerketako datuak deskargatu daitezke.

3.2. Datuen lanketa

Lehendabizi, oozitoetan gene adierazpen aldaketa dagoen aztertzeke datuak Array Express biltegitik hartu egingo dira. Deskargatutako datuetan 45101 geneen adierazpen maila ageri da. 4 talde desberdin daude eta talde bakoitzean 4 erreplika egin dira, horregatik guztira 16 erreplika daude. 16 errepliketan zunda bakoitzari dagozkion p (probabilitatea) eta V (adierazpen mailarekin erlazionatutako balioa) balioa ageri da. Gainera, 16 errepliketan P, M edo A letrak azaltzen dira, hauen esanahia hurrengoa da: P: “present”, M: “medium” eta A: “ausent”, adierazpen maila adierazten dute. Zunda bakoitza kode batekin adierazita dago gene batekin erlazionatuta dagoena. Bigarrenez, ausente guztiei balio berdina emango zaie, izan ere zundak nahiz eta ez adierazi v balioa bat dute eta ez da 0, adierazpenak ez egotea 0 baino handiagoa den balio absolutu bat dauka. Balioa ausente guztien batz bestekoarekin lortuko da: 22,80. Gainera, adierazi direnen artean konparaketa egiteko v balio berria emango zaie, balioa jatorrizko v balioa zati ausenteen batz besteko balioa eginez lortuko da. Aipatu beharra dago adierazi ez diren zundak (“ausent”) balio oso aldakorak dituztela eta balio batzuk oso altuak direla, kasu batzuetan adierazi direnak (“present”) baino altuagoak. Hirugarrenez, adierazpen aldaketa jasan duten geneak aztertu nahi direnez adierazi ez diren zundak (“ausent”) ezabatu egingo dira, 23269 zundekin geratuz.

3.3. Analisi estatistikoak

Datuen lanketa egin ondoren, MultiExperiment Viewer programan datuak erabili egingo dira. Hasteko, 4 talde desberdinekin duten antzekotasuna aztertzeke Principal Component Analisia (PCA) egingo da. PCAk prozesu matematiko baten bitartez korrelazionatuta dauden aldagaiak korrelazionatuta ez dauden aldagaietan bilakatzen ditu. Datuak koordenada batzuetan antolatzen dira. Lehenengo

ardatzean bariantza handiena duten datuak jarri egiten dira, bigarren ardatzean bariantza txikiagoa dutenak eta horrela datu guztiak irudikatu arte. Honen bitartez datuen aldakortasun kausa zein den aztertzen da.

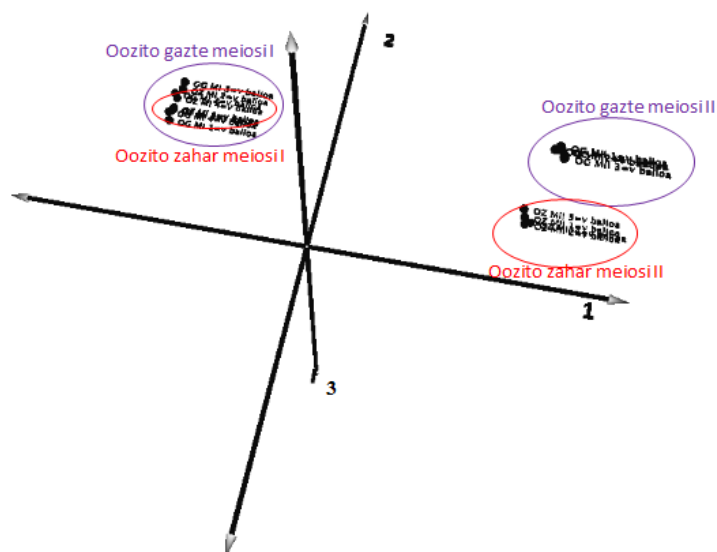
Ikerketa honetan 2008. urtean Pan et al. argitaratu zuten artikuluan erabili ez duten analisi estatistikoak erabiliko dira (t-testa eta SAM), datu berdinarik landu egingo dira, baina analisi estadistiko desberdina erabiliz, izan ere jadanik dauden datuek ikerketa egiteko aukera ematen digute, laborategiko lana saihestuz. Ikerketa batzuetan lortutako datuak Array Expressera igo egiten dira eta honi esker metodo desberdinen bitartez datu berdinarik ikertu daitezke.

Hala ere, mikroarraya aztertzeko bi analisi estatistiko erabili daitezkeela pentsatu da, baina geneen adierazpen aldaketa aztertu baino lehen bi analisi estatistikoetatik abantailatsuenak zein den aukeratu behar da. Horretarako, t-testa eta SAM bidez talde berdinarik konparatuko dira. Konparatuko diren taldeak oozito gazte I meiosis eta oozito zahar I meiosis izango dira, talde bakoitzeko 4 erreplika konparatuko dira. A taldean oozito gazte I meiosisiko 4 erreplikak eta B taldean oozito zahar I meiosisiko 4 erreplika jarriko dira. t-testan p balioa $\leq 0,01$ aplikatuko da eta ez da zuzenketarik aplikatuko. SAMen kasuan, permutazio posible guztiak eta delta balioa 4,33 (FDR=4.97) aplikatuko da. Bi analisi estatistiko bidez gene esangarri berdinarik lortzen dituzten jakiteko Jvenny programa bidez (Bardou et al., 2014) adierazpen aldaketa duten gene esangarriak konparatuko dira. Emaitzen arabera erabakiko da ikerketa honetan zein analisi estatistiko den abantailatsuenak.

4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

4.1. PCA (Principal Component Analisis)

Oozito lau talde ditugu adina eta meiosi faseak kontuan hartuta, lagin bat lekuz kanpo dagoen eta taldeen arteko antzekotasuna aztertzeko Principal Component Analisisa (PCA) egin da. 4 taldeak kontuan hartuz lehenengo eta bigarren ardatzek meiosi faseak banatu egiten dituzte, bigarren ardatzaren alde batean oozito gazte eta oozito zahar I meiosia eta beste aldean oozito gazte II meiosia eta oozito zahar II meiosi taldeak utziz. Hirugarren ardatzak oozito gazte II meiosia eta oozito zahar II meiosia taldeak banantzen ditu, aldiz I meiosiko taldeak oso gertu daudela ikusi daiteke (1.Irud.). Ondorioz, I eta II meiosi artean dagoen gene adierazpen aldaketa adinarekin erlazionatuta baino handiagoa da eta adinak gene adierazpen aldaketan II meiosian I meiosian baino eragin handiagoa dauka. Behatu da fetu garaian oozitoak I meiosi profasean gelditu egiten direla eta obulazioa eman arte ez dutela lehenengo zatiketa meiotikoa amaitzen. Beraz, oozito zaharrak oozito gazteak baino denbora gehiago egongo dira I meiosi profasean geldituta, honek eragingo du I meiosian akats gehiago egotea, II meiosiko geneen adierazpen aldaketa ekarriz (Volarcik et al., 1998).



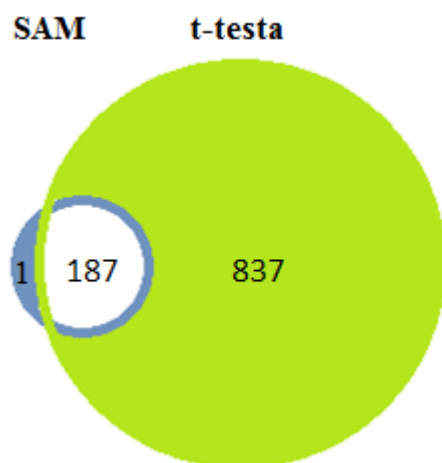
1. Irudia. PCA analisisa (Principal Components Analisis).

4.2. SAM estatistikoaren abantailak.

Ikerketa honetan 2008. urtean Pan et al. idatzitako artikuluan erabili ez duten beste analisi estatistikoak erabiliko dira datu berdinak aztertzeko, horietako bat, SAM analisi estatistiko berria da. Konparaketa

berdinak egingo dira t-testa eta SAM bidez. t-testan oozito gazte I meiosia eta oozito zahar I meiosian egindako konparaketan ($p=0,01$ eta zuzenketarik ez) geneen adierazpen mailari dagokionez 1024 gene esangarri eta SAM bidez egindako oozito gazte I meiosia eta oozito zahar I meiosia konparaketan (FDR=4,97) 188 gene esangarri lortu dira, delta parametroa aldatuz nahi dituzun gene kopurua aukeratu daitezkeela kontuan izan behar da. t-testan p balioa $\leq 0,01$ denez eta Bonferroni zuzenketarik ez duenez onartu adierazpen aldaketa jasan duten gene esangarri kopurua oso altua lortu da, gainera horietatik zenbat diren faltsuak ezin da jakin. Bestetik, SAM askoz ere zorrotzagoa dela ikusi da, bakarrik adierazpen aldaketa jasan duten 188 gene esangarri lortu dira, gainera FDR= 4,97 denez badakigu 188 gene esangarritik 4,97 faltsuak direla. SAM eta t-testa bidez adierazpen aldaketa jasan duten gene esangarriak konparatzean ikusi da SAM bidez lortutako adierazpen aldaketa jasan duten geneak ere t-testan bidez lortu direla (bat izan ezik)(2.irud.).

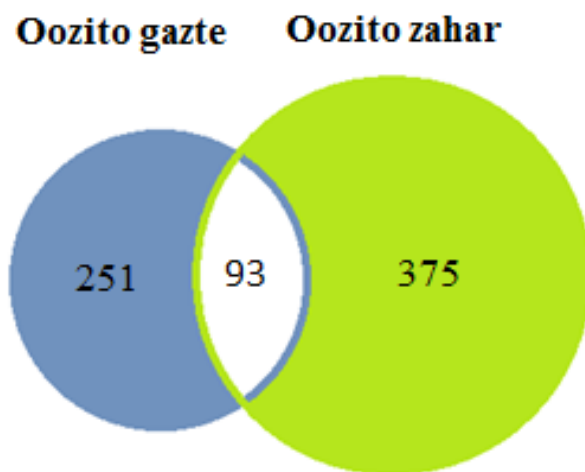
Ikerketa honetan SAMek t-testa baino abantaila gehiago ditu.. Bi lagin konparatzean geneen adierazpen banaketa ikusi daiteke eta delta parametroaren bidez gene esangarrien doiketa egingo da, horrela nahi den gene kopurua lortuko da. Gainera, FDR zein den jakin daiteke, hau da, esangarri bezala agertu eta ez diren gene kopurua. t-testaren bidez gene esangarrien doiketa oso zaila da, Bonferroni zuzenketa eta p-balioa aplikatuz egin daiteke, baina gerta daiteke oso balio altuak edo baxuak lortzea eta lana zaila bilakatzea. Gainera, t-testak ez du azaltzen gene esangarrietatik zenbat diren faltsuak .



2.irud. SAM (FDR=4,97) eta t-test (P=0,01 eta zuzenketarik ez) bidez lortutako adierazpen aldaketa jasan duten gene esangarrien konparaketa.

4.3. Oozito gazte eta zaharren gene adierazpen konparaketa

Behin analisi estatistiko abantailotsuena zein den finkatuta dagoela, jakin nahi izan dugu adinak oozitoen gene adierazpen aldaketan eragina duen. Horretarako, 4 talde daudenez meiosis eta adina kontuan hartuta, bi konparaketa egitea pentsatu dugu. Alde batetik, oozito gazte I meiosi eta II meiosi taldeak konparatzea eta bestetik oozito zahar I meiosis eta II meiosis konparatzea. Lehenengo konparaketan A taldean oozito gazte I meiosisiko 4 erreplika eta B taldean oozito gazte II meiosisiko 4 erreplika ipiniko dira, delta parametroa 34,73 (FDR=0) delarik. Bigarren konparaketan A taldean oozito zahar I meiosisiko 4 erreplika eta B taldean oozito zahar II meiosis 4 erreplika kokatuko dira, delta parametroa 34,75 (FDR=0) delarik. Lehenengo konparaketan oozito gazteetan I eta II meiosi artean adierazpen aldaketa erakusten duten 344 gene esangarri lortu dira, bigarren konparaketan oozito zahar I eta II meiosi artean 468 gene esangarri. Bi konparaketetan FDR 0 denez aipatutako gene kopuruak adierazpen aldaketak jasan dituzte, ez daude gene faltsurik. Oozito gazte eta zaharren gene esangarriak konparatuko dira adinak zein gene adierazpenean eragina duen jakiteko. Komunean 93 gene dituzte eta adinak gainerako guztien adierazpen aldaketak eragiten du, oozito gazteetan 251 genek adierazpen aldaketa dute eta oozito zaharretan 375 genek (3.Irud.).



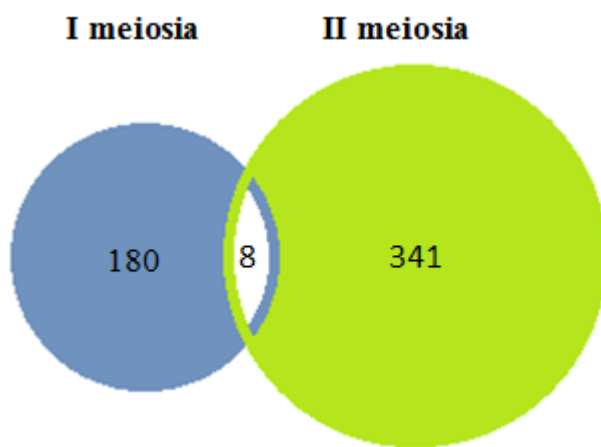
3. Irud. SAM bidez Oozito gazte (FDR=0) eta zaharretan (FDR=0) lortutako adierazpen aldaketa jasan duten gene esangarrien konparaketa.

4.4. I eta II meiosisiko gene adierazpen konparaketa.

Jakinda adinak oozitoen geneetan adierazpen aldaketa eragiten duela, jakin nahi dugu meiosi fase desberdinetan zeintzuk gene daukaten adierazpen aldaketa. Horretarako, SAM analisi estatistikoaren bidez bi konparaketa egingo dira, izan ere 4 talde aztertzen dira ikerketa honetan. Alde batetik, oozito gazte eta oozito zahar I meiosis konparatuko dira eta beste aldetik oozito gazte eta oozito zahar II

meiosia. Lehenengo konparaketan, A taldean oozito gazte I meiosisiko 4 erreplika eta B taldean oozito zahar I meiosisiko 4 erreplika ipiniko dira, 4,33 delta parametroa aplikatuko da (FDR=4,97). Bigarren konparaketan A taldean oozito gazte II meiosisiko 4 erreplika eta B taldean oozito zahar II meiosisiko 4 erreplika jarriko dira, 7,96 delta parametroa aplikatuko da (FDR=2,36). Lehenengo konparaketan oozito gazte eta oozito zahar I meiosian adierazpen aldaketa jasan duten 188 gene esangarri lortu dira, kontuan hartu behar da FDR 4,97 denez, 188 gene esangarrietatik 4,97 faltsuak direla. Bigarren konparaketan adierazpen aldaketa jasan duten 349 gene esangarri lortu dira, kasu honetan FDR txikiagoa da: 2,36. Gainera II meiosian askoz ere gene esangarri gehiago lortu dira, nahiz eta delta parametroa berdina aplikatu den. Meiosi fase bietan adierazpen aldaketa duten gene esangarriak haien artean konparatuko dira Jvenny programaren bitartez. 8 gene esangarri bakarrik komunean dituzte, honek adierazten du meiosi faseen arteko aldakortasuna adinak eragiten duena baino handiagoa dela (4.Irud.).

I eta II meiosiek adierazpen aldaketa jasan duten gene esangarrietatik oso gutxi komunean dituzte (%1,51), oozito gazte eta zaharrek komunean gene gehiago dituzte (%12,93), honek erakusten du gene adierazpen aldakortasuna handiagoa dela meiosi fase artean adinak eragiten duena baino.



4.Irud. SAM bidez I (FDR=4,97) eta II (FDR=2,36) meiosian adierazpen aldaketa jasan duten gene esangarrien konparaketa.

4.5 Adierazpen aldaketa jasan duten geneen funtzio biologikoa: adina

Behin jakinda adinarekin adierazpen aldaketa erakusten duten geneak zeintzuk diren, zein funtzio biologikoetan parte hartzen duten jakin nahi da. Horretarako, lehendabizi oozito gazteetan adierazpen aldaketa duten 251 geneen funtzioak aztertuko dira. Parte hartzen duten funtzioak zeintzuk diren

jakiteko DAVID nih (Huang et al., 2009) erabiliko da. Erabilitako DAVID nih seigarren bertsioa da. Gene zerrenda bat funtzio biologikoetan bihurtzeko tresneria dauka eta horrela ikertzaileei gene horiek duten esanahia ulertzen laguntzen die. DAVID nih gene zerrendari buruz hurrengo informazioa ematen du: funtzio biologiko batean erlazionatuak dauden geneak, geneen izenak, gene eta gaixotasunen arteko erlazioa, ... Hala ere, kontuan izan behar da gene guztiak ez dituela sailkatzen. Lehenik eta behin DAVID nih programan 251 gene zerrenda (zunden kodeen bidez adierazita dagoena) itsatsi behar da. Espeziea aukeratu behar da, kasu honetan *Mus musculus* izango da espezie eta mikroarraya MOE430. Gene Ontologiko 3 funtzioak aztertuko dira, 251 gene 15 funtzioetan sailkatuak daude. Ondoren, oozito zaharretan adierazpen aldaketa duten 375 geneen funtzioak aztertuko dira, 375 gene zerrenda itsatsi egin behar dira eta Gene Ontologiko 3 funtzioak aztertuko dira, guztira 26 funtzioetan sailkatuta daude.

Oozito gazteko eta oozito zaharretan adierazpen aldaketa duten 251 eta 375 geneak parte hartzen duten 15 eta 26 funtzioetan sailkatuak daudelarik, jakin nahi dugu gene horiek funtzio berdinetan edo desberdinetan parte hartzen duten. Horretarako, Jvenny programaren bidez funtzioak konparatuko dira. Komunean 10 funtzio dituztela ikusi da, 5 funtzio oozito gazteekin erlazionatuak daude eta oozito zaharrekin berriz 16 funtzio (5.A. Irud.). Oozito gazteetan erlazionatuak dauden geneak parte hartzen duten 5 funtzioak prozesu metaboliko zelularrak eta antolamendu zelularrean taldekatuak daude (1. Taula osagarria). Batez ere, aipatu beharra dago kromosoma antolaketan parte hartzen dutela, p balioa 0,05 baino handiagoa duten funtzioak ere kontuan hartu dira haien diferentzia oso txikia dela kontsideratu denean. Aurretik aipatu diren oozito zaharretako 16 funtzioak hurrengo taldetan sailkatu daitezke: elektroiz garraio katea, kokapen zelularra, prozesu katabolikoak, erantzun zelularra eta garraio zelularra (2.Taula osagarria). P balioa 0,05 baino handiagoa duten funtzioak kontuan izan dira p balio desberdintasun oso txikia den kasuetan.

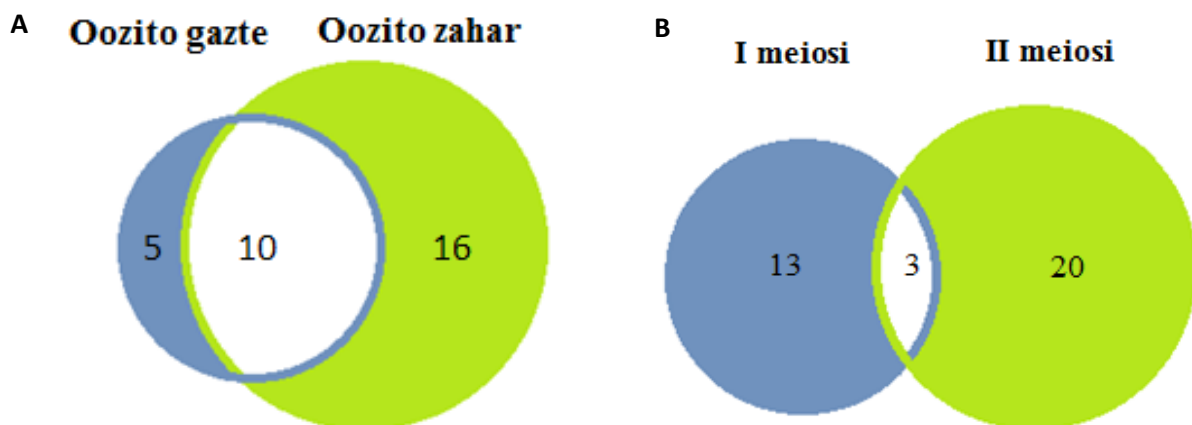
4.6. Adierazpen aldaketa jasan duten geneen funtzio biologikoa: I eta II meiosis

Behin jakinda I eta II meiosian adierazpen aldaketa 180 eta 341 genek dutela, jakin nahi da zein funtzioetan parte hartzen duten. Horretarako, alde batetik 180 gene zerrenda DAVID nih programan itsatsi egingo dira, programan espezie eta mikroarraya jartzea eskatzen du, ikerketa honetan espeziea *Mus musculus* eta mikroarraya MOE430 da. Gene Ontologiko 3 funtzioak aztertuko dira, 180 geneak 16 funtzio biologikotan parte hartzen dute. Bestetik, 341 gene zerrenda DAVID nih programan itsatsiko dira (espezie: *Mus musculus* eta mikroarraya: MOE430), Gene Ontologiko 3ko 23 funtzio biologikoetan parte hartzen dutela ikusi da.

I eta II meiosian adierazpen aldaketa duten geneek parte hartzen duten funtzioak ikusita jakin nahi da ea funtzio berdinak edo desberdinak diren, horretarako funtzioak Jvenny programaren bidez

konparatuko dira. Ikusi da I meiosian 13 funtzio eta II meiosian 20 funtzio daudela, komunean bakarrik 3 funtzio dituzte (5. B.Irud). I meiosiko 13 funtzioak hurrengo taldetan sailkatzen dira: prozesu metabolikoak, zelula mailan emandako gene adierazpenean, prozesu biosintetiko zelularrak, erregulazio zelularra eta antolaketa zelularra (kromosoma antolaketa) (3.Taula osagarria). II Meiosiko geneak 20 funtzioetan parte hartzen dute: hurrengo taldetan sailkatzen dira: kokapen zelularra, garraio zelularra, prozesu katabolikoak, prozesu metabolikoak, ziklo zelularra eta erregulazio zelularra (4.Taula osagarria).

Adina eta meiosi fase desberdinen bidez adierazpen aldaketa duten gene esangarriak parte hartzen duten funtzioak konparatzean ikusi da oozito gazte eta zaharrek komunean funtzio gehiago dituztela I eta II meiosiak baino. Gainera, adinak eragindako adierazpen aldaketa jasan duten gene esangarriek elektroi garraio katean, garraio zelular eta ziklo zelularrekin parte hartzen dute eta meiosi fase desberdinetan adierazpen aldaketa erakusten duten gene esangarriek ziklo zelularrean, zelula mailan emandako gene adierazpenean, zelulako prozesu metabolikoetan eta erregulazioan.



5.Irud. A) Oozito gazte eta zaharren gene esangarrien funtzioen konparaketa. B) Meiosi I eta meiosi II gene esangarrien funtzioen konparaketa.

4.7. Gene espezifikoen azterketa.

Jarraian funtzioetatik abiatuz adierazpen aldaketa jaso duten geneak lortu egingo dira. Horretarako, oozito zaharretan adierazpen aldaketa jasan duten gene batzuk aukeratu eta aztertuko dira, hauek lehen aipatutako oozito zaharren 16 funtzioetan bilduak daude (2.taula osagarria). Ikusi da ATRX adierazpen aldaketa jasan duela. ATRX X kromosomean kokatuta dagoen Helikasa/ATPasa SNF2 familiakoa da eta 280KDa proteina kodetzen du (Picketts et al., 1998). Gizaki eta sagu zeluletan

ATRX II meiosian heterokromatina zentromerikoarekin lotzen da, eta II meiosi metafasean kromosomen lerrokaketa eta antolaketa burutzen ditu (McDowell et al., 1999). Kromosoma eta ATRX arteko lotura emateko beharrezkoa da histonen deazetilazioa egitea, kromosoma banaketan sortutako aldaketek aneuploidia ekar dezakete. Izan ere, zatiketa zelularrean kromosomen banaketa oso garrantzitsua da bi zelula alabetan kromosoma kopuru berdina izateko, kromosomak eta mikrotubuluen lotura ez ematea kromosoma kopuru berdina zelula alabetan ez egotea eragingo du, honek aneuploidia ekarriz.

Ziklinek ziklo zelularrean paper oso garrantzitsua dute, kinasa konplexuek ziklo zelularrean parte hartzen dute, konplexua ziklina eta ziklina menpeko den kinasa (cdk) batez osatuta dago, Ziklinek kinasak aktibatzen dituzte eta hauek ziklo zelularrean faseen arteko trantsizioa erregulatzen dute. Ziklo zelularrean kontrola ziklinen sintesi eta suntsipenean dago (Hunt, 1991). Hainbat ziklina mota daude, B ziklinan adierazpen aldaketa ikusi da. B ziklinak G2-mitosia arteko trantsizioa kontrolatzen dute (Murray and Marks, 2001). B3 ziklina leptoteno eta zigoteno faseetan ugaria da eta pakitenoaren ondoren kopuruan murriztu egiten da (Roeder, 1997).

Adinak gene adierazpenean eragina duen jakiteko egindako bi konparaketan (I eta II meiosian) ikusi da geneen %1,62a adierazpen aldaketa jasan duela. Oozito gazteetako gene esangarriak kromosoma antolaketarekin erlazionatuta dauden bitartean, oozito zaharretan geneak elektroik garraio katearekin, garraio zelularrekin eta ziklo zelularrekin erlazionatuak daude. Adinak eragiten duen gene adierazpen aldaketa hurrengo ekarriko du:

- Elektroik garraio katean geneen adierazpen aldaketak mitokondrioaren elektroik garraio katean hutsuneak egotea eragingo du, honen bidez protoiak ihes egingo dute ATP gutxiago lortuz eta oxigeno erradikal askeak(ROS) sortuz. ROS agerpenak DNAn kaltea eragin dezake, eta DNA konpontzeko eta estres erantzunean geneen adierazpen aldaketa bat dagoenez oozitoak ezingo du kalte hori konpondu eta zitoeskeletoan aldaketak eragingo ditu, aneuploidia ekarriz (Rokutan et al., 1994).
- Ziklo zelularra kontrolatzen duten geneetan adierazpen aldaketa behatu da, oozito zaharretan ardatz mitotikoa eratzen duten mikrotubuluen sistemak egonkortasuna galtzen du, honek garraioan eragingo du (Biggins et al., 1999; Cheeseman et al., 2002; DeLuca et al., 2006). Ondorioz, kromosomak gaizki kokatzen dira eta anafasean kinetokoroak kromosomekin lotu baino lehen banandu egiten dira, azkenean aneuploidia ekarriz (Hsu et al., 2001; Hsu and White, 1998).

4.8. 2008.urtean Pan et al. lortutako emaitzen konparaketa.

2008.urtean Pan et al. idatzitako artikuluan burututako prozedura esperimentalean 4 talde desberdin osatzeko orduan meiosi fase eta adina kontuan hartu zuten, baina erreplika bakoitza 25 oozitoetatik lortutako cRNA nahasketaz osatu zuten, hau da, lagin teknikoak erabili zituzten. Oozito batek muturreko balioa izatekotan nahasketaren batz bestekoa asko aldatuko du. Gene adierazpena aztertu aurretik erreplikaren arteko antzekotasuna aztertu beharko litzateke eta muturreko balio bat egon ezkerorreplika horren cRNA deuseztatu beharko zen.

2008. urtean Pan et al. argitaratutako artikuluan “ Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs” lortu dituzten emaitzak eta guk lortutakoen artean desberdintasunak daudela ikusi da.

- Baldintza bakoitzean lau errepliketatik hirutan adierazi diren zundak (“present”) analizatu dituzte datuen maneia errazagoa izateko, hau da, 17225 zunda. Guk 16 errepliketan adierazi ez diren zundak (“ausenteak”) ezabatu eta gainerakoak aztertu ditugu, guztira 23269 zunda.
- Oozito gazte eta oozito zahar II meiosi artean egin duten gene adierazpen konparaketan geneen %5ek adierazpen aldaketa jasan dutela ikusi da . Guk egindako konparaketan geneen %1,62k adierazpen aldaketa jasan duela ikusi da. Desberdintasun hau konparaketa desberdinak egin direlako eman da, guk oozito gazte eta zahar (I eta II meiosis) konparatu ditugu, eta haiek oozito gazte eta zahar II meiosis konparatu dituzte. Haiek lortutako adierazpen aldaketa jasan duten geneek (% 5) ziklo zelularrean parte hartzen dute. Gure kasuan oozito gazteetako gene esangarriak kromosoma antolaketarekin erlazionatuta dauden bitartean, oozito zaharretan geneak elektroio garraio katearekin, garraio zelularrekin eta ziklo zelularrekin erlazionatuak daude.
- Pan et al. artikuluan adierazpen aldaketa jasan duten geneetatik batzuk aztertu dira: ATRX, BRCA1, CENPE, SMC2, AURKB eta KIF2C. Guri bakarrik ATRX ageri zaigu, konparaketa desberdina egitearen ondorioa da, oozito gazte eta oozito zahar II meiosi konparatu dituzte, guk ordea oozito gazte eta zahar bi meiosi faseak konparatu ditugu (I eta II meiosis). Gainera, SAM analisia duen delta parametroaren bidez gene kopurua doitu daiteke eta artikuluan baino gene gutxiago lortu dira.

4.9. Etorkizunari begira

Adinarekin oozitoetan ematen den gene adierazpen aldaketak zatiketa zelularrean aldaketak eragiten ditu. Gene hauek duten funtzioa jakinik aurreran daiteke oozitoetan ekarriko dituzten akatsak, baina

ikertu gabe dago oraindik. Horregatik, etorkizunean gene hauetan adierazpen aldaketa eragingo duena ikertu beharko da egiaztatzeko planteatutako hipotesiak betetzen direla.

Bestetik, ikusi da ooziotetan adinak adierazpen aldaketa eragiten duela eta antzutasunarekin erlazionatuta dagoela, baina aztertu beharko litzateke antzutasuna eragiten duena obulutegia edo oozitoak diren.

Ikerketa honen bidez saguen oozitoetan adinarekin ematen diren adierazpen aldaketak aztertu dira. Ikusi da hainbat geneen adierazpena aldatu egiten dela, eta gene horien funtzioaren arabera aurrean daiteke etorkizuneko enbrioiak zein arazo edukiko duen garapenean. Ikerketa honen bidez saguetan gertatzen dena aztertu da, ondoren gizakietan zer gertatu daitekeen ondorioztatzeko, sagua eta gizakia ugaztunak dira, klase berdinean eta orden desberdinean sailkatuak daude. Sagua Rodentia ordenean sailkatuta dagoen bitartean gizakia Primates ordenean sailkatuta dago. Saguan gertatzen den berdina gizakian gertatzen dela ziurtatzeko Primates ordeneko espezieren bat ikertu daiteke, eta ondorio berdinetara iristen bada gizakietan ere berdina gertatzen dela ondorioztatuko da. Beste irtenbide bat da gizakiaren oozitoen azterketa. Ernalketa invitro egiten duten zentroetan ikerketarako oozitoak eskatu daitezke, batzuetan oozito guztiak ez dira erabiltzen, egoera horretan dauden bikoteak deuseztatu edo ikerketarako dohaintza egin dezakete. Oozito hauek erabiliz emakume gazte eta helduen oozitoetako gene adierazpena aztertu daiteke.

5. BIBLIOGRAFIA:

- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum. Reprod*;11:2217–2222.
- Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C and Klopp C (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, 15:293
- Biggins S, Severin FF, Bhalla N, Sassoon I, Hyman AA, Murray AW. (1999) The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev*;13:532–544.
- Cheeseman IM, Anderson S, Jwa M, Green EM, Kang J, Yates JR 3rd, Chan CS, Drubin DG, Barnes G. (2002) Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell*; 111:163–172.
- DeLuca JG, Gall WE, Ciferri C, Cimini D, Musacchio A, Salmon ED (2006) Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell*;127:969–982.
- Eichenlaub-Ritter U, Boll I (1989) Nocodazole sensitivity, age-related aneuploidy, and alterations in the cell cycle during maturation of mouse oocytes. *Cytogenet. Cell Genet*;52:170–176.
- Hassold T, Chiu D (1985) Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum. Genet*;70:11–17.
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet*;2:280–291.
- Hsu LC, Doan TP, White RL. (2001) Identification of a gamma-tubulin-binding domain in BRCA1. *Cancer Res*;61:7713–7718.
- Hsu LC, White RL. (1998) BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;95:12983–12988.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*;4(1):44-57
- Hunt T (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 2, 213–222.
- Kolesnikov N. et al. (2015). ArrayExpress update-simplifying data submissions.. *Nucleic Acids Res*, doi: 10.1093/nar/gku1057.
- Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL (2005) Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. *Am. J. Hum. Genet*;76:91–p9.
- McDowell T.L, Gibbons R.J, Sutherland H, O'Rourke D.M, Bickmore W.A, Pombo A., Turley H, Gatter K, Picketts D.J, Buckle V.J, Chapman L, Rhodes D, Higgs D.R (1999). Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13983–13988.
- Murray AW and Marks D (2001). Can sequencing shed light on cell cycling? *Nature* 409, 844–846.
- Musacchio A, Hardwick KG (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*;3:731–741.

Musacchio A, Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*;8:379–393.

Pan H., Ma P., Zhu W. and M. Schultz R. (2008) Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104-6018.

Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J (2002) Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 invitro unfertilized oocytes. *Hum. Reprod*;17:2134–2145.

Picketts, D.J., Tastan, A.O., Higgs, D.R., Gibbons, R.J (1998). Comparison of the human and murine ATRX gene identifies highly conserved, functionally important domains. *Mamm. Genome* 9, 400– 403.

Roeder, G. S (1997). *Genes Dev.* 11, 2600–2621

Rokutan. K., Johnston, R.B. and Kawai, K. (1994) Oxidative stress induces S-thiolation of specific proteins in cultured gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.*, 266, G247-G254.

Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P, (1998). The meiotic competence of invitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum. Reprod*;13:154–160.

