

eman ta zabal zazu



**MORFINAK DNA-REN METILAZIOAN DUEN ERAGIN
EPIGENETIKOAREN AZTERKETA, BIGARREN
BELAUNALDIKO SEKUENTZIAZIO TEKNIKAK ERABILIZ**

DOKTORE TESIA

UPV/EHU

Manu Araolaza Lasa

Leioa, 2022

Zuzendariak:

Nerea Subirán Ciudad/Iraia Muñoa Hoyos

LABURPENA

LABURPENA

Zelulen patroï epigenetikoak haien fisiologia zehazten du, eta organismo baten garapenean zehar zelula bakoitzak duen patroï espezifikokoak haren diferentziazioa bideratzen du, organismo osoaren garapen egokia bat koordinatuz. Hala ere, inguruneak eta bizi estiloak eragin kaltegarriak eragin ditzake norbanakoengan, zelulen fisiologia zehazten duen patroï epigenetikoan eraginez. Biomedikuntzak egun duen erronka handienetarikoa bat inguruneak edo kanpo faktoreek eragindako aldaketa epigenetikoek sortu ditzaketen osasun arazoak edo gaixotasunen atzean dauden mekanismo molekularrak ulertzea da. Bestalde, aldaketa fisiologiko horiek eragiten dituzten marka epigenetikoak denboran zehar mantendu daitezkeela ikusi da. Beraz, kanpo faktore horiekin kontaktu zuzena izan duten bizidunek eragin nabarmenak pairatzeaz gain, denbora zehar mantentzen dituzte memoria zelularra baimentzen duten mekanismoen bidez, eta horrez gain, eragin horien belaunaldiz belaunaldiko herentzia bat ere eman daitezkeela ziurtatzen dituzten zantzuak geroz eta ugariagoak dira.

Aurrekari horiek kontuan hartuta, doktore-tesi honen helburu nagusia morfinak eragin ditzakeen aldaketa epigenetiko nagusiak identifikatu, eta horiek zelulen edota organismo bizidun konplexuen fisiologian eragin ditzakeen aldaketak aztertzea izan da. Aldaketa fisiologiko horiek eragiten dituzten mekanismo epigenetiko ezberdinak badaude ere, kasu honetan DNAREN metilazioan zentratu gara, eta Bigarren Belaunaldiko Sekuentziazio teknikak erabili ditugu metiloma aztertzeko helburuarekin. Ikerketa lan honek, besteak beste, memoria epigenetikoaren atzean dauden mekanismoak aztertzeko aukera eskaini digu. Morfinak asaldurak sortzen ditu birprogramazio epigenetikoan funtsezko prozesua den X kromosomaren inaktibazioan, eta gainera, asaldura horiek mantentzeko eta heredatzeko potentzialtasuna dutenez, morfinak eragindako zelularteko memoriaren azpian dauden mekanismo epigenetikoak ikertu ditugu. Horrez gain, birprogramazioaren helburu nagusia den eta zelula amen bereizgarria den pluripotenzia indartua geratzen dela frogatu dugu morfinaren presentzian, horretarako ezinbestekoak diren zenbait prozesu molekular bultzatuz; transkripzio faktore garrantzitsuen adierazpena doiketa, genomaren estatus epigenetikoa murrizketa, eta X kromosoma egoera aktiboaren mantenua. Horrek, morfinaren erabilpenak zelulen fisiologian izan ditzakeen ondorioetan are gehiago sakontzeko aukera eskaini digu, aurrerapauso interesgarriak gauzatuz enbrioien garapen-prozesuaren ezagutzan.

AURKIBIDEA

1. SARRERA.....	1
1.1. Epigenetika.....	3
1.1.1. Material genetikoaren antolaketa eta eraldaketak.....	4
1.1.1.1. Aldaketa epigenetikoak.....	7
1.1.1.1.1. DNAREN metilazioa.....	7
1.1.1.1.2. Histonen eraldaketak.....	8
1.1.1.1.3. RNA ez-kodetzaileak edo ncRNA-k.....	12
1.1.2. DNAREN metilazioa.....	15
1.1.2.1. DNAREN metilazioaren historia.....	15
1.1.2.2. DNAREN metilazioa genomaz zehar.....	16
1.1.2.3. DNA metiltransferasak edo DNMT-ak.....	17
1.1.2.3.1. Mantentze metiltransferasa edo DNMT-ak.....	19
1.1.2.3.2. De novo metiltransferasak edo DNMT3-ak.....	21
1.1.2.4. DNAREN metilazioa eta transkripzioa.....	22
1.1.2.4.1. DNAREN metilazio konplexu laguntzaileak: MBDak.....	25
1.1.3. DNAREN metilazioa.....	27
1.1.3.1. Ten-Eleven Translocation proteinak edo TET-ak.....	29
1.1.4. DNAREN metilazioaren eta demetilazioaren garrantzia prozesu fisiologikoetan ...	30
1.2. Memoria epigenetiko.....	33
1.2.1. MEMORIA EPIGENETIKO ZELULARRA.....	33
1.2.1.1. DNAREN metilazioak eragindako memoria epigenetiko zelularra.....	34
1.2.1.2. Histonen eraldaketek eragindako memoria epigenetiko zelularra.....	35
1.2.1.3. RNA ez-kodetzaileek eragindako memoria epigenetiko zelularra.....	37
1.2.2. MEMORIA EPIGENETIKO TRANSGENERAZIONALA.....	39
1.2.2.1. DNAREN metilazioak eragindako memoria epigenetiko transgenerazionala.....	41
1.2.2.2. Histonen eraldaketek eragindako memoria epigenetiko transgenerazionala.....	43
1.2.2.3. RNA ez-kodetzaileek eragindako memoria epigenetiko transgenerazionala.....	45
1.3. Ingurumena eta epigenetika.....	49
1.3.1. KANPO FAKTOREAK.....	50
1.3.2. SISTEMA OPIOIDEA.....	53
1.3.3. KANPO FAKTOREAK: MORFINA.....	56

2.	HIPOTESIA ETA HELBURUAK	59
3.	MATERIALAK ETA METODOLOGIA	63
3.1.	Materialak	65
3.1.1.	GAILUEN ZERRENDA.....	65
3.1.2.	ERABILITAKO ERREAKTIBOEN ZERRENDA	67
3.1.3.	PRESTATUTAKO SOLUZIOEN ZERRENDA.....	69
3.2.	Laginak	70
3.2.1.	<i>In vitro</i> prozedura esperimentalak: ZELULAK.....	71
3.2.1.1.	Zelula lerroak eta bakoitzaren kultiboa	71
3.2.1.1.1.	Sagu blastozistoen barne masatik eratorritako zelula amak (mESC).....	71
3.2.1.1.2.	Giza zelulak (hIPSC).....	72
3.2.1.2.	Zelulen tratamendu kronikoa	73
3.2.1.3.	mESC zelulen desberdintze-prozesua (EpiLC)	73
3.2.1.4.	<i>in vitro</i> mESC zelulen SmcHD1 <i>KnockOut</i> eraketa <i>Crispr-Cas9</i> metodoaren bidez (transfekzioa).....	74
3.2.2.	<i>In vivo</i> prozedura esperimentalak: ANIMALIAK.....	76
3.2.2.1.	Sagu emeen hiperestimulazio obarikoa.....	76
3.2.2.2.	<i>in vivo</i> saguen tratamendu kronikoa.....	77
3.2.2.3.	Enbrioien erauzketa, kultiboa, eta morfinaren tratamendu kronikoa.....	77
3.3.	Metodologiak.....	79
3.3.1.	Proteinen analisisa (WB).....	80
3.3.1.1.	Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa	80
3.3.1.2.	Western Blotting-aren (WB) prozedura	80
3.3.2.	Geneen adierazpenaren analisisa (qRT-PCR).....	83
3.3.2.1.	RNAren erauzketa	83
3.3.2.2.	RNAren kontzentrazioa eta purutasunaren neurketa	84
3.3.2.3.	Alderantzizko transkripzioa.....	84
3.3.2.4.	Hasle espezifikoen diseinua	85
3.3.2.5.	Polimerasaren kate-erreakzio kuantitatiboa denbora errealean (RT-qPCR) .	87
3.3.2.6.	Gene adierazpen analisisa <i>Fluidigm</i> PCR nanofluidikoaren sistemarekin	89
3.3.3.	DNAen metilazio globalaren analisisa	89
	(LC-MS/MS).....	89
3.3.3.1.	DNAREN erauzketa.....	90
3.3.3.2.	DNAREN kontzentrazioa eta purutasuna	91
3.3.3.3.	DNAREN digestioa	91

3.3.3.4.	Kromatografia likidora akoplaturiko masa espektrometria (LC-MS/MS) teknika	91
3.3.4.	Zitosinaz zitosinako metilazioaren analisia (WGBS)	92
3.3.4.1.	DNAREN erauzketa eta laginen kontzentrazio, purutasun eta integritatearen neurketa	93
3.3.4.2.	Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) sekuentziazio metodoa	93
3.3.4.3.	WGBSaren analisi bioinformatikoa.....	94
3.3.4.3.1.	Kalitate kontrola.....	97
3.3.4.3.2.	Sekuentzien kateatzea.....	97
3.3.4.3.3.	Egokitzaileren mozketa.....	98
3.3.4.3.4.	WGBS sekuentzien lerrokatzea eta irudikapena	99
3.3.4.3.5.	WGBS adierazpen bereizgarriaren zitosinen antzematea	103
3.3.4.3.6.	Ezaugarri genomikoen izendatzea.....	105
3.3.5.	DATUEN ANALISI ESTATISTIKOA	105
4.	EMAITZAK	109
4.1.	Morfinak DNAREN metilazioan eragindako aldaketa epigenetikoak	111
4.1.1.	Morfinaren tratamendu kronikoak mESC zeluletan eragindako aldaketa globalak DNAREN metilazioan (eta hidroximetilazioan) <i>in vitro</i>	111
4.2.1.	Morfinak sagu ar eta emetan maila sistemikoan eragindako aldaketa globalak DNAREN metilazioa (eta hidroximetilazioa) <i>in vivo</i>	113
4.2.	Morfinaren tratamendu kronioak mESCtan eragindako zitosinaz zitosinako metilazio aldaketak WGBS teknikaren bidez	117
4.2.1.	mESC zeluletan WGBS teknikaren bidez eskuraturiko datuen integrazio RNAseq-eko datuekin.....	130
4.2.2.	mESC zeluletan WGBS teknikaren bidez eskuraturiko datuen integrazio prozesua, RNAseq eta CHIPseq analisisekin.	134
4.3.	Morfinak DNAREN metilazioaz arduratzen den konplexu proteikoan eragiten duen autoerregulazioa	137
4.3.1.	DNAREN metilasak diren DNMT proteinak:.....	137
4.3.2.	Metilazioaren mantentzea gauzatzen duten MBD proteinak:	143
4.3.3.	DNAREN demetilasak diren TET proteinak:	147
4.4.	Morfinak DNAREN metilazioaren bidez eragindako pluripotentiaren emendioa mESCtan	151
4.4.1.	<i>Yamanaka</i> transkripzio faktoreak	152
4.4.2.	PRC2 konplexua	157
4.5.	Morfinak X kromosomaren inaktibazioan (XCI) duen eragina mESCtan <i>Smcnd1</i> genearen erregulazio epigenetikoaren bidez.....	162
5.	EZTABAIDA.....	173

5.1.	Morfinaren tratamendu kronikoak aldaketa globalak eragiten ditu DNAREN metilazioan	176
5.1.1.	Morfinaren tratamendu kronikoak genomako demetilazio aktiboan eragiten du TET entzimen-bidezko autoerregulazio mekanismoarekin.....	180
5.2.	Morfinaren tratamendu kronikoak pluripotentzia mantentzen du mESCtan	181
5.2.1.	Morfinak pluripotentiaren mantenua gauzatzen du <i>Yamanaka</i> faktoreen adierazpena doituz.....	182
5.2.2.	Morfinak pluripotentiaren mantenua bultzatzen du estatus-epigenetikoaren erregulaturik: DNA metilazioa eta PRC2 konplexu epigenetikoaren	184
5.2.3.	Morfinak pluripotentiaren mantenua gauzatzen du X kromosoma egoera aktiboan mantenduz	186
5.3.	Morfinak XCI oztopatzen du memoria epigenetikorako gakoak diren prozesu erregulatuaren bidez.....	187
5.4.	Ondorioak eta etorkizunerako aurreikuspenak:.....	189
6.	ONDORIOAK.....	191
7.	BIBLIOGRAFIA.....	195

1. SARRERA

1.1. Epigenetika

Epigenetikaren historia eboluzioaren eta garapen prozesuaren ikerketarekin erlazionatua egon da. Kontzeptu horren inguruko eztabaida XIX. mende hasieran hasi zen biologia zelularreko eta enbriologiako zenbait ikerketa ezberdinen bidez, egungo genetikaren eta garapen-prozesuaren inguruko ezagutzen oinarriak eratu zituzten ikerketekin, hain zuzen ere. Garai hartako enbriologoek, jakin-min handia zuten gaiaren inguruan, eta, ondorioz, eztabaida luzea izan zuten organismoen garapen-plana gauzatzeaz arduratzen ziren eragileen inguruan; izan ere, ez zuten ulertzen nola zen posible ernaldutako obulu batetik fenotipo ezberdineko zelulak dituen organismo konplexu berri bat eratzea. Azken mende erdian, gaiaren inguruan lorturiko informazio berriaren bidez terminoaren definizioa aldatuz joan da; epigenetika arautzen duten mekanismo molekularren inguruko ezagutza nabarmenki handitzen joan den heinean. Egungo epigenetikaren definizioak aintzat hartzen du organismo bereko zelula somatiko guztiek material genetiko bera dutela, eta beraien artean ezberdintzatzea eragiten duena, bakoitzean adierazten diren geneen azpimultzoa dela, eta hori kontrolatzen duena, genomako patroi epigenetikoa dela. Horrez gain, lorturiko ebidentzien arabera, patroi hori bere horretan heredatua izan daiteke. Beraz, egungo epigenetikaren definizioak honakoa dio: DNAr itsasten zaizkion eta heredagarriak izan daitezkeen molekula kimikoak aztertzen dituen ikerkuntza arloa, beti ere DNAREN sekuentzian aldaketarik sortu gabe (Bird, 2007; Goldberg et al., 2007).

Aurkikuntza horiek epigenetikak dituen mekanismo molekularren inguruan ezagutza nabarmenki handitu dute. Edonola ere, kontzeptu hori ondo ulertzeko ezinbestekoa da ohartzea mekanismo horiek guztiak beraien artean erlazionaturik daudela, eta denen artean epigenetika arautzen duten erregulazio sare konplexu bat eratzen dutela.

1.1.1. Material genetikoaren antolaketa eta eraldaketak

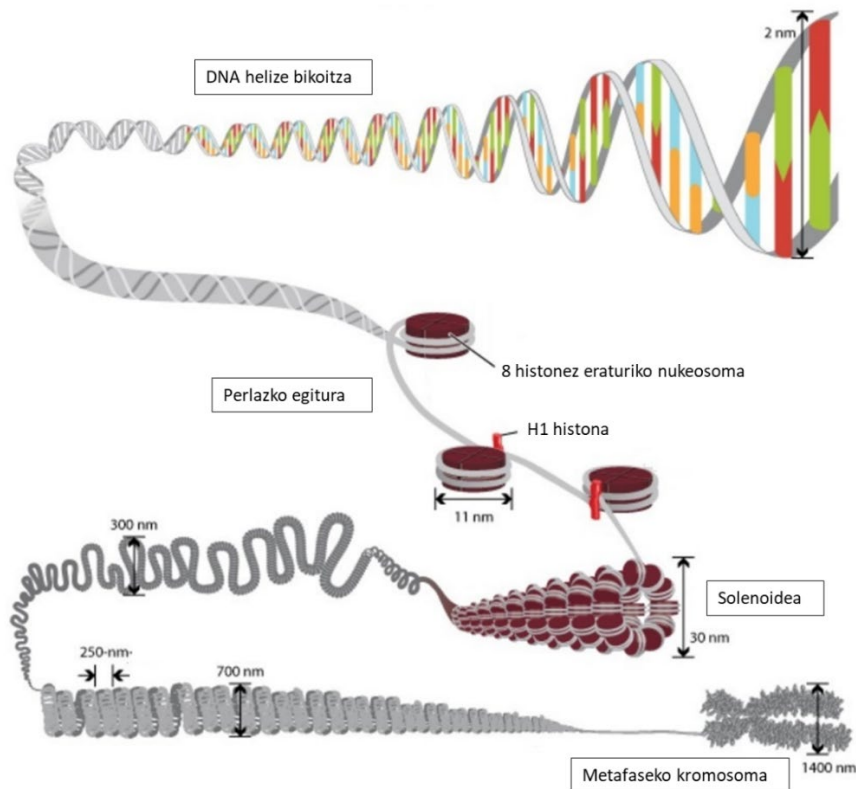
Informazio genetikoa osatzen duen nukleotidoen sekuentzia nukleoaren barnean egoten da gordeta, eta batez beste 2 metro izan ohi ditu, bai gizakietan eta bai saguetan. Nukleoak, 10µm-ko diametroa du nagusiki, baina aldakorra izaten da zelula motaren arabera. DNA katea konpartimentu horren barnean aurkitzen denez ezinbestekoa da halamoduzko tolestura bat jasatea; DNA katea 105 aldiz kondentsatua egon behar du. Kondentsazioa hori baimentzen duten eragileak kontserbazio maila altua duten, eta guztiz espezializaturik dauden proteinak izaten dira. Proteina horiek DNA zuntzari elkartu, eta, ondorioz, horren trinkotzea gauzatzen dute maila ezberdineko tolestura konplexuak eratuz (Li & Zhu, 2014). Proteinekin hierarkikoki bilduta dagoen DNA zuntz horri kromatina deritzogu (Grekotik datorren “khroma” aurrizkiak koloreztatua esan nahi du, egitura horrek tindatzeko dituen propietate handiak direla eta)(Filion et al., 2011), eta bertako proteina espezializatuak bitan banatu daitezke: histonak, eta histonak ez diren gainerako proteinak.

Nukleosoma da kromatina zuntzaren oinarritzko unitatea, nukleosoma bakoitzean 8 histona topatzen dira oktameroko moduan ezagutzen den egitura bat eratuz, eta DNA katea horren inguruan biribilkatzen da, bira bat eta hiru laurden emanez (Luger et al., 1997). Nukleosoma, 4 histona pare ezberdinek osatzen dute: H2A-k, H2B-k, H3-k eta H4-k. Lisina eta arginina aminoazidoak bereziki ugariak dira proteina horietan, eta horrek izaera basikoa ematen die, erraztasun handiarekin elkartzen direlarik izaera negatiboa duten azido nukleikoarekin. Histona horiez gain H1 bezala ezagutzen den histona gehigarri bat ere aurkitzen da nukleosomak inguratuz, eta hori, egitura finkatzeaz eta egonkortzeaz arduratzen da (Fan et al., 2003). Nukleosoma egitura trinkoa den arren, histonen amino muturrak konplexutik kanpo geratzen dira solte, eta, horrenbestez, isatsen antzeko egiturak sortzen dituzte. Nukleosomen artean geratzen diren DNA zati askeei, berriz, *DNA linker* deitzen zaie, eta horiek malgutasuna ematen diote kromatina zuntzari; nukleosoma bakoitzaren posizioa zehatzuz funtzio garrantzitsua jokatzen dute kromatinaren antolakuntzan. Nukleosomaren funtzioa DNA antolatzea denez, horrek DNA sekuentziaren eskuragarritasuna edota bertara iristeko erraztasuna arautzen du, eta, beraz, bertan topatzen diren geneen adierazpena ere erregulatzen da (Lee & Workman, 2007). Nukleosomen kokapen zehatza zehazki zerk arautzen duen guztiz ezagutzen ez bada ere, DNAREN metilazioek, kromatinaren eraldatze entzimek eta histonen modifikazioek funtzio garrantzitsuak betetzen dituztela argi dago (Arya et al., 2010).

Segun eta zelula bere bizi zikloko zein etapatan dagoen material genetikoak duen antolaketa ezberdina da. DNA katea, nukleoaren barnean mantentzen da kromatina moduan zelularen ia bizitza osoan zehar, eta horri nukleo interfaseko genoma deritzogu. Zelulak mitosia burutu behar duenean, berriz, DNA bikoiztu egiten da erreplikazio prozesuaren bidez, eta material genetiko hori ondo definituriko kromosoma ezberdinetan paketatzen da; 23 kromosoma pareetan gizakiotan (Arnold, 1879), eta 20 kromosoma pareetan saguetan (Painter, 1928). Horien helburua nagusia, zatiketa zelularrean genomaren banaketa egoki bat ematea da; egitura horri metafaseko genoma deritzogu.

Genomaren antolakuntza metafasean:

1.1. irudian ikusi dezakegun moduan, DNAren antolaketaz arduratzen diren nukleosomen segidak perlazko lepokoa sortzen du, eta egitura horretako perla bakoitza nukleosoma bat da (Olins & Olins, 1974). Nukleosoma horiek oso modu ordenatuan aurkitzen dira tolesturik, eta elkarren arteko distantziak laburtuz egitura lodiago eta kondentsatuago bat eskura dezakete, 30nm-ko zabalera duen egitura berri bat; solenoidea (Thoma et al., 1979). Egitura hori oso malgua da; nukleosomak gertuago edo urrunago egon daitezke trinkotasun maila ezberdinak eskuratuz. Hortaz, egitura dinamikoa dela esan daiteke. Nukleosomen antolakuntza arautzen dituzten mekanismoak zein diren garbi ez badago ere, H1 proteinaren lotura motak (Olins & Olins, 1974) edo histonen isatsak (Allan et al., 1982) jotzen dira horren eragile nagusitzat. Edozein kasutan, solenoidearen bira bakoitzean DNA kateaz inguraturiko 6 nukleosoma topatzen dira. Egitura hori are biribilkatuago ager daiteke trinkotze maila handiago bat eskuratuz; 300nm-ko kromatinazko zuntza (widom, 1986). Amaitzeko, zuntz hori bere baitan biribildu daiteke kromatidak eratuz. Kromosoma bakoitzak bi kromatida ditu, eta horiei kromatida ahizpak deritzegu. Kromatinaren trinkotze maila konplexu hori eskuratzeko eta egonkortzeko mekanismoak guztiz ezagutzen ez badira ere, H1 histonaren fosforilazioak, topoisomerasa II entzimak eta kondentsinek betetzen dituzten funtzioak gakoak direla uste da (Belmont, 2006).



1.1. irudia. DNAREN antolaketa metafasean. Helize bikoitzeko DNA 8 histonez osaturiko (beste histona gehigarri batekin batera; H1) nukleosomen inguruan antolatzen da, eta horien segidak perlazko lepoko moduan ezagutzen den egitura osatzen du. Ondoren, egitura horrek 30nm-tako zuntz hutsa eratzen du; solenoidea. Solenoidearen tolesturak bestelako zuntz lodiago bat eratzen du eta horrela etengabe metafasearen bereizgarriak diren kromosomak eratu arte (Irudi moldatua; Pierce, Benjamin. Genetics: A Conceptual Approach, 2nd ed).

Genomaren antolakuntza nukleo interfasekoan:

Nukleoan bi kromatina mota bereizten dira (Heitz, 1928): alde batetik, heterokromatina izenez ezagutzen den eremu kondentsatua (genomaren %10-a izatera iritsi daitekeena), eta, bestetik, eukromatina, kondentsazio maila baxuagoko eremua. Heterokromatina beti agertzen da nukleoan, eta, oro har, bertako gene kopurua oso baxua izan ohi da; heterokromatinaren presentziaren eta gene adierazpenaren artean dagoen alderantzizko erlazioa aspalditik onartua zen. Hortaz, genomak isildutako edo transkripzio gabeko eremuak izendatzeko heterokromatina hitza erabiltzen da, eta, bestalde, kromatina irekia edo transkripzio aktiboko eremuak adierazteko, eukromatina erabiltzen da. Hala ere, heterokromatina definizioaren barruan bi bereizketa egiten dira. Alde batetik, heterokromatina konstitutiboa dago, funtzioaren eta geneen adierazpenaren arabera kondentsazio-maila aldagarriak erakusten dituenak, zentromeroak eta telomeroak

esaterako, eta, bestetik, heterokromatina fakultatiboa, DNA errepikakorrez eratua eta beti kondentsatua dagoena. Eremu horien presentzia zelula motaren araberakoa da, eta desberdintze prozesuan zehar aldatuz joan daiteke (Dimitri et al., 2005). Heterokromatina fakultatiboaren adibideetako bat ugaztunetako indibiduo emeek aurkezten duten X kromosoma inaktiboa da. Edonola ere, transkripzioa ez da prozesu konstantea, zelularen adierazpena aldatuz doa denborarekin eta bizi duen egoerarekin. Horregatik, kromatinako zenbait eremuk konformazio aldakorra aurkezten dute; egitura dinamikoa da eta zelularen beharretara egokitzen da (Dimitri et al., 2009).

1.1.1.1. Aldaketa epigenetikoak

Zelulen eta indibiduo zelulaniztunon epigenetika marka epigenetiko ezberdinen bidez arautua dago; hau da, nukleotido sekuentzian inongo aldaketarik sortu gabe DNAREN gainean ematen diren zenbait aldaketa kimiko eta itzulgarri (Jaenisch & Bird, 2003). Gaur egun, hiru marka nagusi ezagutzen ditugu ugaztunotan: DNAREN metilazioa, histonen eraldaketak eta RNA ez-kodetzaileak (ingelesezko *non-coding RNA* edota ncRNA) (Kiefer, 2007). Aldaketa horiek funtzio hauetan eragiten dutela behatu da: transkriptoen egonkortasunean, DNAREN kondentsazioan, nukleosomaren kokapenean, kromatinaren trinkotzean eta nukleoaren antolaketan, besteak beste. Hala ere, geneen adierazpen mailaren erregulazioarekin erlazionatu dira nagusiki; marka epigenetiko espezifikoek geneen transkripzioa pizteko edo itzaltzeko ahalmena dute. Hortaz, DNAREN antolaketa gauzatzeaz gain, funtzio gakoak betetzen dituzte geneen adierazpena arautzerako garaian, zelula barneko sare transkripzional konplexua arautuz (Lennartsson & Ekwall, 2009).

1.1.1.1.1. DNAREN metilazioa

Gaur egun, DNAREN metilazioaren inguruan dugun ezagutza handia da, bereziki gainerako aldaketa epigenetikoekin konparatzen badugu (Holliday & Pugh, 1975). DNAREN metilazioa, DNAREN nukleotido sekuentziako zitosina hondarraren bosgarren posizioan dagoen karbonoan ematen den metilo taldearen gehikuntza kobalentea da (5-metilzitosina; 5-mC) (Hotchkiss, 1948), eta horren presentziak izugarriko garrantzia du zelulako transkripzioaren erregulazioan; aldaketa horiek, geneen adierazpen-maila erregulatu dezakete. Metilo taldearen eta zitosina hondarraren artean sorturiko lotura hori itzulgarria den arren, gainerako aldaketekin konparatzen badugu, horrek duen

biziraupena luzeagoa da (Lande-Diner & Cedar, 2005), horregatik aldaketa epigenetiko egonkortzat hartu daiteke.

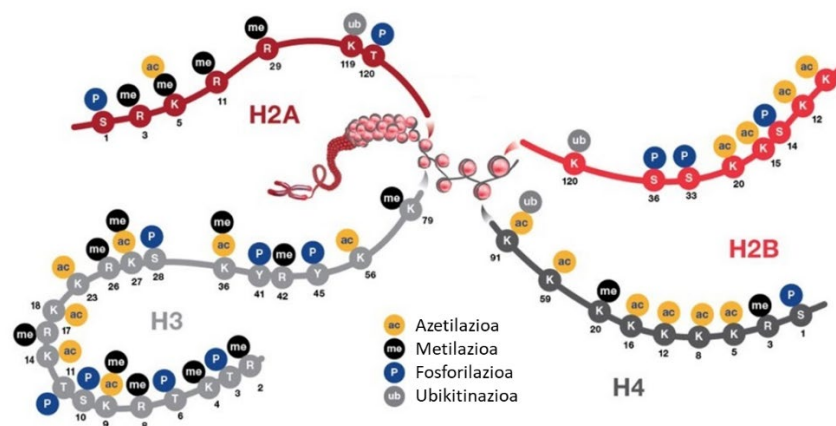
DNAREN metilazioaren banaketari dagokionez, horren presentzia oso aldakorra da genomaren osoan zehar, baina nagusiki CpG dinukleotidoetan ematen dela esan daiteke. Ugaztunen kasuan esaterako, genomako CpG dinukleotidoen %60-80a metilaturik aurkitzen da. Nagusiki, DNAREN metilazioa CpG dinukleotidoetan ematen bada ere, bestelako dinukleotidoetan ematen diren metilazioak ere deskribatu dira, eta ikusi denez, eraldaketa horiek ere bere garrantzia dute (CpA, CpT eta CpC besteak beste) (pinney, 2014; Ramsahoye et al., 2000).

Ugaztunotan DNAREN metilazioa gauzatzen duten entzima katalitikoak DNA metiltransferasen familiako hiru entzima dira (ingelesezko *DNA Methyltransferases*; DNMTs) eta horiek, beraien artean koordinatuz DNA katean zehar metilazio patroia ezartzeaz arduratzen dira, bestelako proteina laguntzaile askorekin batera. Zelula somatikoetako eta zelula ama enbrionarioetako (ingelesezko *embryonic stem cell*; ESC) DNAREN metilazioa gauzatzeaz, mantentze metiltransferasa moduan ezagutzen den proteina arduratzen da, DNMT1 (ingelesezko *DNA Methyltransferase 1*; DNMT1) entzima eta hori, kate hemimetilatuekin erlazionatzen da nagusiki. Entzima horrek, erreplikazio ostean hemimetilaturik topatzen den DNA katea ezagutzen du eta metilatu gabe dagoen harizpi osagarria metilatzeaz arduratzen da, jatorrizko harizpia molde moduan erabiliz. Hortaz, mantentze lanetan aritzen dela esaten daiteke (Jeltsch & Jurkowska, 2014). DNAREN metilazioaz arduratzen diren beste bi entzimak, DNA metiltransferasa 3 bezala ezagutzen dira (ingelesezko *DNA Methyltransferase 3*; DNMT3): DNMT3A eta DNMT3B entzimak. Horiek oso garrantzitsuak dira garapeneko etapa goiztiarretan, guztiz metilatu gabe dauden DNA kateen metilazio patroia ezarpenean zehazki; hau da, DNA kate biluzien metilazioan. Horregatik, *de novo* metiltransferasa bezala ezagutzen dira. Hortaz, ezinbesteko funtzioak betetzen dituzte zelula ama enbrionikoen lehen faseetan. Ondorengo faseetan berriz, nahiz eta aktibitatea izan, nabarmenki jaisten da beraien presentzia (Okano et al., 1999).

1.1.1.1.2. Histonen eraldaketak

Nukleosoma osatzen duten 8 histonek DNAREN antolaketa gauzatzen dute, eta histona horiek mota ezberdinetako eraldaketa kimikoak jasan ditzakete beraien N- muturreko isatsean. Eraldaketa mota horien artean 30 ezberdin baino gehiago identifikatu badira ere, ohikoenak eta, ondorioz, gehien ikertuak izan direnak hauexek dira: azetilazioa

(Sterner & Berger, 2000), metilazioa (Zhang & Reinberg, 2001), fosforilazioa (Nowak & Corces, 2004), ubikitinazioa (Shilatifard, 2006), deaminazioa (Cuthbert et al., 2004), sumoilazioa (Nathan et al., 2006), ADP-ribosilazioa (Hassa et al., 2006) eta prolinaren isomerizazioa (Cuthbert et al., 2004). Aipaturiko aldaketa kimiko horiek histonetako isatsetan topatzen diren aminoazido ezberdinetan eman daitezke. Edozein kasutan, ez da zoriz ematen den prozesu bat; oso kontrolatua dagoen prozesua da eta horren atzean dauden mekanismoak oso konplexuak dira. Eraldaketa bakoitzak, segun eta zein motako den eta non ematen den, funtzio erabat ezberdina du. Nagusiki, aldaketa horiek jasaten dituzten aminoazidoak lisina, arginina, serina eta treonina aminoazidoak dira. Ondoren aurkezten den 1.2. irudian nukleosoma osatzen duten histonen isatsetako eraldaketa esanguratsuenak zeintzuk diren beha dezakegu. Esaterako, lisina hondarrek azetilazio, ubikitinazio edo sumoilazio prozesuak jasan ditzakete. Fosforilazioari dagokionez, serina eta treonina hondarretan oso ohikoak izaten dira. Metilazioa berriz, lisina eta arginina hondarretan ematen dira, eta gainera, maila ezberdinetakoak izan daitezke; hau da, aminoazido horien eraldaketak mono-, di- edota tri-metilazio moduan eman daitezke (Kouzarides, 2007).



1.2. irudia. Nukleosomako histonen eraldaketa posibleak. Nukleosoma osatzen duten 4 histona pare ezberdinek (H2A, H2B, H3 eta H4) beraien isats askean jasan ditzaketen eraldaketa mota nagusiak. Ac: azetilazioa; me: metilazioa; P: fosforilazioa; Ub: Ubikitinazioa. Hizkiek aminoazido ezberdinei egiten die erreferentzia, eta zenbakiak, berriz, isatseko kokapenari. K: Lisina; S: Serina; R: Arginina; T: Treonina; Y: Tirosina (Irudi moldatua; Thermo Fisher Scientific <https://www.fishersci.es/es/es/home.html>).

Aldaketa horien funtzio zehatza argi ez badago ere, bakarka edo taldeka joka dezaketela frogatu da (Berger, 2007). Edozein kasutan, aldaketa horiek kode jakin bat sortzen dute

zelularen nukleoan, eta kode horrek kromatinaren egitura edo antolaketa arautzen du (Luger et al., 1997; Strahl & Allis, 2000). Horrela, zelula bere kromatinaren egitura bere beharretara aldatzeko gai da, histonen eta DNAREN arteko elkarrekintzak arautuz, eta, ondorioz, geneen adierazpen kontrolatzeko gai izaten da (Kouzarides, 2007; Mersfelder & Parthun, 2006). Eukromatinaren eta heterokromatinaren arteko balantza hori kontrolatzen duten eragile nagusiak metilazioak eta azetilazioak dira (Cosgrove & Wolberger, 2005).

Histonetako metilazioek, esaterako, geneen transkripzioa pizteko edo isiltzeko gaitasuna dute. Metilo talde horiek ez dute inongo aldaketarik ekartzen histonen kargari dagokionez, eta molekula kimiko egonkorak dira, iraupen luzeko markatzat jotzen direlarik. Horrenbestez, bere horretan mantentzen dira mitosia eta gero (Margueron, Trojer & Reinberg, 2005). Histonen metilazio prozesu hori, histonen metiltransferasa moduan ezagutzen diren entzimen bitartez burutzen da (ingelesezko *histone methyltransferase*; HMT), eta lisina eta arginina jakinetan ematen da soilik. Metilazioak beteko duen funtzioa ezberdina da lisinaren arabera: H3K4, H3K36 eta H3K79 lisinetan ematen diren metilazioek geneen adierazpena pizten dute, eta H3K9, H3K27 eta H4K20 lisinetan ematen direnek, berriz, geneen adierazpena isiltzen dute (Kouzarides, 2007). H3K9 eta H3K27 lisina hondarretan ematen diren trimetilazioak esaterako, oso ikertuak izan diren marka epigenetiko errepresiboak dira. Horiek, kromatinaren trinkotzean eta transkripzioaren errepresio mekanismoetan parte hartzen dute, heterokromatina eratuz (Peterson & Laniel, 2004). Kromatina dinamikoa den heinean, histonetan dauden metilazioak ezabatu egin daitezke, eta hori lisina demetilasen (ingelesezko *lysine demethylases*; KDM) funtzioari esker lortzen da. Horren bidez, zelulek metilazio patroia kontrola dezakete modu zorrotz batean (Shi et al., 2004). Arginina hondakinen metilazioa berriz, arginina metiltransferasek (ingelesezko *protein arginine methyltransferase*; PRMT) burutzen dute eta geneen adierazpenaren erregulazioan garrantzia handiko marka bezala deskribatu da, transkripzioa piztu (Chen et al., 1999) edo itzaliz (Pal et al., 2004), metilazioa jasotzen duen hondakinaren arabera.

Azetilazioei dagokionez, eraldaketa mota hori transkripzionalki aktiboak diren kromatinaren eskualdeekin erlazionatu izan da (Allfrey, Faulkner & Mirsky, 1964; Hebbes, Thorne & Crane-Robinson, 1988; Turner, 1991); azetilo taldeak gehitzeak histonetako lisinen karga positiboa neutralizatzea ekartzen duenez, histonen eta DNAREN arteko loturak ahuldu egiten dira. Lotura horrek, positiboki kargaturiko histonen eta negatiboki kargaturiko DNAREN erakarpen indarra ahultzea dakar, eta, ondorioz, DNA sekuentzia eskuragarriago geratzen da. Horrek, transkripzio faktoreak eta RNA polimerasak DNA katera batzea errazten du (Tse et al., 1998). Azetilazioa lisina espezifikoetan burutzen da

histonen azetiltransferasa entzimen bitartez (ingelesezko *Lysine acetyltransferase*; KAT): H4K8, H4K9, H4K12 eta H4K14 lisinetan zehazki. Alderantziz, marka horiek histona deazetilasen bidez izaten dira ezabatuak (ingelesezko *histone deacetylase*; HDAC), kontrako efektua gauzatuz (Turner, 2000). Transkripzioa erregulatzeaz gain, azetilazioak bestelako funtzio garrantzitsuekin ere erlazionatu dira: kromatinaren erreplikazioarekin, errekonbinazioarekin eta DNAREN konponketarekin, besteak beste (Kimura, Matsubara & Horikoshi, 2005).

Fosforilazioa, serina eta treonina hondakinetan ematen den eraldaketa da, eta horrek kromatinaren trinkotze mailan eragiten du; trinkotze maila erlaxatzen du histonen isatsetan karga negatiboak ezarriz. Horren bidez, histonek duten karga neutralizatu eta DNAREKIKO duen afinitatea ahultzen du. Histonetako fosforilazioa geneen berehalako adierazpenaren erregulazioarekin erlazionatu da *in vitro* buruturiko zenbait ikerketetan (Sultan & Day, 2011). Beste ikerketa batzuetan berriz, DNAREN konponketa prozesuarekin erlazionatu da, prozesua erraztuko duen antolaketa berri bat emanez (Foster & Downs, 2005). Fosforilazio prozesua, entzima kinasa eta fosforilasen bitartez burutzen da: Aurora-B, IKK-alfa eta PP1 entzimen bidez, esaterako.

Ubikitinazio prozesua lisina hondarretan ematen da, ubikitina izeneko entzimaren bidez. Prozesu hori mono-Ub edo poli-Ub eran eman daiteke, eta horren arabera edukiko duen funtzioa ezberdina da (Bhaumik, Smith & Shilatifard, 2007; Weake & Workman, 2008). Marka epigenetiko hori oso polifazetikoa da, eta prozesu ezberdin askorekin erlazionatu da: proteinen degradazioa, DNAREN konponketa, zelula zikloaren kontrola, estresarekiko erantzuna, zelulen desberdintze-prozesua, erribosomen eta peroxisomen biogenesia, infekzio birala, degradazio neuronal eta muskularra, eta transkripzioa (Finley & Chau, 1991; Jason et al., 2002; Jennissen, 1995). Zelula baten barruan topa daitezkeen ubikitinazio mailak, ubikitina askearen eta entzimaren aktibitatearen araberakoa izaten da. Organismo eukariotoetan esaterako, H2A eta H2B histonen ubikitinazioak dira ohikoenak (Jason et al., 2002), eta ugaztunetan aldiz, histona bakoitzean lisina bakarra topatu daiteke ubikitinatua, 119. edo 120. lisina (Osley, 2006). H2A histonaren ubikitinazioa, transkripzioaren isiltzearekin eta DNAREN kaltetzearekin erlazionatu da (Cao, Tsukada & Zhang, 2005; Wang et al., 2004; Zhou, Wang & Rosenfeld, 2009; Zhou et al., 2008), eta H2B histonaren ubikitinazioa, aldiz, DNAREN konponketa prozesuekin, proteinen degradazioarekin eta geneen adierazpenaren erregulazioarekin (Bhaumik, Smith & Shilatifard, 2007; Weake & Workman, 2008; Jason et al., 2002).

1.1.1.1.3. RNA ez-kodetzaileak edo ncRNA-k

Aldaketa epigenetikoaren artean ezagutza txikiena RNA ez-kodetzaileen eremuan dago (ingelesezko *non-coding RNA*; ncRNA). ncRNA molekulak, RNA funtzionalak diren arren, ez dira inongo momentuan proteinetara itzultzen; Giza Genoma proiektuan ikusi zen moduan, ugaztunen genomako %2a soilik itzultzen da proteinetara (Collins, 2004; Alexander et al., 2010). Hortaz, zelulako DNAREN zati handi bat RNARA transkribatzen bada ere, RNA molekula gutxi batzuk bakarrik itzultzen dira proteinetan, eta horietariko gehienak, ncRNA mota ezberdinetan bilakatzen dira (Sandberg et al., 2013). Azken urteetan lorturiko ebidentzien arabera, molekula horiek funtzio garrantzitsuak betetzen dituzte geneen adierazpenean, geneen errepresio mekanismoetan parte hartuz zehazki. Edonola ere, prozesu hauetan ere inplikaturik agertu dira: kromosomen dinamiketan, kromatinaren egituraren mantentze eta eraldaketetan, genomaren egonkortasunean, aldaketa epigenetikoaren sustapenean, memorian, inpronta genomikoan, DNAREN metilazio epigenetikoan (Zhou et al., 2010; Baulcombe, 2004; Mattick & Makunin, 2005) eta hainbat gaixotasunen sorreran. Gaixotasun horien artean minbizi mota ezberdinak, gaitz neurologikoak eta gaitz kardiobaskularrak daude, besteak beste (Cech & Steitz, 2014; Esteller, 2011; Fatica & Bozzoni, 2014; Frias-Lasserre & Villagra, 2017; Mercer et al., 2009; Ohsawa et al., 2013). ncRNAk orokorrean bi talde nagusitan banatzen dira: RNA ez-kodetzaile luzeak (>200 nukleotido, ingelesezko *long non-coding RNA*; lncRNA) eta RNA ez-kodetzaile laburrak (<200 nukleotido, ingelesezko *small non-coding RNA*; sncRNA).

RNA ez-kodetzaile luzeak edo lncRNA:

RNA ez-kodetzaile luzeak intergenikoak, intronikoak, kontrako noranzkodunak edo gainjarritako noranzko bikoitzeko transkriptoak izan daitezke, eta eremu intergenikoetatik sortzen dira. Ugaztunon genoman horrelako milaka molekula egon daitezke (Carninci et al., 2005). lncRNA hauek, ez dira RNA arrunten moduan zitoplasmara garraiatzen (mRNAk kasu), horren ordez nukleoan mantentzen dira (Mao et al., 2011), eta bertan funtzio garrantzitsuak betetzen dituzte. Funtzio horien artean, geneen adierazpenaren erregulazioa dago; kromatinaren eraldaketan parte hartzen duten konplexuek RNA molekula horiekin lotzen dira (Sun & Zhang, 2005), eta horren bidez sorturiko konplexuek aldaketak sortzen dituzte histona ezberdinetan (Esteller, 2011), eta horiek kromatinan aldaketa konformazionalak burutu eta geneen adierazpena aldatzen dute (Rinn et al., 2007).

Ugaztunetan, *Xist* izan zen geneen adierazpena isiltzeko gaitasuna duen lncRNA bezala identifikatu zen lehenengo RNA molekula. Molekula horrek paper garrantzitsua betetzen du ugaztunetako indibiduo emeen zeluletako X kromosomaren inaktibazio prozesuan (McCarrey & Dilworth, 1992). Prozesu hori, DNAREN metilazioa bultzatuz eta histonetako errepresio markak finkatuz burutzen da, eta horren arduraduna *Xist* lncRNA da (Thorvaldsen et al., 2006). *Xist* genearen adierazpenaren erregulazioan, berriz, beste lncRNA batek parte hartzen du: *Tsix* lncRNA. Horrek kontrako efektua du, eta, ondorioz, *Xist* lncRNAren osagarria da (Lee, Davidow & Warshawsky, 1999). Bi geneen presentzia kontrolatzen dituzten mekanismoak guztiz ezagutzen ez badira ere, oro har, gertatzen dena honakoa da: *Tsix* lncRNAk *Xist* genearen gune sustatzailean heterokromatinaren agerpena bultzatzen duten zenbait entzimen bilketa bultzatzen du, horren adierazpena oztopatuz (Froberg, Yang & Lee, 2013; Lee, 2012).

Horrez gain, lncRNA molekulek ezinbesteko papera betetzen dute inpronta genomikoa aurkezten duten geneen erregulazioan. Inpronta genomikoa, geneak jatorri parental espezifikoaren arabera adieraztea eragiten duen mekanismo epigenetikoa da, adierazpen monoalelikoa ziurtatuz (Ferguson-Smith & Surani, 2001; Ideraabdullah et al., 2008; Reik, Dean & Walter, 2001); hau da, kromosoma pareetan dagoen informazioa berdina izan arren, batean adierazten dena bestean ez da adieraziko. Beste hitz batzuetan, inprontadun geneetariko batzuk jatorri aitatiarreko kromosometatik adieraztea eragiten du, eta beste batzuk, aldiz, jatorri amatiarreko kromosometatik adieraztea. Mekanismo hori oso kontserbatua dago ugaztunetan: primateetan, karraskarrietan, hausnarkarrietan eta martsupialetan, besteak beste (Lucifero et al., 2006; Monk et al., 2006; Umlauf et al., 2004; Vu, Jirtle & Hoffman, 2006). Gaur egun, 150 inpronta genomikodun gene inguru ezagutzen dira, eta horiek garapen enbrionarioan duten garrantzia oso handia da (Ferguson-Smith & Surani, 2001; Arnaud & Feil, 2005; Brannan & Bartolomei, 1999; Fowden et al., 2006; Nafee et al., 2008; Sleutels & Barlow, 2002). Prozesu horretan parte hartzen duten 200 lncRNA baino gehiago deskribatu izana, molekula horiek prozesu horretan daukaten garrantziaren erakusgarria da (Adalsteinsson & Ferguson-Smith, 2014; Barlow & Bartolomei, 2014).

RNA ez-kodetzaile laburrak edo sncRNA:

RNA ez-kodetzaile laburrak hiru azpitalde nagusitan banatzen dira (nahiz eta talde gehiago ezagutu): mikroRNAk (ingelesezko *microRNA*; miRNA), interferentziazko RNA laburrak (ingelesezko *small interfering RNA*; siRNA) eta PIWI molekuletara loturiko RNAk (ingelesezko *PIWI-interacting RNA*; piRNA) (Sandberg, Samson & Ji, 2013). Molekula

horiek heterokromatinaren mantenuarekin (Mirouze, 2012; Siomi et al., 2011) eta geneen isiltzearekin (Elbashir et al., 2001) erlazionatu dira, eta azken urteetan geneen adierazpenean burutzen duten rol garrantzitsua kontuan harturik, itu terapeutiko garrantzitsuak bilakatu dira gaixotasun ezberdinen aurrean (Mraheil et al., 2010).

Gehien ikertu diren sncRNAk miRNAk izan dira. Horiek 19-24bp-ko tamaina dute, eta proliferazio, hantura, fibrosi eta desberdintze prozesuen erregulazioarekin erlazionatu dira (Esteller, 2011). Orokorrean, miRNAk beraien gene ostalariarekin batera transkribatzen dira, proteina kodifikatzen duen genearen eta miRNAren erregulazio parekidea bermatuz (Mraz et al., 2012). Hala ere, funtzio erregulatzailerik burutzeko ezinbestekoa da RISC konplexuarekin (ingelesezko *RNA-induced silencing complex*) elkartzea, eta elkarketa horrek miRISC izeneko konplexua eratzen du. Konplexu horrek, isilarazi behar duen RNA mezulariaren (ingelesezko *messenger RNA*; mRNA) 3' UTRra (ingelesezko *untranslated region*; UTR) bideratzeko gaitasuna izaten du, eta biak batzen direnean, bere sintesia inhibituta geratzen da; mRNAren ezegonkortasuna handituz horren degradazioa bultzatzen da, eta, ondorioz, itzulpena oztopatua geratzen da (Bazzini, Lee & Giraldez, 2012; Stroynowska-Czerwinska, Fiszer & Krzyzosiak, 2014). Hortaz, molekula horiek zenbait geneen adierazpena kontrola dezakete.

siRNAk bi harizpitako RNA molekula luzeetatik eratortzen dira. Molekula luze horiek DICER endoribonukleasa bidez moztuak izaten dira, eta horrek siRNA txikiak sortzea eragiten du (Ketting et al., 2001). siRNA molekulek mRNAk ezagutzen dituzte harizpien osagarritasunaren bidez, eta elkarketa horrek mRNAren degradazio hasten du siRISC konplexuaren bidez (Agrawal et al., 2003). Degradazio prozesu hori, siRISC konplexuko proteina Argonautaren RNasa aktibitatearen bidez ematen da (Tomari & Zamore, 2005). siRNAek, geneen adierazpenaren erregulazioan parte hartzen dute, eta gainera, oso funtzio garrantzitsuak betetzen dituzte elementu transposagarrien (ingelesezko *transposable element*; TE) isiltzean (Cogoni et al., 1996).

Erregulazio epigenetikoan eragina duen beste talde garrantzitsu bat, piRNAek osatzen dute. Horiek zeozer luzeagoak izaten dira, 24-32 nukleotido arteko sekuentziak batez beste. Euren funtzioa gauzatu ahal izateko, piRNAek PIWI izeneko proteinekin elkartu behar dute, eta horrek baimentzen du beraien funtzioa gauzatu ahal izatea. Hala ere, konplexu horren eraketa prozesua ezberdina da. Aurreko kasuetan ez bezala, piRNAetan ez da DICER nukleasadun aktibitatea duen konplexurik eratzen (Stuwe, Toth & Aravin, 2014), eta bere mekanismoa azaltzeko bi bide ezberdin proposatu dira (Ghildiyal & Zamore, 2009). Bi aukeretan, amarengandik jasotako piRNA-k patroi gisa erabiliz sortzen dira: alde batetik, piRNA aitzindarietatik erauziz (Brennecke et al., 2008), eta bestetik,

PIWI proteinen laguntzaz *Ping-Pong* izenaz ezagutzen den prozesuaren bidez (Brennecke et al., 2007; Gunawardene et al., 2007; Olivieri et al., 2012). Bi kasuetan, PIWI proteinen laguntzaz piRNA-k sortu, histonen metilazioan aritzen diren entzimak bildu, eta heterokromatinaren eraketa ahalbidetzen da (Gu & Elgin, 2013).

1.1.2. DNAREN metilazioa

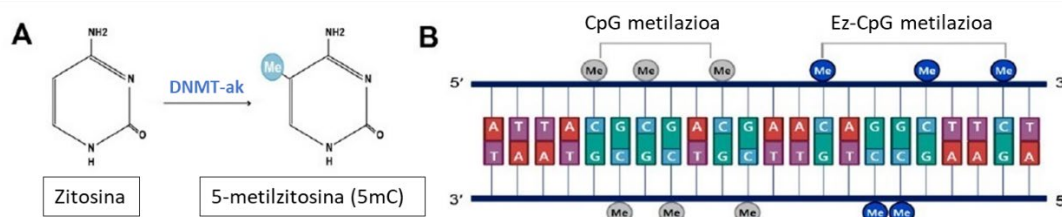
1.1.2.1. DNAREN metilazioaren historia

DNAREN metilazioaren aurkikuntzak, epigenetikaren oinarriak ikertzen hasia ahalbidetu zuen, eta hori 5-metilzitosina (5mC) hondarraren aurkikuntzarekin batera hasi zen 1948. urtean; Hotchkiss-ek kromatografia metodoaren bidez hondar horren aurkikuntza burutu zuen kasualitatez zenbait esperimendu gauzatzeko garaian (Hotchkiss, 1948). Aurkikuntza hori, Wyatt zientzialariak berretsi zuen, eta aldi berean marka horrek funtzio garrantzitsuak betetzen dituela azpimarratu zuen (Wyatt, 1951). 1958. urtean, zitosinaren metilazioa DNAREN erreplikazio prozesuaren jarraian eta modu independentean ematen den prozesua dela proposatu zen, eta gainera, marka epigenetiko moduan jokatu dezakeela adierazten zituzten lehen baieztapenak burutu ziren (Kornberg et al., 1959). Hala ere, hipotesia horrek ez zuen oinarri sendorik, eta beste 10 urte igaro behar izan ziren esperimentalki baieztatua izateko (Billen, 1968; Lark, 1968). Bitarte horretan, izaki prokariotoetako lehen metiltransferasak eta errestrikzio endonukleasak identifikatu ziren, eta marka epigenetiko hori bakterioek errestrikzio/eraldaketetan oinarritutako defentsa sistemarekin lotu zen (Luria & Human, 1952; Bertani & Weigle, 1953; Arber & Dussoix, 1962; Srinivasin & Borek; 1964; Gold & Hurwitz, 1964). Organismo eukariotoetako DNAREN metilazioaren ikerkuntza, berriz, konplexuagoa izan zen; DNAko metilazio edukia zenbait metodo kromatografiko ezberdinen (Sneider, 1972; Singer et al., 1977; Culp et al., 1970; Silber et al., 1966) eta masen espektroskopiaren bidez neurtua izan zen (Gautier et al., 1977). DNA errekonbinantearen teknologiaren garapena, metilazioarekiko sentikorrak diren errestrikzio endonukleasen karakterizazioarekin batera, gertaera garrantzitsua izan zen metilazioaren analisi kuantitatiboetarako, eta, bereziki, banaketa espazialaren analisisetarako. Bird eta Southern izan ziren entzima horien erabilerak izan ditzakeen aplikazio erabilgarriez ohartzen lehenengoak, eta hori *Southern blotting* teknikaren bidez burutu zuten; horrek DNAREN metilazioak geneen gune

espezifikoa duen eragina aztertzeke aukera eskaini zien (Bird et al., 1978). Aurkikuntza horrek, DNAREN metilazioak transkripzioaren erregulazio edo arautze sistema konplexuetan parte hartzen duela frogatzea ahalbidetu zuen ugaztunetan, besteak beste. Horren ondoren, transkripzioaren erregulazioan garrantzitsuak diren, eta CpG dinukleotidoetan aberatsak diren zenbait gene ere identifikatu ziren. Esperimentu horietan, CpG dinukleotidoen kontzentrazio altuko DNA gene txikien frakzio diskretu bat identifikatu zen metilazioarekiko sentikorrek diren zenbait murrizketa-entzima erabiliz (HpaII entzima; ezagutze patroia CCGG duen entzima)(Cooper et al., 1983; Bird et al., 1985), eta kluster horiei CpG uharte (ingelesezko *CpG island*; CGI) deitu zitzaizen (Bird, 1986).

1.1.2.2. DNAREN metilazioa genomaz zehar

Jada aipatu dugun moduan, DNAREN metilazioa zitosina hondarraren bosgarren posizioko karbonoan ematen den metilo taldearen gehikuntza kobalentea da (5-mC). Ugaztunen kasuan, esaterako, DNAREN metilazioa guanina hondarren ondoan aurkitzen diren zitosinetan ematen da; hau da, CpG dinukleotidoetan (1.3.B Irudia). Hortaz, ikerketa ezberdinek frogatu duten moduan, zelula somatikoen genomaz aurkitzen diren CpG dinukleotido gehienak metilatuta egoten dira (Bird et al., 1985; Gardiner-Garden eta Frommer, 1987).



1.3. irudia. CpG dinukleotidoen metilazio prozesua. **(A)** DNAREN metilazioa nagusiki CpG dinukleotidoetako zitosina hondarraren 5. karbonoan ematen da metilo taldearen lotura kobalentearekin. Hori, metilo taldearen emaitza den AdoMet edo SAM molekulen eta DNMT proteina katalitikoaren bidez gauzatzen da. **(B)** Zitosinen metilazioa gehienbat CpG guneetan ematen bada ere, bestelako guneetan ere eman daiteke (Irudi moldatua; Jang et al., 2017).

DNAREN metilazioa CpG dinukleotidoetan ematen denez, horien banaketa aztertzerako garaian CpG dinukleotidoen kontzentrazio altua aurkeztzen dituzten eremu batzuk

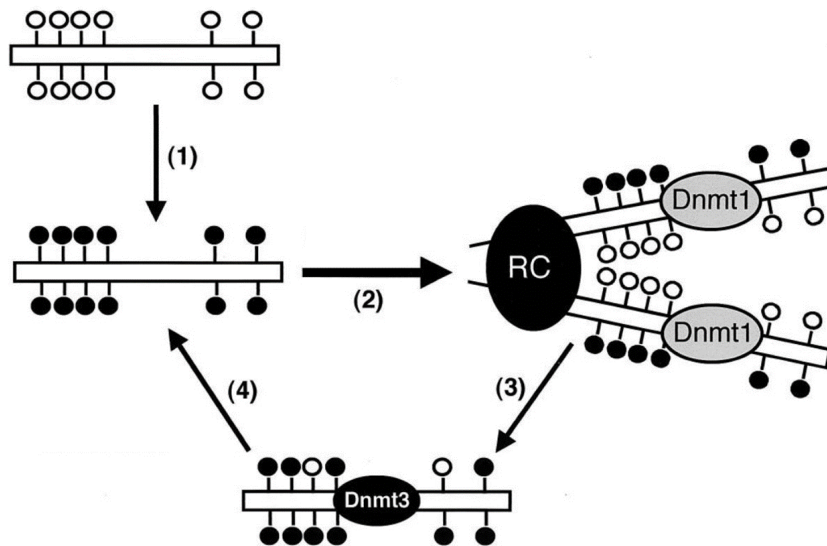
identifikatu ziren, CpG uharteak (ingelesezko *CpG island*; CGI) (Bird, 1986; Cooper et al., 1983). Eremu horien presentzia garrantzitsua da saguen genomak, eta bertan genomak osoaren %1-2a estaltzera iristen dira, eta hori ehun-mota ezberdinetan behatu da (Bird et al., 1985). CGIak horrela definitu ziren: gutxienez %50eko GC edukia eta 0,6 baino CpG maiztasun (behatua / esperotakoa) handiagoa duten 1kb inguruko eskualdeak (Bird, 2002; Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Harrigarriki, eremu horiek metilatuak izan daitezkeen CpG nukleotidoen proportzio altuak badituzte ere, oso kasu gutxitan egoten dira metilaturik, eta gainera, deaminatzeko joera txikiagoa dute (Cooper et al., 1983; Bird et al., 1985; Gardiner-Garden eta Frommer, 1987). Hortaz, interes handia piztu izan duten eremuak izan dira; kontraesanean dago DNAREN metilazioa nagusiki CpG dinukleotidoetan ematen dela dioen baieztapenarekin.

CGI eremu horiez gain, metilazioei dagokionez interesgarriak diren eta CpG dinukleotidoen kopuru altuak aurkezten dituzten beste eremu batzuk ere identifikatu dira. Gune horiek CGIen bi alboetan topatzen dira, eta distantziaren arabera modu ezberdinean izendatzen dira: *shore* eta *shelf* guneak, hurrenez hurren. *Shore* guneak CGI eremuetatik 0-2kb-tara topatzen dira, eta bertan metilazio kopuru nahiko altuak aurkitzen dira ehun espezifikoetako zelula somatikoetan (Irizarry et al., 2009; Doi et al., 2009). *Shelf* guneak, ordea, zeozer urrunago topatzen dira, 2-4 kb arteko tartean zehazki. CGI uharte, *shore* eta *shelf* guneetatik kanpo geratzen den gainerako guztia *open sea* bezala ezagutzen da (Irizarry et al., 2009; Sandoval et al., 2011).

1.1.2.3. DNA metiltransferasak edo DNMT-ak

DNAREN metilazioaz arduratzen diren entzimen artean DNA metiltransferasa moduan ezagutzen diren entzimak daude, hau da, DNMTak. Proteina horiek, emailea den S-adenosil-L-metioninaren (AdoMet edo SAM) metilo taldearen transferentzia burutzen dute modu kobalente batean zitosina hondarraren 5. Karbonora (3.A irudia), lotura egonkor baino itzulgarri bat eratuz. Ugaztunetan, orain arte 3 entzima katalitiko nagusi identifikatu dira: DNMT1, DNMT3A eta DNMT3B. Orokorrean, DNMT1 entzima jada ezarrita edo definiturik dagoen DNA metilatuaren patroia mantentzeaz arduratzen da; erreplikazio prozesua eta gero, jatorrizko harizpi metilatu erabiltzen du patroia moduan eta sortu berria den harizpia metilatzeaz arduratzen da. Zalantzarik gabe, DNMT1 da zelula orotan agertzen den DNMT nagusia, eta horren presentzia beharrezkoa da zelula guztietako mitosi prozesuetan (Holliday and Pugh, 1975; Riggs, 1975). DNMT3A eta DNMT3B entzimak, berriz, DNA metilatuaren patroia-berria eratzeaz arduratzen dira

hasieratik biluzirik dauden DNA kateetan, eta *de novo* metiltransferasa moduan ezagutzen dira (Chen & Li, 2004). Aipatutako prozesu horiek 1.4. irudian agertzen dira eskematikoki irudikatuak. DNAREN metilazioa burutzeko garaian, metilo taldearen gehikuntza gauzatzen duten entzima katalitikoek ez dute beraien funtzioa beraien soilik betetzen, horretarako prozesu horretan lagunduko dieten zenbait proteina gehigarri behar izaten dituzte, beraien eginkizuna modu egoki batean burutzen laguntzen dutenak. Proteina katalitiko horiek bere laguntzaileekin elkartzen direnean metilasa konplexuak eratzen dituzte. Datorren atal horretan, DNAREN metilazioaz arduratzen diren proteina katalitiko horietaz hitz egingo dugu, aipatu berri ditugun bi prozesu ezberdinen inguruan, nahiz haien proteina laguntzaile nagusiez.

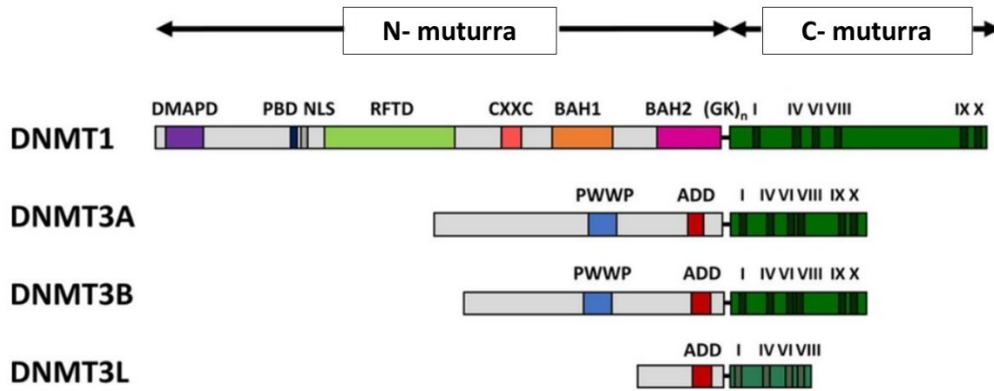


1.4. irudia. DNMT proteina katalitikoaren papera DNAREN metilazioan. DNAREN metilazioak bi mekanismo nagusi diferentziatzen dira, *de novo* metilazioa eta mantentze metilazioa, eta bakoitza burutzeaz arduratzen diren proteinak ezberdinak dira. **(1)** Metilatu gabeko DNA kate biltzearen metilazioaz DNMT3A eta DNMT3B entzimak arduratzen dira; *de novo* metilazioa. **(2)** Zelula zatitzera doanean, bere material genetikoa bikoiztu egiten da erreplikazio prozesuaren bidez, eta bertan hemimetilaturiko bi kate berri eratzen dira. **(3)** Erreplikazio urkilan mantentze metilazioa ematen da metilatu gabe dagoen harizpia metilatuz eta harizpi zaharra molde moduan erabiliz, eta hori DNMT1 entzimaren bidez gauzatzen da. **(4)** Solte geratzen diren metilatu gabeko zitosinak, *proof-reading* bezala ezagutzen den mekanismoaren bidez metilatuak izaten dira DNMT3A/B entzimen bidez (Irudi moldatua; Chen et al., 2003).

1.1.2.3.1. Mantentze metiltransferasa edo DNMT-ak

Enbrioaren garapenean zehar definituz doan DNAREN metilazio-patroia, hau da, zelula motaren arabera espezifikoak izango den metilazio-patroia, mantendu egin behar da zatiketa zelularraren ondoren. DNAREN erreplikazio-ziklo bakoitzean sortzen diren bi DNA kateak hemimetilaturik geratzen dira, hots, harizpi zaharreko zitosinak metilaturik jarraitzen duten bitartean, berriki eratu den harizpiko zitosinak metilatu gabe aurkitzen dira. Jatorrizko kateko CpG dinukleotidoen metilazio simetrikoaren mantentzeaz arduratzen den mantentze metiltransferasa DNMT1 proteina da (Holliday and Pugh, 1975; Riggs, 1975).

DNMT1 entzimaren domeinu erregulatzailerak N- muturrean aurkitzen da, eta domeinu katalitikoak, osterak, C- muturrean (1.5. irudia). DNMT familiako proteina guztiek, DNA metiltransferasekiko espezifikoak eta kontserbatuak diren sekuentzia jakinen jarraipen bat izaten dute euren gune katalitikoan, eta, zehazki, horrek ematen die DNAREN metilazioa burutzeko aktibitate katalitikoak. Entzimaren funtzio erregulatzailerak, berriz, N- muturreko domeinu ezberdinen bidez eskuratzen dute. Lehenengo domeinuak, DMAP1 proteinarekin (ingelesezko *DNA methyltransferase associated protein 1*; DMAP1) elkartzea ahalbidetzen du; proteina horrek, histonen azetilazioan eta ATM (ingelesezko *Ataxia-telangiectasia mutated*) seinalizazioan parte hartzen du. Jarraian, PBD domeinua aurkitzen da (ingelesezko *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) binding domain*), DNAREN erreplikazioarako makineria eta lokalizazio nuklearrerako seinalearen (ingelesezko *nuclear localization signal*; NLS) arteko elkarrekintzak burutzeko beharrezkoa izaten den domeinua (Chen & Li, 2004). Beste domeinu garrantzitsu bat RFTS sekuentzia da (ingelesezko *the replication foci-targeting sequence*). Azken ebidentzien arabera, haren barnean UIM sekuentzia topatzen da (ingelesezko *ubiquitin-interacting motif*); H3 histoneko 18. lisina ubikitinatua ezagutzen duen sekuentzia (H3K18ub), eta elkarketa horrek DNMT1 entzima erreplikatu berri den guneetara lotzea eragiten du (Qin et al., 2015). CXXC domeinua, DNMT1 entzimak duen beste domeinu erregulatzailerak bat da, metilatu gabeko CpG-etara eta BAH (ingelesezko *bromo-adjacent homology*) domeinu parera (BAH1 eta BAH2) lotzen den eta zisteina aminoazidoetan aberatsa den domeinua. Gune horren funtzio espezifikoak ezezaguna da (Chen & Li, 2004).



1.5. irudia. Ugaztunetako DNMT entzimen egitura. Gizakiotako DNMT1, DNMT3A, DNMT3B eta DNMT3L proteinak hurrenez hurren, 1616, 912, 853 eta 387 aminoazido hondarretako entzimak dira. Lehengo hiru entzimak katalitikoki aktiboak dira eta DNMT3L proteina, berriz, ez, nahiz ta funtsezkoa izan. Erabilitako laburdurak: DMAPD - *DNA methyltransferase associated protein 1 interacting domain*; PBD – *PCNA binding domain*; NLS – *Nuclear localization signal*; RFTD – *Replication foci targeting domain*; CXXC – *CXXC domain*; BAH1 eta BAH2 – *Bromo-adjacent homology domains 1 and 2*; GK_n – *Glycine lysine repeats*; PWWP – *PWWP domain*; ADD – *ATRX-DNMT3-DNMT3L domain* (Irudi moldatua; Jeltsch & Jurkowska, 2016).

DNMT1-UHRF1 mantentze metilazio konplexu gidaria:

DNMT1 entzimak bere mantentze lanak modu egoki batean burutzeko *reader* moduan jokatzeko duen proteina bat izaten du eskura, UHRF1 proteina (ingelesezko *ubiquitin-like with PHD and RING finger domains*), eta biak DNMT1-UHRF1 konplexua eratzen dute. Konplexu horrek, erreplikazio urkilako (ingelesezko *replication fork*) kate hemimetilatuetara bideratzen du DNMT1 entzima, harizpi metilatu gabea metilatzeko helburuarekin. DNMT1ak kontserbaturiko 5 domeinu ditu: UBL (ingelesezko *ubiquitin-like domain*), TTD (ingelesezko *tandem tudor domain*), PHD (ingelesezko *plant homeodomain*), SRA (ingelesezko *SET and RING associated domain*) eta RING (ingelesezko *really interesting new gene domain*). DNMT1ak bere funtzioak modu egokian bete ditzan UHRF1 entzimarekin burutzen dituen elkarrekintzak konplexuak dira, eta bertan domeinu guztiek hartzen dute parte, guztiek batek izan ezik: UBL domeinua. Bi proteinak elkartzen direnean konplexua kromatinara elkartzen da: TTD eta PHD domeinuak, H3 histonako 9. lisina trimetilatua (H3K9me3) eta H3 histonan eraldatu gabe aurkitzen den 2. arginina ezagutzeko gai izaten dira (Rajakumara et al., 2011; Rothbart et al., 2013). Arginina hori metilatuta agertzen denean, berriz, elkarrekintza hori oztopatua geratzen da. Horrek agerian uzten du histonetako markek mantentze-metilazioaren erregulazioan betetzen duten funtzio garrantzitsua. SRA domeinuak, aldiz, hemimetilaturik aurkitzen den DNA katea ezagutu eta sintetizatzen ari den DNA katera eramaten du konplexua (Bostick et al.,

2007; Sharif et al., 2007). RING hatz domeinuak (ingelesezko *RING finger domain*) E3 ubiquitin ligasa aktibitatea du, eta H3 histonako 18. lisina ubikitinatzen du (H3K18ub) (Qin et al., 2015). Evidentzia horiek guztiak kontuan hartuta, UHRF1 proteinak *reader* moduan jokatu duela agerian geratzen da; izan ere, horrek burutzen dituen interakzioek nabarmenki igotzen dute DNMT1 entzima DNA kate hemimetilatura elkartzeko probabilitateak (Qin et al., 2015; Nishiyama et al., 2013).

1.1.2.3.2. De novo metiltransferasak edo DNMT3-ak

De novo metiltransferasa moduan ezagutzen diren bi entzimak, DNMT3A eta DNMT3B, DNAREN metilazio patroia hasieratik ezartzen duten proteina katalitikoak dira; hau da, metilazio patroirik gabe edo biluzik dagoen DNA katean ezartzen dute. Hortaz, ez dute eredu moduan balio izango dien inongo harizpirik. Edozein kasutan, bestelako funtzio batzuk burutzeko gai ere izaten dira: DNA metilatuaren mantentze lanetan lagundu dezaketela frogatu da (Chen et al., 2003; Jeong et al., 2009). Bi entzima horiek EST datubase (ingelesezko *expressed sequence tag*) batean *bacterial type II cytosine-5 methyltransferase*-ren sekuentzia erabiliz eginiko bilaketa baten bidez identifikatu ziren lehendabizikoz, eta 5. irudian behatu dezakegunez, biek antzeko egitura aurkezten dute. Bi entzima horien C- muturreko domeinu katalitikoak, DNMT1 entzimarekin batera, antzekotasun zorrotza aurkezten dute (bereizgarriak diren 6 guneak partekatzen dituzte); DNMT entzima katalitikoaren domeinu karakteristikoak bere horretan kontserbaturik mantentzeak aktibitate katalitikoak burutzeko gaitasuna ematen die. N- muturrari dagokionez, ordea, ez dute zerikusirik DNMT1 proteinarekin (Okano, Xie & Li, 1998), eta biek domeinu berdinak aurkezten dituzte. Domeinu horiek, kromatinara elkartzeko klabeak diren bi gune kontserbatu dira: lehendabizikoa ADD (*ATRX-DNMT3-DNMT3L*) domeinua eta bigarrena PWWP domeinua (ingelesezko *proline-tryptophan-tryptophan-proline*). Azken sekuentzia hori beharrezkoa da entzima bera heterokromatinara bideratzeko eta H3K36me3 marka epigenetikora lotzeko (ingelesezko *trimethylated lysine 36 of histone H3*). ADD domeinuak, bi *C4-type zinc finger*-rez osaturik dagoena (*GATA binding protein 1* (GATA1) eta *plant homeodomain* (PHD)-*type*), H3 histonaren isatsarekin erreakzionatzeko gaitasuna du modifikatu gabe dagoen 4. Lisinarekin (H3K4) (Ooi et al., 2007; Otani et al., 2009). Azterketa estrukturalak frogatu dutenez, DNMT3A entzimaren ADD domeinuak bere gune katalitikoan eragiteko gaitasuna du, eta hori gertatzen denean DNAREN lotzeko duen afinitatea oztopatua geratzen da, auto-inhibitze prozesu bat bultzatuz. Hortaz, eraldatu gabe dagoen H3 histonaren isatsak, ADD domeinuaren eta domeinu katalitikoaren arteko elkarrekintza oztopatu eta DNMT3A proteinaren

aktibazioa bultzatzen du (Guo et al., 2015). Aurkikuntza guzti horiek, DNMT3A eta DNMT3B proteinak marka epigenetiko jakinak irakurtzeko eta interpretatzeko gai direla erakusten dute, horien aktibitatea eta espezifikotasuna arautuz.

DNMT3A/B-DNMT3L *de novo* metilazio konplexu gidaria:

DNMT3A eta DNMT3B entzimen kasuan, ere, beharrezkoa da *de novo* metilazio funtzioa optimizatuko duen elkarketa bat. Haien funtzionamendu egokia bideratuko duen proteina familia bereko beste kide bat da: DNMT3L entzima. Katalitikoki aktiboa ez den arren (ez du metiltransferasa aktibitaterik), funtsezkoa da bere familiako beste bi kide horien aktibitate katalitikoaren emendatzeko (Hata et al., 1993).

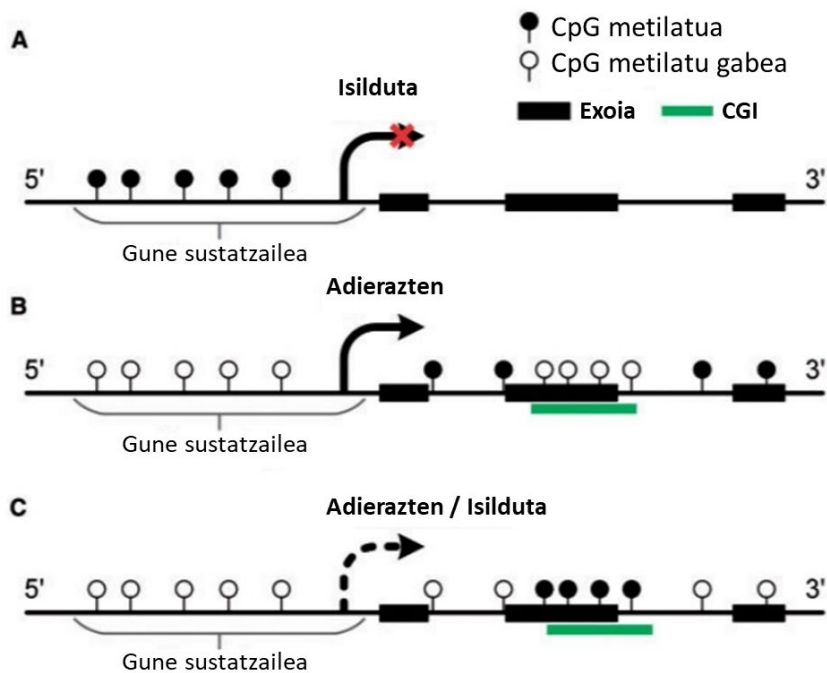
DNMT3L entzima, sekuentzien datu base batean buruturiko analisien bidez identifikatu zen lehenengo aldiz, bere familia kideekin alderatuz luzera laburragoa du, eta domeinuei dagokionez ez da guztiz berdina (5. irudia). Familia kide batzuen antzera, N- muturreko gune erregulatzailan ADD domeinua aurkezten du, baina PWWP domeinurik ez du. C- muturrari dagokionez, aldiz, gainerako DNMTekin sekuentzia homologia bat erakusten badu ere, aktibitate katalitikorako beharrezkoak dituen aminoazido sekuentzia batzuk falta ditu, horien artean metilo taldearen emaitza den AdoMet molekularekin elkartzeko sekuentziak (IX eta X guneak (5. irudia)) (Chen & Li, 2004; Jeltsch & Jurkowska, 2016). C- muturreko domeinu horiek, DNMT3Aren aktibitate katalitikoan eragiteko gaitasuna ematen diote proteinari, entzima katalitikoaren aktibitatea nabarmenki emendatuz. Gainera, DNMT3A/3L dimeroa hori eratzen denean beste dimero berdin batekin elkartzeko joera edukitzen du (DNMT3A-DNMT3A), bi gune aktibo dituen tetrameroa eratuz (Jia et al., 2002). ADD domeinuak, ostera, H3 histonaren isatseko 4. lisina modifikatu gabea (H3K4) identifikatu, eta histonara elkartzeko gaitasuna ematen dio konplexuari. Bi ebidentzia horiek, agerian uzten dute konplexu horren eraketak DNMT3 entzimen *de novo* metilazioan burutzen duen ekarpena, espezifikotasunaren eta aktibitatearen emendioa ekarriz (Ooi et al., 2007).

1.1.2.4. DNAREN metilazioa eta transkripzioa

DNAREN metilazioak funtzio garrantzitsua betetzen du zelulen transkripzioan edo geneen adierazpenaren kontrolean. DNAREN metilazioa transkripzioaren errepresioarekin lotu izan bada ere, hori ez da guztiz egia. Izan ere, metilazioak duen eragina metilazioa ematen den gunearen arabera da, horrek dituen ondorio transkripzionala erabat ezberdinak

direlarik. Horrenbestez, atal honetan transkripzioaren eta marka epigenetiko horren artean dagoen erlazioaren inguruan hitz egingo dugu.

DNAren metilazioa, hein handi batean, transkripzioaren errepresioarekin lotzen da. Hala ere, erlazio hori orain arte burutu diren ikerketa gehienak arreta-zentroa geneen gune sustatzaileetan eta transkripzioaren hasiera puntuetan jarri dutelako izan da. CGI eremu horiek interes berezia piztu zuten; izan ere, CGI eremuetariko asko gune horiekin bat datozela behatu zen. Ugaztunotan, geneen %60-70ak CGI guneak izaten dituzte transkripzioaren hasiera puntuetan, eta horrez gain, konstitutiboki aktiboak diren gene gehienek (ingelesezko *housekeeping genes*) eta ehun espezifikoetara mugaturiko geneen %40en gune sustatzaileetan ere CGI eremuak topatzen dira (Gardiner-Garden eta Frommer, 1987; Lander et al., 2001; Illingworth eta Bird, 2009). CGI gune horiek, aurretik aipatu bezala, ez dira metilaturik aurkitzen oro har, eta hori transkripzioaren kontrolarekin erlazionatua dago. Frogatu denez, CGItan dauden zitosinak metilatuak direnean genearen isiltze egonkorra ematen da, denbora luze iraunez. Hortaz, isiltze iraunkor bat behar duten geneetan gertatzen den prozesua da hori: hozi zelulen garapenera mugaturik dauden gene-azpimultzo batzuen sustatzaileetara, eta zelula emeen kasuan X kromosoma ez-aktibora, esaterako (Maatouk et al., 2006; Mohn et al., 2008; Borgel et al., 2010; Sharp et al., 2011). Geneen aldi baterako isiltzea lortu nahi denean, berriz, kromatinaren trinkotzea ekartzen duen histonaren modifikazioa bat egoten da presente, H3K27me3 eraldaketa; PRC1 eta PRC2 (ingelesezko *Polycomb Repressive complex 1-2*) bezala ezagutzen diren konplexuen bidez ezartzen den marka errepresorea (Mikkelsen et al., 2007; Ku et al., 2008), eta horrek genearen isiltzea edo errepresio puntuala gauzatzen du. Bi konplexu horiek *polycomb* taldeko proteinen (ingelesezko *polycomb-group proteins*; PcG) bidez osatuak egoten dira, eta ezinbestekoak dira prozesu biologiko askotarako; geneen erregulazioa arautzen dute.



1.6. irudia. DNAREN metilazioa eta geneen adierazpenaren arteko korrelazioa. **(A)** Metilazioa gune sustatzaileetan ematen denean genearen adierazpena isilduta agertzen da. **(B)** Metilazioa genearen gorputz barnean CGI guneak ez diren CpG-etan ematen denean genearen adierazpena ematen da. **(C)** Geneen gorputz barneko CGI-etan ematen denean metilazioa, horren adierazpena aktibatua edo itzalita egon daiteke (Irudi moldatua; Yang et al., 2016).

Hortaz, DNAREN metilazioa geneen gune sustatzaileetan eta transkripzioaren hasiera puntuetan ematen denean transkripzioa oztopatua geratzen da, CGIei lotuta egon ala ez (1.6.A irudia); saiakuntza ugari baietzatu dute gertaera hori. Genearen gorputz barnean ematen den DNAREN metilazioak transkripzioan duen eraginaren inguruan ez da hainbeste ezagutzen, edozein kasutan ezinbestekoa da ea eraldaketa hori CGI guneetan edo gune horietatik kanpo ematen den kontuan hartzea. Geneen gorputzari dagokionez, orokorrean honako ezaugarriak konpartitzen dituzte: pobreak dira CpG dinukleotidoetan, dauden CpG dinukleotidoak metilaturik aurkitzen dira nagusiki, aberatsak izaten dira sekuentzia errepikakor eta TEetan eta CGI eremuei dagokionez, ohikoak izaten dira bai geneen gorputzaren barnean eta bai *gene deserts* eremuetan ere (gune sustatzaileetan gertatzen den antzera) (Jones, 1999). *Gene deserts* eremu hauek, proteina-kodeketarik gabeko eskualde edo sekuentzia luzeak dira eta orokorrean ez dute inongo funtzio biologiko nabarmenik (Venter et al., 2001). CGI eremuek geneen gorputzaren barnean bete dezaketen funtzio zehatza ez da guztiz ezagutzen; geneen adierazpena bultzatu eta oztopatu dezake, eta hori kasuaren arabera da (1.6.C irudia) (Varley et al., 2013; Yang

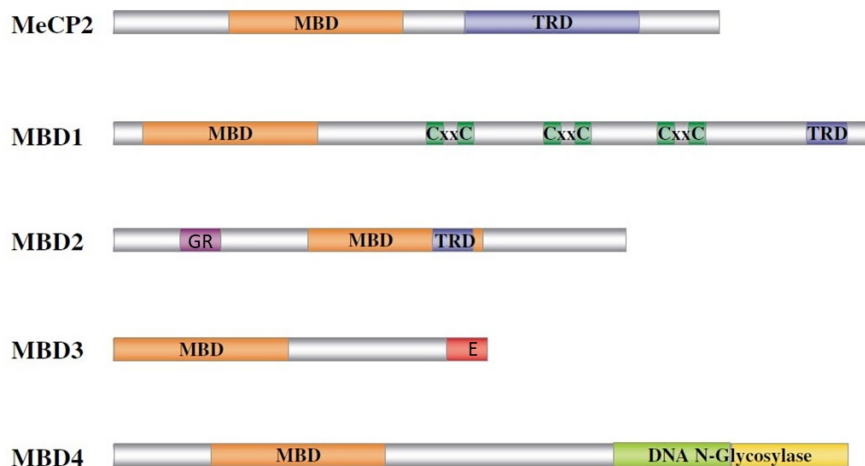
et al., 2015). Geneen gorputzean zehar topatzen diren CpG dinukleotido solteen metilazioa, berriz, gene transkribatuen ezaugarritzat jo izan da aspalditik (1.6.B irudia), beti ere gene sustatzailea metilatu gabe topatzen bada noski (Wolf et al., 1984).

Gune sustatzaileetan ematen den DNAREN metilazioak transkripzio prozesua oztopatzen duela frogatu bada ere, prozesu horretan ematen den mekanismo zehatza ezezaguna da. Mekanismo hori argitzeko helburuarekin ikerketa ugari burutu dira, hipotesi ezberdinak azaleratuz: Lehenengoaren arabera, DNAREN metilazioak gune sustatzaileetara espezifiko batzen diren transkripzio faktoreen lotura eragozten du (Campanero, Armstrong & Flemington, 2000; Tate & Bird, 1993). Bigarrenenak, berriz, DNAREN metilazioak nukleosomaren antolaketa aldatu dezakeela dio, transkripzio makineriaren funtzioa oztopatuz (Kass, Pruss & Wolffe, 1997). Azkenik, hirugarrenak transkripzio prozesuan eragin negatiboak dituzten faktore espezifiko batzuk erakartzen dituela dio, geneen isilpena bultzatuz (Lewis et al., 1992; Lopez-Serra & Esteller, 2008).

1.1.2.4.1. DNAREN metilazio konplexu laguntzaileak: MBDak

DNA metilatuaren ezabaketa prozesua erraza da oso demetilazio lanetaz arduratzen diren entzimentzat, horregatik marka epigenetiko hori mantentzeko mekanismo ezberdinen beharra dago. Zitosina metilatuak babesteaz arduratzen diren mekanismo ezberdinak badaude ere, helburu hori duen proteina familia garrantzitsuenetariko bat MBD entzimen familia da. Hortaz, hurrengo atal honetan metilazioaren mantentze lanetan laguntzaileak diren proteina horietaz hitz egingo dugu.

MBD bezala ezagutzen den proteina familiak (ingelesezko *methyl-CpG-binding domain*; MBD) izugarritzko garrantzia du DNA metilatuaren mantentzean, eta, ondorioz, baita geneen isiltze mekanismoan ere. MBD proteinek CpG dinukleotido metilatueta lotzeko gaitasuna dute, eta horien izena elkarrekintza horretatik dator: 1.7. irudian ikusi dezakegunez, familiako proteina guztiek elkarrekintza hori baimentzen duen domeinua (MBD) partekatzen dute, eta bertako kide nagusiak hauek dira: MBD1, MBD2, MBD4 eta MECP2 (ingelesezko *methyl CpG binding protein 2*) (Hendrich & Bird, 1998). Familia horretako beste kide bat, MBD3 proteina, MBD2 proteinarekiko oso antzekoa da aminoazido sekuentzietan dagokionez, baina ez du 5mC-rekin elkartzeko gaitasuna (Hendrich & Bird, 1998; Zhang et al., 1999). Entzima bakoitzak bere funtzio espezifikoa du, eta espezifikotasun hori norberak dituen bestelako domeinuen bidez eskuratzen dituzte. Modu orokor batean, proteina horiek DNA metilatuaren mantentze lanetan paper garrantzitsua jokatzen dutela esan daiteke.



1.7. irudia. MBD proteina familiako kide nagusiak eta beraien egiturak. Proteina hauek honako hauek dira: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 eta MBD4. Denean arteko homologia puntua MBD domeinua da, gainerakoan, bakoitzak bere domeinu bereizgarriak ditu eta domeinu horiek ematen die beraien funtzio karakteristikoa (Irudi moldatua; Fatemi & Wade, 2006).

MBD1, MBD2 eta MECP2 proteinak oso aztertuak izan dira, eta horiek histona deazetilasa (HDAC) dituzten errepresore konplexuekin edo kromatina eraldatzen dituzten bestelako entzimekin erlazionatu dira (Bogdanovic & Veenstra, 2009). Hortaz, DNAREN metilazioaren eta histonetako eraldaketen eragile eta transkripzioaren erregulatzaile nagusitzat hartzen dira, inongo zalantzarik gabe. Hala ere, horien artean ezberdintasun ugari daude.

Lehenengo aldiz deskribatua izan zen MBD proteina MeCP2 izan zen, eta bertan, SIN3A proteinarekin burutzen duen elkarrekintza aztertu zuten (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). SIN3A proteina I. motako HDAC-en (ingelesezko *histone deacetylase*) konplexu errepresore bateko entzima da. MeCP2 proteinak paper garrantzitsua jokatzen du DNAREN metilazioaren eta konplexu errepresiboaren arteko elkarrekintzan (Lyst et al., 2013). MeCP2 proteina, esaterako, sekuentzia berdina identifika baditu ere, preferentzia handiago bat aurkezten du A / T baseetan aberatsak diren gunetako CpG dinukleotidoetara lotzeko (Klose et al., 2005). MBD1 proteinak, berriz, DNARI lotzeko beste modulu bat aurkezten du, CXXC domeinua, eta, horren bidez, metilatu gabeko DNARI lotzeko gaitasuna izaten du (Jørgensen et al., 2004). MBD1en funtzio proteikoari dagokionez, histonen metiltransferasak diren entzimekin elkarrekintzan aritzen da: Suv39h1 eta SETDB1 proteinekin, bereziki. Proteina horiek H3K9 histonaren hondakin ezberdinak metilatzen dituzte, eta HP1 proteina heterokromatikoarekin lotzeko gaitasuna

izaten dute (Fujita et al., 2003; Sarraf & Stancheva, 2004). MBD2 eta MBD3 proteinak NuRD (ingelesezko *Nucleosome remodelling and deacetylase*; NuRD) konplexuen partaideak dira (Wade et al., 1999; Zhang et al., 1999; Saito & Ishikawa, 2002). MBD2 proteinak MeCP2 proteinaren antzera jokatzen du; metilatutako DNARI lotzen zaio, eta transkripzioa erreprimitzen du (Ng et al., 1999).

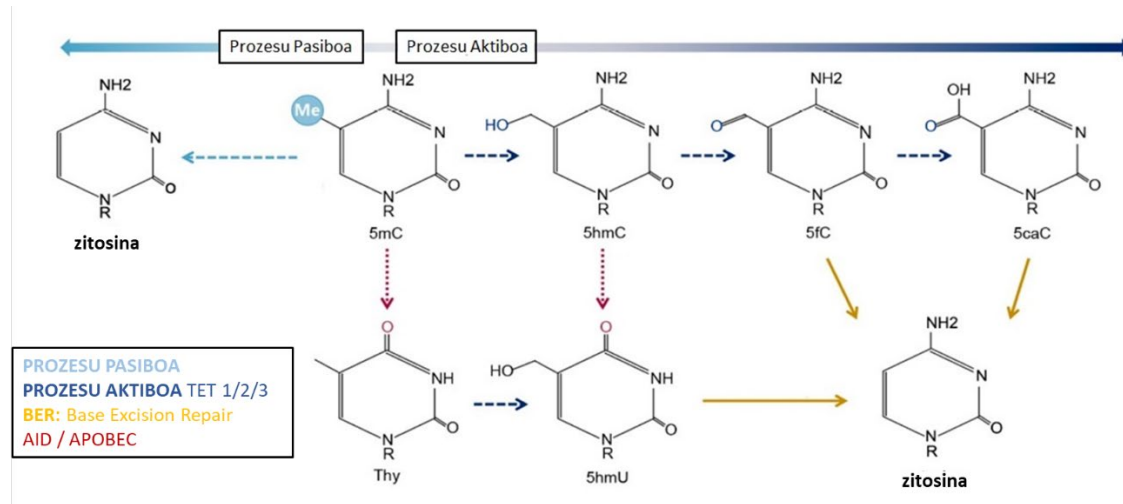
Amaitzeko, MBD4 proteina DNAREN konponketa lanetan burutzen duen zereginaren inguruan aztertu da gehien bat; erregulazio transkripzionalean burutzen duen funtzioari dagokionez gutxi ezagutzen da. MBD4 timina glikosilasa bat da (ingelesezko *Thymine glycosilase*; TDG), eta horrek TpG/mCpG desdoikuntzetara lotzeko lehentasuna izaten du *in vitro*. Desoreka horiek 5-mC nukleobaseen desaminaziotik sortzen dira, eta bere horretan uzten bada arazo handia bilakatu daiteke; C-T trantsizioaren bidez mutazioak ager daitezke. Beraz, MBD4 proteinak CpG metilatueta gertatzen diren mutazioak minimizatzen ditu lotzeko izaten duen espezifikotasunaren eta duen aktibitate entzimatiakoaren bidez (Hendrich et al., 1999; Millar et al., 2002).

1.1.3. DNAREN metilazioa

DNAREN demetilazioa, DNA kateko zitosina metilatuek (5-mC) duten metilo taldearen ezabapena edo desagertzea da, metilatu gabe dagoen zitosina berreskuratuz (5-C); hau da, DNA kateko zisteina hondarretako metilo taldea ezabatzeko prozesua da. Hortaz, DNAREN metilazioa nagusiki transkripzioaren erpresioarekin erlazionatzen denez, DNAREN demetilazio prozesua geneen adierazpenaren aktibazioarekin lotua dago (Aoki et al., 1997; Han et al., 2011). Demetilazio prozesu horretaz hitz egiten dugun bakoitzean bi prozesu nagusi desberdin ditzakegu: alde batetik, erreplikazio prozesuaren menpekotasuna den metilazioaren diluzio "pasiboa" dago, eta bestetik, erreplikazioarekiko askea den eta entzima ezberdinen parte hartzea izaten duen demetilazio "aktiboa" (Zhao & Chen, 2013; Wu & Zhang, 2014).

DNAREN demetilazio prozesua DNAREN erreplikazioan zehar eman daiteke DNMT1 entzimaren jarduerarik ez dagoenean. Izan ere, erreplikazioan sortzen diren harizpi berri guztiak metilatu gabe sintetizatzen dira, lehenengo zikloa batean hemimetilaturiko bi DNA kate sortzen direlarik; metilatuta dagoen harizpi bat eta metilatu gabe dagoen beste harizpi bat dituzten bi DNA kate. DNMT1 metilasak ez badu harizpi horien metilaziorik gauzatzen, DNA kateak bere horretan geratuko dira eta hurrengo erreplikazioetan zehar,

harizpi metilatuak diluituz joango dira. Prozesu horri “demetilazio pasiboa” deitzen zaio (Chen eta Riggs, 2011).



1.8. irudia. DNAREN demetilazio prozesu pasibo eta aktiboak. DNAREN demetilazio prozesu aktiboan TET proteinen aktibitatea ezinbestekoa da. Entzima horiek, zitosina metilatuak (5mC) oxidatzen dituzte, eta prozesu horretako lehenengo bitartekaria hidroximetilzitosina hondarra (5hmC) da, eta horren ondoren, 5fC eta 5caC hondarrak. Metilo talde horren degradazioa 3 TET proteinek burutu dezakete, baina ez da prozesu jarraitua. Behin 5fC eta 5caC hondarrak eratzten direnean TDG-aren menpekoea den *Base Excision Repair* (BER) bidez, eraldatu gabeko zitosina hutsa berrezartzen da. DNAREN demetilazio pasiboan, berriz, zitosina metilatuak diluzioa ematen da erreplikazio ziklo ezbederdinetan zehar, DNMT entzimen aktibitate absentiaren ondorioz (Irudi moldatua; Jang et al., 2017).

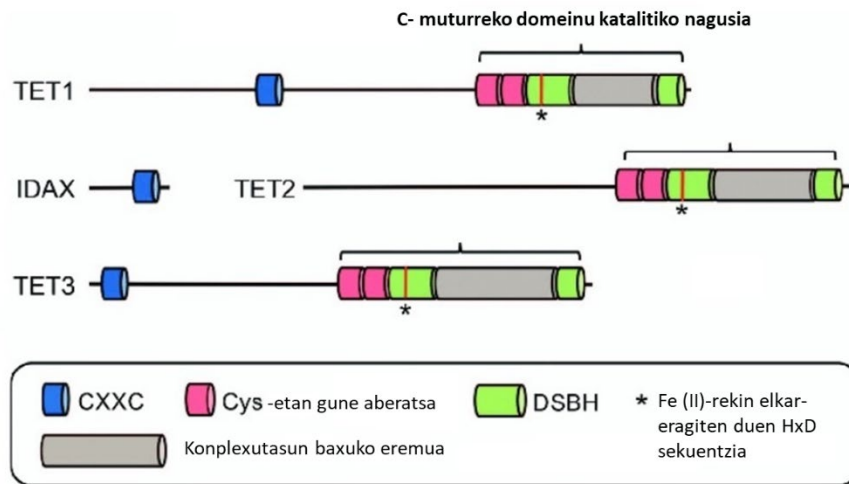
Azken hamarkadetan, DNAREN demetilazioa eragiten duen bestelako prozesu bat identifikatu da, eta prozesu hori zuzenean jardura entzimatikoki lotuta dago. Aurkikuntza hori, ugaztunetan topatutako 5-hidroximetilzitosina (5hmC) hondarrarekin hasi zen (Kriaucionis eta Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009). 5hmC hondar kimikoa *Ten-Eleven Translocation* (TET) proteinen familiako kideen bidez eratzten den eta demetilazio prozesu aktiboaren adierazgarria den marka epigenetikoa da. Ugaztunetan hiru TET entzima topatu dira (TET1-3) eta 1.8. irudian ikus dezakegunez, zitosina metilatuak (5mC) zitosina hidroximetilatuetara (5hmC) oxidatzeaz arduratzen dira, eta ondoren, 5hmC hondar horiek 5-formilzitosinara (5fC) eta 5-karboxilzitosinara (5caC) oxidatuak izan daitezke (Iyer et al., 2009; Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2011). Oxidazio guzti horien eragileak TET entzimak dira, eta CpG dinukleotido metilatuak ematen da nagusiki. Horren ondoren, hondar oxidatu horiek TDG (ingelesezko *Thymidine DNA Glycosylase*) bidezko *base-excision repair* (BER) prozesuaren laguntzaz eraldaketarik gabeko zitosina hondarrarengatik ordezkatzen dira “demetilazio aktiboa” amaituz (Maiti eta Drohat,

2011; Zhang et al. 2012). BER prozesua oso ohikoa da zeluletan, eta bere helburu nagusia ziklo zelularrean zehar DNA kaltetua denean haren konponketa gauzatzea da, kate helikoidala desitxuratu gabe. Baseen lesio txiki horiek desaminazio, oxidazio edota metilazio prozesuetatik eratortzen dira, oro har (Lindahl, 1993).

1.1.3.1. Ten-Eleven Translocation proteinak edo TET-ak

Demetilazio prozesu aktiboa gauzatzen duten entzimak TET proteina familiako kideak dira (ingelesezko *the ten-eleven translocation*): TET1, TET2 eta TET3 entzimak, eta horiek *iron (II)/ α ketoglutarate*-ren (Fe(II)/ α -KG) menpekoak diren dioxigenasak dira (1.9. irudia). C-muturreko domeinu katalitiko nagusia, *double-stranded β helix* (DSBH) domeinuaz eta zisteinetan aberatsa den domeinuaz osatua dago (Pastor, Aravind & Rao, 2013), eta zisteinetan aberatsa den domeinuak elkarrekintza horren estabilizazioa du helburu nagusia. Luzera osoko TET1 eta TET3 proteinek, TET2 proteinan gertatzen ez den bezala, CXXC domeinua aurkezten dute amino muturrean; TET2 entzimak eboluzioan zehar galdu zuen jasandako alderantzizkatze kromosomiko baten ondorioz, eta alboko gene batera mugitu zen, *Idax* genera, zehazki (CXX4 moduan ere ezaguna) (Iyer et al., 2009; Tahiliani et al., 2009; Long, Blackledge & Klose, 2013). TET proteinen CXXC domeinua bi *Cys4-type zinc finger motif*-ez osatua dago, kontserbazio maila oso altua du, eta metilatutako CpG sekuentzietara bideratzeaz arduratzen da (Ko et al., 2013; Zhang et al., 2010; Xu et al., 2012). DBSH domeinuaren eta zitosina metilatuaren arteko elkarrekintzak Fe(II)/ α -KG bidezko substratuaren (zisteina metilatu) oxidazioa ekartzen du, interakzio horren produktuak hauek direlarik: 5-hidroximetilzitosina (5hmC), 5-formilzitosina (5fC) eta 5-karboxilzitosina (5caC) hondarrak (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010; Ito et al., 2011; He et al., 2011). Hondar horiek (5hmC, 5fC eta 5caC) DNAREN demetilazio prozesuko molekula bitartekariak dira (Zhao & Chen, 2013; Wu & Zhang, 2014), eta orden horretan sortzen dira. Hala ere, ez da prozesu jarraitua (Tamanaha et al., 2016), eta preferentzia dute substratuari dagokionez. *In vitro* burututako ikerketek frogatu dutenez, TET proteinek lehenetsun handiagoa dute 5mC hondarrak oxidatzeko, 5hmC eta 5fC hondarren alloan (Ito et al., 2011; Hu et al., 2015; Hashimoto et al., 2014). mESC zeluletan, esaterako, TET entzimek 5mC hondarren %10 inguru oxidatzen dituzte, eta 5hmC hondarren kasuan, aldiz, %1a soilik oxidatzen da 5fC edota 5caC hondarretara. Hau da, oxidazio maila igotzen den heinean TET entzimek duten prozesibitatearen gaitasuna jaitsiz doa. Ondorioz, 5hmC hondarrek 10 edo 100 aldiz presentzia handiago izaten dute mESCtan (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2011; Wu & Zhang, 2015; Pfaffeneder et al., 2011; Booth et al., 2014). Hala ere, TDG/BER bidezko demetilazio aktiboa 5fC eta 5caC hondarretatik ematen da, eta ez

5hmC hondarretatik. Beraz, ez da hain harrizkoa azken bi produktu horien kopuruak hain baxuak ez izatea zelula barnean (An et al., 2017).



1.9. irudia. TET proteinen egitura. C- muturreko eremu katalitiko oso kontserbatuta dago TET familiako kide guztien artean, eta hori DSBH domeinuaz eta zisteinetan (Cys) aberatsa den domeinuaz osatuta dago. Cys-en eremu aberatsa bi azpidomeinuk osatzen dute, eta TET proteinek kromatinarantz bideratzea du helburu. DSBH domeinuan funtsezko sekuentzia katalitikoak daude, HxD sekuentzia barne; Fe (II) eta 2OG-rekin elkar-eragiten du. Konplexutasun baxuko eremu bat ere aurkitzen da eremu katalitikoan, baina haren funtzioa oraindik ez da definitu (Irudi moldatua; An, Rao & Ko, 2017).

1.1.4. DNAREN METILAZIOAREN ETA DEMETILAZIOAREN GARRANTZIA PROZESU FISIOLGICOETAN

Zelula orok DNAREN metilazio patroian aldaketa espezifikoak jasaten dituzte lokus jakinetan, eta prozesu biologiko ezberdinekin erlazionatu dira: bereizketa prozesua, pluripotentiaren garapena eta mantenua, eta gaixotasunen progresioa, besteak beste. Prozesu zelular eta fisiologiko horiek guztiz koordinaturik dauden metilazio/demetilazio prozesuen bidez gauzatzen dira, eta, horrenbestez, bertan parte hartzen duten DNMT, MBD eta TET proteinen familiek funtzio gakoak betetzen dituzte.

Lehenik eta behin, DNAREN metilazioak bereizketa prozesuan duen garrantziaz hitz egingo dugu. Bereizketa-prozesuan, bai metilazio eta bai demetilazio prozesuek izugarriko garrantzia dute. Esperimentu ezberdinek frogatu dutenez, ESC eta zelula somatikoan

artean ez dago DNAREN metilazio-maila globalei dagokionez ez dago uste bezain besteko aldaketa nabarmenik. Horren ordez, metilazio patroia aldatzen duen metilo hondarren birbanaketa prozesu bat ematen da genoma osoan zehar: pluripotenzia geneak piztuta eta ehun espezializatuetako geneak isilduta egotetik, pluripotenzia geneak isilduta eta ehun espezializatuetako geneak piztuta egotera iragaten dira (Meissner et al., 2008; Mohn et al., 2008; Biniszkiwicz et al., 2002). DNAREN metilazioak bereizketa prozesu horretan burutzen duen funtzioa gakoa da; katalitikoki aktiboak diren DNMT proteinetan (DNMT1/3A/3B) urriak diren ESC zelulek, diferentziatzeko gaitasuna bereziki kaltetua izaten dute (Jackson et al., 2004), MBD proteinen faltak eragiten duen modu berean (Carlone et al., 2005). Hortaz, DNMT eta MBD proteinak, TET proteinekin batera, ezinbestekoak dira diferentziazio prozesua ahalbidetzen dituzten sare transkripzionalak bideratzeko.

Bigarrenik, DNAREN metilazioaren eta pluripotenziaren arteko erlazioaz hitz egingo dugu. Pluripotenziaz hitz egiten dugunean, desberdintzapen prozesuan gertatzen den modu berean, metilazio eta demetilazio prozesuen garrantzia oso handia da. Ehunetako espezifikokoak diren geneen adierazpena guztiz inhibitua mantentzeko DNMT-ek betetzen duten papera oso garrantzitsua da, izan ere, gene hauen gune sustatzaileak hipermetilaturik egotea ezinbestekoa da; DNMT-en TKO (ingelesezko *triple knockout*) diren mESC zeluletan gainadierazita topatzen diren gene gehienak ehunetako gene espezifikokoak izaten dira (Fouse et al., 2008). Horrez gain, katalitikoki aktiboak diren DNMT proteinetan (DNMT1/3A/3B) urriak diren ESC zelulek, ugaltzeko eta bizirauteko gaitasuna mantentzen duten arren, pluripotenzia mantentzeko gaitasuna kaltetua izaten dute (Tucker et al., 1996; Tsumura et al., 2006). TET entzimek prozesu honetan jokatzeko duten papera ere ezinbestekoa da; pluripotenzia mantentzeko, beharrezkoa da zenbait geneen isilpena aktiboki babestea *de novo* metilazio prozesutik, horregatik DNAREN demetilazio aktiboa gakoa da, besteak beste *Oct4* bezalako genearen adierazpena mantentzeko. *Oct4* (ingelesezko *octamer-binding transcription factor 4*) genea, zelulen pluripotenziari eusteko transkripzio faktore kritikoenetako bat da. ESC zelulek esaterako, aktiboki babestua mantentzen dute metilaziotik eta diferentziatzen direnean, metilatua egotera iragaten da. Zelulen egoera hipometilatu globala ere, egoera pluripotentearen berreskurapenarekin erlazionatzen da, ugaztunon bizi zikloan zehar esaterako, metilazio patroia bi ezabatzealdi orokor ematen dira eta honako gertaera hauek, informazio epigenetikoaren galera eta ama zelulen izaera pluripotentearen berreskurapena ekartzen dute. Prozesu honetan, TET entzimek burutzen duten demetilazio prozesu aktiboki ezinbesteko papera jokatzeko du (Leitch et al., 2013; Smith et al., 2012; Iurlaro et al., 2017; Hajkova et al., 2002; Feng et al., 2010a).

Amaitzeko, DNAREN metilazioak goixatasunen progresioarekin duen erlazioaz hitz egingo dugu. DNAREN metilazio patroia aberrante edo zentzugabea minbiziaren zigilu bereizgarria da eta bi egoera hauen arteko erlazio hau, ikerketa mordoei baiezta ahal izan dute. Patroi zentzugabe edo aberrante honen eraketan TET entzimek zerikusi handia dute kasu gehienetan; TET entzimen funtzionalitatea aldatzen dituzten faktoreek desorekak eragiten dituzte DNAREN metilazio patroian, kartzinogenesi prozesuak sortuz (Baylin & Jones, 2011; Wu & Zhang, 2011a; Cimmino et al., 2011; Esteller, 2007). TET proteinek minbizi prozesuetan betetzen duten paper garrantzitsua identifikatzen lehenengo kasua AML (ingelesezko *acute myeloid leukemia*) pazienteetan izan zen (Tefferi et al., 2009). Bertan ematen den translokazio prozesu batek Tet1 genearen transkripzioa nabarmenki handitzen du, genomako 5hmC mailak handituz eta gainera, bestelako geneen aktibazioen bidez zelulen ugaltzea sustatzen da, leuzemia eraginez (Huang et al., 2013). Hortaz, minbizi prozesu asko 5hmC mailetan desorekak eragiten dituzten arrazoi ezberdinengatik ematen dira: Mutazioak TET geneen sekuentzian, TET geneen gune sustatzailearen hipermetilazioa eta horrenbestez adierazpenaren etetea (Rawluszko-Wieczorek et al., 2015; Chim et al., 2010; Kim et al., 2011; Musialik et al., 2014) edota TET proteinen erregulazio post-transkripzionala; miRNA-en bidez bideratutako erregulazioa esaterako (Cheng et al., 2013; Fu et al., 2013; Morita et al., 2013; Song et al., 2013b,c). Guzti honek, zelulek identitate zelularra galtzea eta ondorioz, minbizi zelulen garapena bultzatzen du. Hau guztia kontuan hartuta, hau da TET proteinek prozesu honetan duten garrantzia ikusirik, azken urteetan interes berezia ipini da proteina hauetan, gene diana bihurtu direlarik minbizi ezberdinen aurkako ikerketa lanetan.

1.2. Memoria epigenetiko

Denboran zehar epigenetikak araututako geneen adierazpena mantentzeko zelulek oroimen bat bultzatzen dute mekanismo ezberdinen bidez, eta gertaera horien multzoak memoria epigenetikoak eratzten dute. Hau da, memoria epigenetikoak zelula batek duen patroia epigenetikoak bere horretan iragatea edo irautea ahalbidetzen du, zelulek dituzten adierazpen transkripzional eta prozesu zelularrak berdina izanik denbora iragan ahala. Horretarako, ezinbestekoak dira gune horiek aktiboki babestuko dituzten makineria proteikoak; zelulek marka epigenetikoak denboran zehar mantentzen dituzte nahiz eta faktore eragileak edo kanpo faktoreak presente ez egon (Daxinger & Whitelaw, 2010; Riggs, 1996).

Nagusiki bi memoria epigenetiko mota bereiz ditzakegu: alde batetik memoria epigenetiko zelularra, eta bestetik, belaunaldiz belaunaldiko memoria. Memoria epigenetiko zelularrean, marka epigenetikoak zelula ametatik alabetara pasatzen dira mitosi prozesua gaindituz, eta bertan zatiketa zelularreko oroitzapena bermatzen da (Chen & Dent, 2014; Becker & Weigel, 2012). Zelula batetik bestera patroia epigenetiko berdina pasaraziz, zelulek euren identitatea mantentzen dute, eta, ondorioz, euren patua jarraitu dezakete (Reik, 2007; Simon, 1995). Belaunaldiz belaunaldiko memoria epigenetikoan, aldiz, informazio epigenetikoaren herentzia ondorengo belaunaldietara ematen da, gurasoetatik seme-alabetara, eta horretarako beharrezkoa da marka epigenetiko horiek meiosi prozesua gainditzea (Dean, Santos & Reik, 2003). Bi prozesu ezberdin horietan material genetikoak nola banatzen den asko ikertu bada ere, marka epigenetikoekin zer gertatzen den ez dago batere garbi. Edozein kasutan, prozesu erabat ezberdinak dira, eta, ondorioz, bakoitzean ematen diren gertaerak eta parte-hartzaileak guztiz ezberdinak dira.

1.2.1. MEMORIA EPIGENETIKO ZELULARRA

Memoria epigenetiko zelularra, zelulen arteko ohiko zatiketa mitotikoa ematen denean bermatzen den marka epigenetikoaren herentzia da. Organismo bereko zelulak pixkanaka-pixkanaka zatituz eta ezberdinduz joaten dira, eta zelula multzo bakoitzak euren bereizgarriak diren marka epigenetikoak eskuratzen dituzte, zelula diferentziatuen patroia epigenetikoak definituz (Ng & Gurdon, 2008). Hala ere, horretarako beharrezkoa da

jarraipen bat egotea, eta jarraipen hori ziurtatzen duen mekanismo epigenetiko nagusia memoria epigenetiko zelularra da, horrek baimenduko du patroia horren herentzia egokia (Alberts et al., 2003).

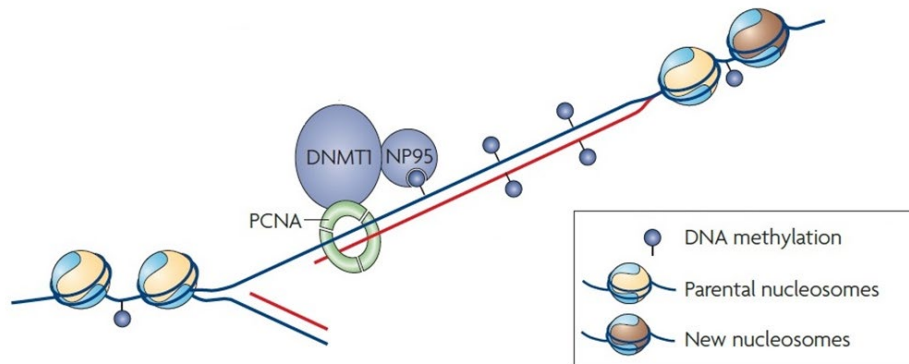
1.2.1.1. DNAREN metilazioak eragindako memoria epigenetiko zelularra

DNAREN metilazioa marka epigenetiko egonkorra da eta zehaztasun handiarekin heredatu daiteke, eta horrek memoria epigenetiko zelularrean parte hartzen duen marka epigenetiko nagusienetarikoa bat izatea eragiten du. Hala ere, sortuko diren bi zelula alabetara iragateko ezinbestekoa da erreplikazio prozesua gainditzea. Prozesu hori bermatzen duena, hein handi batean, erreplikazio prozesuan harizpi hemimetilatua metilatzeaz arduratzen den DNMT1 entzimaren da, haren entzima laguntzaileek ematen dioten efizientzia oso altua da eta (Probst et al., 2009). Edonola ere, DNAREN eta metilo taldeen arteko lotura kobalenteak ere zerikusi handia du (Dolinoy et al., 2006).

Erreplikazioan jatorrizko DNA katea osatzen dituzten harizpiak banandu egiten dira, eta harizpi bakoitza molde moduan erabiliz bi DNA kate eratzen dira, eta horrek informazio genetiko bikoiztea eragiten du. Jatorrizko harizpietan metila hondarrak mantentzen badira ere, harizpi berriak biluzik aurkitzen dira metilo taldeei dagokionez, eta horiei DNA kate hemimetilatuak deritzogu. DNAREN metilazio patroia mantentzeaz arduratzen den DNMT1 entzimak erreplikazio urkilan gauzatzen ditu metilazioak, DNA kate berriak sortzen doazen heinean. Prozesu hori, kate hemimetilatuetara lotzeko duen afinitateak (Bestor & Ingram, 1983; Hermann, Goyal & Jeltsch, 2004) eta PCNAarekin (ingelesezko *Proliferating cell nuclear antigen*) burutzen dituen interakzioek (Chuang et al., 1997) bultzatzen dute (1.10. Irudia). DNMT1 entzimari efizientzia handiagoa ematen dion proteina, aurretik jada aipatu dugun moduan, ezinbesteko papera jokatzen duen UHRF1 proteina da. PCNA proteina, berriz, DNAREN erreplikazio prozesua bultzatzen duen kofaktore garrantzitsua da ere (Kelman, 1997).

Beraz, erreplikazio prozesua eta harizpien metilazioa aldi berean ematen dira, bata besteari atzetik (Leonhardt et al., 1992; Liu et al., 1998; Chuan et al., 1997; Vertino et al., 2002; Ottiger & Hubscher, 1984; Araujo et al., 1998), eta DNMT1 entzimak duen funtzionamendua azkarra eta eraginkorra izaten da. Metilazio prozesua modu jarraian burutzen da, eta harizpi metilatu gabeetara mugatzen da eskusiboki (Bestor & Ingram, 1983; Hermann, Goyal & Jeltsch, 2004). Horrenbestez, DNMT1 da CpG eremuak metilatuak mantentzeaz arduratzen den proteina, eta horren bidez informazio

epigenetikoaren transferentzia bermatuta geratzen da mitosiaren ondoren (Jeltsch & Jurkowska 2014; Hermann, Goyal & Jeltsch, 2004).

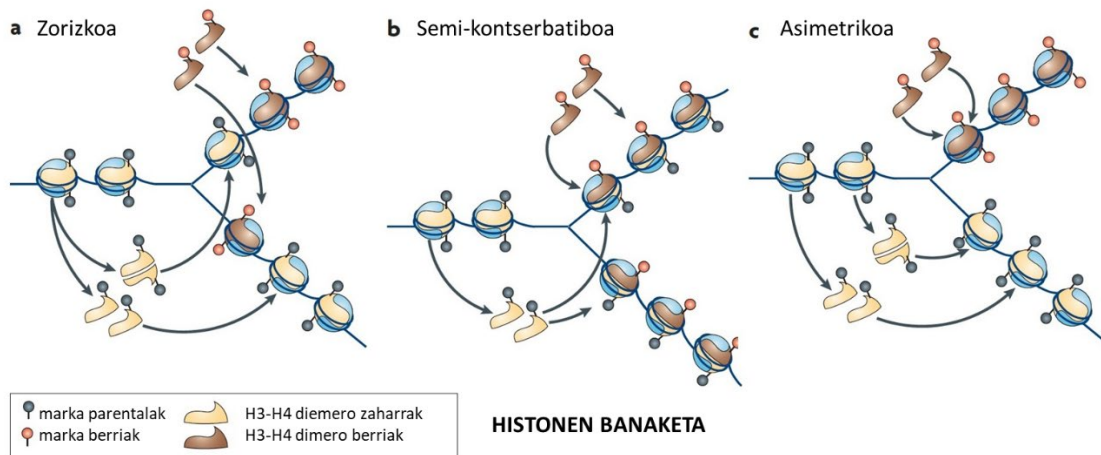


1.10. irudia. DNMT1 entzimaren mantentze lanak erreplikazio urkilean. PCNA homotrimerikoak faktore orokorrak biltzen ditu erreplikazio urkilean. DNA kate hemimetilatuetan, PCNA eta UHRF1 (NP95 moduan ere ezaguna) proteinek DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) erakartzen dute, sortuko diren bi kate alabetan CpG dinukleotidoak metilatuz (Irudi moldatua; Probst et al., 2009).

1.2.1.2. Histonen eraldaketek eragindako memoria epigenetiko zelularra

Histonek ere informazio epigenetikoa transmititzeko gaitasuna dute zatiketa zelularrean zehar (Campos, Stafford & Reinberg, 2014; Rivera et al., 2014). Jasaten dituzten aldaketa mota ezberdinen artean (ingelesezko *Post-Translational Modifications*; PTM), metilazioak eta azetilazioak daude, besteak beste, eta horiek zatiketa zelularrean ondoren zelula alabetara iragateko gaitasuna dutela behatu da. Heredatzeko gaitasun hori, eraldaketa kimiko horiek duten egonkortasunak ahalbidetzen du (Alabert et al., 2015; Scharf et al., 2009; Burgess & Zhang, 2013). Histonetako azetilazioen batez besteko biziraupena minutuetakoa den bitartean (Chestier & Yaniv, 1979; Jackson et al., 1975), metilazioen batz besteko biziraupena orduetatik egunetara luzatzen da (Zee et al., 2010). Beraz, ezaugarri karakteristiko horrek memoria epigenetiko zelularrean parte hartzeko hautagai garrantzitsuak bihurtzen ditu. Hala ere, banaketa hori nola ematen den erabat ezezaguna dugu.

Erreplikazio prozesuan, DNA katea nukleosometatik banantzen da (MacAlpine & Almouzni, 2013), eta horrek jada eraldatuak dauden histona zaharren aldi baterako galera ekartzen du inplizituki. Jatorrizko PTMak nola berrezartzen diren, berriz, ez dago batere garbi. Horren inguruan ikerketa ezberdinak burutu dira, eta, ondorioz, 3 hipotesi proposatu izan dira 1.11. irudian beha dezakegun moduan (Annunziato, 2013; Annunziato, 2005; Probst et al., 2009): 1) Ausaz, histona zaharrak bi DNA kateetan zoriz banatzen dira; 2) Semi kontserbatiboa, histona zaharren erdia kate batera bidaltzen dira, eta beste erdia, bestera; eta 3) Asimetrikoa, H3-H4 tetramero guztiak kate batera edo bestera bidaltzen dira. Nolanahi ere, kasu guztietan histonen hutsuneak geratzen dira, eta gune horiek betetzeko histona berriak gehitu behar dira, histona berri eta PTMduen histona zaharren mosaiko heterogeneo bat osatuz (De Koning et al., 2007). Gaiaren inguruan burutu diren ikerketa batzuek frogatu dutenez, nukleosomako histonak H3-H4 tetrameroetan eta H2A-H2B dimerotan banantzen dira, modu horretan birziklatzen direlarik bi DNA kateetan (Saredi et al., 2016; Nakamura et al., 2019; Pellegrino et al., 2017).



1.11. irudia. H3-H4 dimero zahar eta berrien banaketa erreplikazio urkilean, haien marka epigenetikoekin. Histonen banaketa azaltzen dituzten teorien irudikapena: **(a)** Zorizko banaketa; **(b)** Banaketa semi-kontserbatua; **(c)** Banaketa asimetrikoa. Kasu guztietan, *reader* moduan jokatzen duten proteinak marka epigenetikoak mantentzen dituzten histona zaharretara elkartzen dira, eta elkarrekintza horrek *writer* bat erakartzen du, albotako histona eraldatu-gabea modifikatuz (Irudi moldatua; Probst et al., 2009).

Erreplikazio prozesuaren ostean PTM-en ezarpena ez da berehala ematen, eta eraldaketa motaren arabera berrezartze abiadura hori ezberdina izan ohi da (Alabert et al., 2015; Scharf et al., 2009; Xu et al., 2011; Pesavento et al., 2008; Zee et al., 2010; Sweet et al.,

2010). Transkripzionalki gune aktiboen bereizgarria den H3K4me3 marka, esaterako, PTMen artean azkarren berrezartzen den eraldaketetariko bat da; zelulen banaketa mitotikoa bukatu orduko bere jatorrizko mailetan aurkitzen da (Reverón-Gómez et al., 2018). Gune isilduen bereizgarria den H3K27me3 markaren berreskurapena, berriz, harrigarriki geldoa da, eta, oro har, hasierako mailak ez dira guztiz berreskuratzen zelularen zikloa guztiz amaitu arte (Alabert et al., 2020). Hala ere, berreskurapen horren iraupena zelula motaren araberakoa da (Bonnet et al., 2019). Kuriosoki, histonetan eraldaketak burutzen dituzten entzimek eurek sortutako produktuekin elkartzeko gaitasuna dutela behatu da. H3K9 hondarren metiltransferasak, esaterako, aktibatua izaten dira H3K9 hondarra metilatua aurkezten duten nukleosomen bidez. Hala ere, atzera-elikadura (ingelesezko *feedback*) positibo hori ez da nahikoa marka horien herentzia epigenetiko zelularra ziurtatzeko; histonetako eraldaketa gehienak azkar ezabatzen dira arrazoi ezberdinak medio (Coleman & Struhl, 2017; Wang & Moazed, 2017). Horrenbestez, histonetako eraldaketen herentzia zelular bat ziurtatzeko, atzera-elikadura prozesu positibo hori ez da nahikoa, memoria hori bultzatuko edo mantenduko duen faktore edo eragile gehigarri bat beharrezkoa delarik, elementu isiltzaile (Wang & Moazed, 2017) edota kromatinaren arautzaileak biltzen edo aktibatzen dituzten RNA lokalen produkzio bat (Huang et al., 2017), esaterako.

1.2.1.3. RNA ez-kodetzaileek eragindako memoria epigenetiko zelularra

Zatiketa mitotikoetan zehar ondorengo zeluletara heredatzen diren, eta epigenetikan eragina duten molekulen artean, RNA ez-kodetzaileak ere topatzen dira. Hala ere, ikerketa eremu hori erlatiboki berria da, eta oraindik asko dago horren inguruan ikertzeko. RNA ez-kodetzaile horien artean, molekula luzeak (lncRNA) eta molekula motzak (sncRNA) daude (Zamore & Haley, 2005), eta memoria epigenetiko zelularra gauzatzen duten lncRNAen artean, bi kasu espezifiko nabarmendu ditzakegu (Mercer, Dinger & Mattick, 2009): X kromosomaren inaktibazioa (ingelesezko *X chromosome inactivation*; XCI) eta inpronta genomikoa (ingelesezko *genomic imprinting*).

X kromosomaren inaktibazio prozesua gauzatzen duen lncRNA espezifikoa *Xist* bezala ezagutzen da, eta zelula batetik bestera heredatzen den RNA molekula adierazgarrietariko bat da (McCarrey & Dilworth, 1992). *Xist*-ek funtzio gakoa betetzen du ugaztunetako indibiduo emeeetan; garapen enbrionarioan zelula eme guztietan topatzen den X kromosomaren dosi bikoitza saihesteko X kromosometako bat isilarazten

du, histonetako errepresio markak finkatuz eta DNAREN metilazioa bultzatuz, besteak beste (Thorvaldsen et al., 2006). Dena den, prozesu hori erregulatu izateko *Xist* molekulak bere aktibitatea kontrolatuko duen beste lncRNA osagarri baten laguntza izaten du, *Tsix* molekula (Lee et al., 1999). Isildutako X kromosoman *Xist* aktibo, eta kromosoma aktiboan *Tsix* aktibo mantentzeaz arduratzen diren mekanismoak ez dira guztiz ezagutzen. Hala ere, *Tsix*-ek *Xist* genearen gune sustatzailean heterokromatinaren sorrera bultzatzen dituzten zenbait entzima biltzen dituela uste da, bere adierazpena ekidinez (Froberg et al., 2013; Lee, 2012). Garapen prozesuaren hasiera ematen den XCI prozesuan, X kromosoma zein isilduko den erabakia zoriz ematen da, eta ondoren, isildutako kromosoma bera izango da beti aurrerantzean (Jonkers et al., 2008). Bada, XCIaren mantenua zelulatik zelulara iragaten den informazio epigenetikoaren adibide garrantzitsuenetariko bat da. Prozesu hori, RNA ez-kodetzailea den *Xist* genearen adierazpenarekin, eta *Polycomb* taldeko proteinen jarduketarekin hasten bada ere, DNMT1aren presentzia nahitaezkoa izaten da metilazio patroia mantentze lanetarako, eta haren herentzia epigenetiko zelularrerako (Beard et al., 1995; Panning and Jaenisch, 1996).

Inpronta genomikoa ere, herentzia epigenetiko zelularra erakusten duten lncRNA ezberdinen bidez gauzatzen da. Prozesu horren bidez, geneen *kluster* edo multzo jakin batzuen erregulazioa burutzen da RNA molekula horiek sortzen dituzten interferentzien bidez (Tremblay, Duran & Bartolomei, 1997; Adelsteinsson & Ferguson-Smith, 2014; Barlow & Bartolomei, 2014). Inpronta genomikoaren helburu nagusia, gene multzo jakin bat jatorri parentalorekiko modu espezifikoan adieraztea da; gene batzuk, jatorri aitatiarra duten aleloetatik adierazten dira, eta beste batzuk, berriz, jatorri amatiarra duten aleloetatik. Alelo kopia bakarraren adierazpena, jatorri parental espezifikoa duena, ezinbestekoa da indibiduen garapen egoki bat emateko (McGrath & Solter, 1984; Surani et al., 1984; Barton et al., 1984). Inprontadun geneak ez dira aleatorioki topatzen genomaz zehar, horren ordez zenbait *kluster* ezberdinetan multzokaturik aurkitzen dira, eta horiek *imprinting control region* (ICR) izeneko erregulazio-guneen bidez kontrolaturik egoten dira. Kontrol gune horiek diferentzialki metilatuta topatzen dira (ingelesezko *differentially methylated regions*; DMR), eta horiek bideratzen dute aleloen adierazpen diferentzial hori. Erregulazio-eremu horiek *cis* moduan kontrolaturiko adierazpen parental espezifikoa bideratzen dute, zenbait proteinen eta RNA ez-kodifikatzaile luzeen adierazpena gauzatuz (Ideraabduallah, Vigneau & Bartolomei, 2008; Delaval & Feil, 2004).

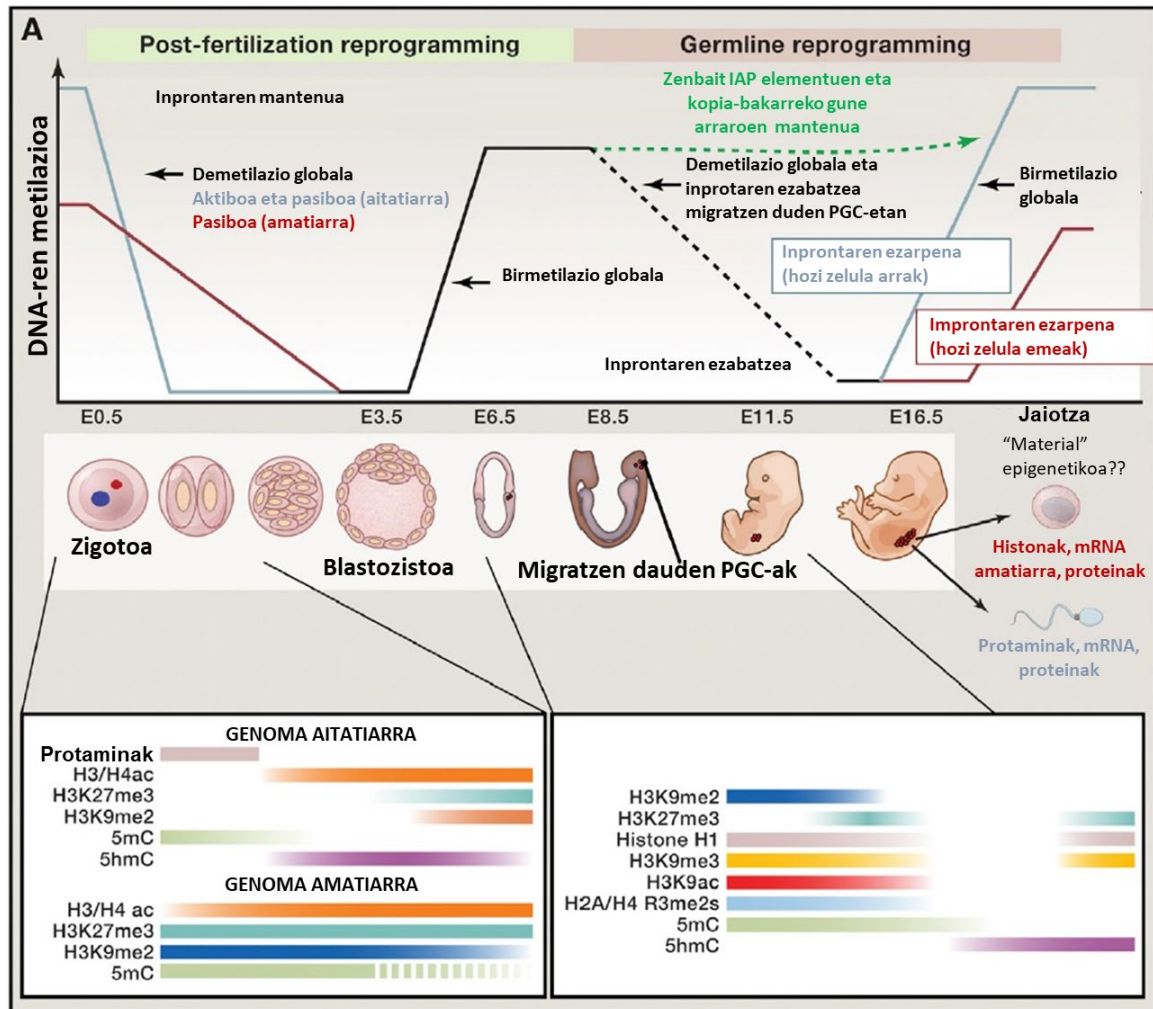
Aipatu berri ditugun bi kasu horiez gain, RNA ez-kodetzaile motzek ere garrantzi handia dutela behatu da, funtzio garrantzitsuak betetz memoria epigenetiko zelularrean, heterokromatinaren mantenuan, eta zenbait gene espezifikoaren isiltzean edo errepresioan (Mirouze, 2012; Siomi et al., 2011). Molekula horien artean, miRNA molekulak izan dira

gehien aztertuak, eta funtzioa garrantzitsuak betetzen dituzte diferentziazio prozesuan zenbait gene espezifikoek adierazpena kontrolatuz. Zelulek diferentziazio prozesuan euren nortasun bereizgarria eskuratzen dute, eta nortasun hori zelulatik zelulara iragaten da memoria zelularren bidez (Stuwe, Toth & Aravin, 2014). Herentzia epigenetikoak, hein handi batean, molekulek duten egonkortasunaren bidez bermatzen da, eta, ondorioz, zelula alabek antzeko patroia epigenetikoak garatzen dute (Gapp et al., 2014); miRNAk zelula alabetan proportzio berdinetan banatuz, zelula alabetan patroia beretsua mantentzen dute (Ptashne, 2013). ncRNAen beste talde adierazgarri bat, siRNA molekulek osatzen dute, eta horiek transkripzio prozesua inhibitzen dute miRNAen antzera inaktibazio mekanismoen bidez (Tomari & Zamore, 2005; Watanabe et al., 2006). Bestelako funtzioekin erlazionatu badira ere (Wilkins et al., 2005), zenbait organismoen memoria zelularrean betetzen duten funtzioak garrantzitsuak dira; legamian, esaterako, siRNA molekulak eta H3K9 metilatuak elkarlanean ibiltzen dira azken horren ezabaketa inhibituz eta patroia epigenetikoak babestuz. Horrenbestez, siRNA molekula horiek memoria epigenetiko zelular horretan parte hartu dezaketela esan daiteke (Yu et al., 2018), nahiz eta saguan frogatua ez izan.

1.2.2. MEMORIA EPIGENETIKO TRANSGENERAZIONALA

Zatiketa zelular mitotikoan eman daitezkeen memoria epigenetikoak gain, belaunaldi batetik bestera marka epigenetikoek herentzia bermatzen duen beste memoria mota bat ere existitzen da, marka epigenetiko horiek hurrengo belaunaldietara iraganez. Informazio epigenetikoaren transmisio mekanismo hori, belaunaldiz belaunaldiko herentzia epigenetiko edo herentzia epigenetiko transgenerazional moduan ezagutzen da. Herentzia mota horretan jokoan sartzen diren prozesuak erabat ezberdinak izaten dira, eta horren inguruan lortu diren ebidentziak oso gutxi dira oraindik (Gapp et al., 2014; Ambeskovic, Roseboom & Metz, 2017; Babenko, Kovalchuk & Metz, 2012; Bohacek & Mansuy, 2015; Pang et al., 2017; Skinner, 2014; Szyf, 2015; van Otterdijk & Michels, 2016; Yeshurun & Hannan, 2019). Hala eta guztiz ere, herentzia transgenerazionala gauzatzeko heredatuak izan daitezkeen marka epigenetikoek bi birprogramazio epigenetiko eta meiosi prozesu bat gainditu behar izaten dituzte. Hortaz, oztopo horik gainditzen dituzten marka epigenetikoek hurrengo belaunaldietan eragiteko gaitasuna dute.

Ugaztunon bizi zikloan informazio epigenetikoaren bi ezabatzealdi nagusi ematen dira, eta ondoren, patroia epigenetiko erabat berria ezartzen da. Prozesu horri, birprogramazio epigenetikoa (ingelesezko *epigenetic reprogramming*) deritzogu, eta ezinbesteko pausua da ugaztunotan garapen egoki bat bermatzeko (Feng, Jacobsen & Reik, 2010). Informazio epigenetikoaren ezabaketak kromatinaren aldaketa konformazionala ekartzen du, eta horrekin batera transkripzioaren aldaketa ere ematen da. Hortaz, alde aurretik ezarritako markak epigenetikoaren ezabatze globala ematen da, eta ondoren, eraldaketa epigenetiko berriak berrezartzen dira. Aipatu dugun moduan, prozesu hori bi aldiz ematen da garapen prozesuan zehar, eta, ondorioz, tenporalki eta espazialki kontrolatua dagoen prozesua da. Lehenengoa, zigotoaren ernalketa ondorengo faseetan ematen da, enbrioiaurre-ekarpenaldian, zehazki, eta *post-fertilization reprogramming* moduan ezagutzen da. Bigarrena, berriz, migrazio prozesuan dauden PGC zelulen gain ematen da, eta *germline reprogramming* moduan ezagutzen da (Campos, Stafford & Reinberg, 2014; Papp & Plath, 2013; Gaspar-maia et al., 2011). 1.12. irudian birprogramazio epigenetikoak non, noiz eta nola ematen diren aztertu dezakegu, bertan ematen diren markak epigenetikoaren aldaketa nagusiekin batera; DNAREN metilazio mailak eta histonen modifikazioak nola aldatzen diren aztertu ditzakegu, besteak beste.



1.12. irudia. Birprogramazio epigenetikoaren kokapen espaziala eta tenporala. *Post-fertilization* eta *Germline* birprogramazioek enbrioiaren garapenean zehar duten kokapena eta denboralizazioa. Bi gertaera horietan ematen diren aldaketa nagusiak DNAREN metilazioari eta histonen eraldaketei dagokienez (Irudi moldatua; Heard & Martienssen, 2014).

1.2.2.1. DNAREN metilazioak eragindako memoria epigenetiko transgenerazionala

Ugatzunok pairatzen ditugun bi birprogramazio epigenetikoetan DNAREN metilazio maila globalek jasaten dituzten aldaketak izugarri handiak dira (12. Irudia); genoma ia guztiz demetilatzen da bi kasuetan, eta demetilazio aktiboak hartzen duen papera oso garrantzitsua izaten da, eta, ondorioz, hidroximetilazioen mailak abiada batean igotzen dira (Heard & Martienssen, 2014). Nolanahi ere, birprogramazio prozesu bakoitzak dituen inplikazio biologikoak erabat ezberdinak dira, eta bi prozesuen artean ezberdintasun nabariak daude.

Lehenengo birprogramazio aldian, hau da, zigotoaren ernalketa ondorengo birprogramazioan, jatorrizko gametoei zituzten metilazio patroiak ia erabat ezabatzen dira genoma osoaren demetilazio-bolada edo olatu baten bidez, eta borratze hori sahiesten dituzten eremu bakarrak, inpronta genomikodun geneen klusterrak izaten dira. Ezabatze prozesua sinkronizazio ezberdinarekin ematen da pronukleo emea edo arra denaren arabera, eta horren helburu nagusia blastozistoaren barruko zelula-masa osatzen duten zelulek *naïve* zelulen egoera pluripotentea berreskuratzea da (Leitch et al., 2013; Smith et al., 2012). Genoma maskulinoaren kasuan, DNAREN demetilazioa aktiboa eta pasiboa izaten da, eta metilazio maila globalen jaitsiera une batetik bestera ematen da abiada handian. Demetilazio aktiboak garrantzi handia duenez, zitosina metilatu gehienak zitosina hidroximetilatuengatik (5hmC) ordezkatzen dira. Genoma femeninoaren kasuan, aldiz, demetilazio pasiboa ematen da eksklusiboki, eta, ondorioz, metilo taldeen desagertzea pixkanaka ematen da. Genomako metilazio patroien berrezarpena enbrioaren inplantazio prozesua eta gero ematen da, eta hortaz arduratzen diren entzimak *de novo* DNA metiltransferasak dira nagusiki (Borgel et al., 2010; Auclair et al., 2014).

Bigarren birprogramazio aldia, berriz, hozi zeluletan ematen den birprogramazioa da. Demetilazio prozesu horren bidez jatorri parentaleko informazio guztia ezabatzen da, aktiboki eta pasiboki. Horregatik, metilazioen maila globalak hidroximetilazioengatik ordezkatuak izaten dira. Demetilazio prozesu hori jasaten duten sekuentzien artean honako hauek ere aurkitzen dira: funtzio erregulatuak dituzten eta CpG dinukleotidotan aberatsak diren sekuentziak, diferentzialki metilatutako inprontadun eskualdeak (DMR), eta X kromosoma inaktiboko edo hozi zelulen garapenarekin erlaxatutako geneen inguruko CpG uharteak. Sekuentzia horiek guztiak demetilatu egiten dira PGCen garapeneko azken etapetan (Seisenberger et al., 2012). Prozesu honen bereizgarria den beste pausu bat, aurrerago ematen den eta sexuarekiko espezifiko den metilazio-patroien ezarpena da; oozitoek eta espermatozoideek metilazio-patroi desberdinak ezartzen dituzte (Messerschmidt et al., 2014). Horrek, azken finean, sexuarekiko espezifiko den inpronta genomikoa baimentzen du (Bourc'his et al., 2001; Hata et al., 2002; Kaneda et al., 2004; Kato et al., 2007).

Ezarri aurreko enbrioian eta hozi zeluletan ematen diren birprogramazio epigenetikoek metilazio-patroia berrezartzen dute, aurreko informazio epigenetiko ezabatuz (Hackett et al., 2013), eta hori da, zehazki, metilazioan oinarritutako belaunaldien arteko herentziak duen oztoporik handiena. Hala ere, *Loc*i edo genomako gune jakinen multzo txiki batek (CpG uharteetatik kanpo topatzen diren zenbait sekuentzia, oro har) *germline reprogramming* birprogramazio epigenetikoko ezabatze prozesutik ihes egitea lortzen

dute, ondorengoetara iraganez (12. irudia). Sekuentzia horien artean hauxek daude: errepikakorrak ez diren CpG uharte gutxi batzuk, eta eretrotransposoi-familia bat (A partikula intrazisternalak; IAP) (Guibert et al., 2012; Seisenberger et al., 2012). Gizakietan esaterako, eboluzio aldetik gazteak eta transkripzionalki aktiboak diren beste transposoi batzuek ere, hipometilazio global horri aurre egiteko gaitasuna dutela ikusi da: L1PA-k eta SINE-VNTR-Alu-ak (SVA) (Tang et al., 2015). Hori dela eta, sekuentzia horiek belaunaldi batetik bestera pasatzeko gaitasuna dute, eta, ondorioz, herentzia transgenerazionalan parte hartu dezaketen hautagai interesgarritzat jotzen dira.

1.2.2.2. Histonen eraldaketek eragindako memoria epigenetiko transgenerazionala

Histonetako eraldaketak belaunaldiz belaunaldi transmititu daitezkeen marka epigenetikoaren artean daude (Campos, Stafford & Reinberg, 2014; Rivera et al., 2014), eta horiek ere, informazio epigenetikoaren oroitzapena dute helburua. Herentzia epigenetiko transgenerazional hori behin baino gehiagotan egiaztatu da *C. elegans* zizareetan. Izaki bizidun horrek bizi ziklo oso laburra dauka, eta gainera, bere genoma oso ondo ezagutzen da eta portaera hermafrodita aurkezten du. Ezaugarri horiek oso erraza egiten dute epigenetikaren ikerkuntza (Atakan et al., 2019). Zenbait ikerketek erakutsi dutenez, H3K9me3 eta H3K4me3 bezalako eraldaketek belaunaldiz belaunaldiko herentzia dute, eta horrek zenbait ezaugarri fenotipoko adierazpena heredatzea eragiten du; bi eraldaketen arteko orekak zizareen ugalkortasuna erregulatu dezakete, eta frogatu denez, ondorio fenotipoko horiek 3-4 belaunalditan mantendu daitezke (Greer et al., 2014).

Ugaztunotan, berriz, belaunaldiz belaunaldiko memoria epigenetikoa baimentzen duten mekanismoen inguruan gutxi ezagutzen da. Marka epigenetiko horiek, dagoeneko aipatu dugun moduan, bi birprogramazio epigenetiko gainditu behar dituzte ondorengo belaunaldietara iragateko, eta bi prozesu horien artean, belaunaldi berrien eraketa ahalbidetzen dituzten gametogenesi eta ernalketa prozesuak ematen dira. Horretarako, ezinbestekoa da genomaren osaera guztiz aldatzea, eta pairatzen dituzten aldaketen artean DNA antolatzeaz arduratzen diren histonetan ematen diren eraldaketen aldaketak daude. Genomaren antolaketa-aldaketa ezberdina da indibiduoaren sexuaren arabera (12. Irudia). Genomaren osaera bideratzen duten histonen presentzia, esaterako, erabat ezberdina da zelula somatikoaren eta hozi zelulen artean, bereziki espermatozoideen kasuan, bai konformazioari eta bai osaerari dagokionez.

Espermatozoideetako histona gehienak, protaminengatik ordezkaten dira gametogenesisian zehar, eta hori *germline reprogramming* prozesuarekin batera ematen da. Ondorioz, DNAREN %10-15 soilik geratzen da histonetara lotuta gizakiotan, eta saguetan, ostera, %1era jaisten da (Rathke et al., 2014). Proteina horiek oso izaera basikoa dute, eta horrek material genetikoaren super trinkotzea ahalbidetzen du espermatozoidearen buruan. Hortaz, espermatozoideen bidez heredatu daitezkeen histonen kopurua oso baxua da, eta bertan mantentzen diren histonak, eta, ondorioz, hurrengo belaunaldietara heredatuak izaten direnak, garapenen prozesuan garrantzi handia duten *loci* jakinetan kontzentratuak aurkitzen dira, hala nola: inprontadun geneen klusterretan, miRNA klusterretan eta HOX geneen klusterretan (Hammoud et al., 2009). Espermatozoideen gune zentromerikoetan topatzen diren *CenH3*-dun nukleosomak ere, bere horretan mantentzen dira (Ingouff et al., 2007; Raychaudhuri et al., 2012). Aldiz, oozitoek izaten duten kromatinaren egiturak zelula somatikoekin antzekotasun gehiago badituzte ere, oso ezberdinak izaten jarraitzen dute; oogenesisia eman baino lehen histonen ordezkapen bat ematen da, baina kasu horretan hozi lerroen bereizgarriak diren bestelako histonengatik ordezkaten dira (Ooi & Henikoff; 2007), eta, ondoriz, gune hartako eraldaketa gehienak ezberdinak izan ohi dira (Hanna et al., 2018). Sexuaren arabera hozi zelula horiek hartuko duten bidea ezberdina bada ere, jasaten duten *germline reprogramming* prozesuan histonetako eraldaketen berraketa DNAREN demetilazio prozesu aktiboarekin batera ematen da (12. Irudia). Ezabatzen diren eraldaketen artean metilazioak (H3K9me2, H3K27me3, H3K9me3 eta H2A/H4 R3me2s) eta azetilazioak (H3K9ac) daude. Horrez gain, nukleosomaren egonkortasuna mantentzeaz arduratzen den H1 histonaren galera bat ere ematen da. Demetilazio prozesua amaitzen denerako, ordea, H3K9me3 eta H3K27me3 eraldaketen, eta H1 histonen presentziak berriro berreskuratzen dira hozi zeluletan.

Ernalketa ondoren jatorri ezberdineko material genetikoak duen antolaketa eta osaera erabat ezberdina izaten jarraitzen du, eta hori ez da berrantolatzen *post-fertilization reprogramming* prozesua eman arte. Hala ere, lehenago zenbait zatiketa zelular ematen dira (Arney et al., 2002). Espermatozoidetako protaminen ordezkapena prozesua azkarra izaten da, eta protaminak H3 histonaren H3.3 aldaerarengatik ordezkatuak izaten dira, besteak beste. Prozesu hori beharrezkoa da, eta organismoaren arabera funtzio ezberdina du. Ugaztunon kasuan, horrek pronukleo aitatiarreko heterokromatina perizentrikoaren eraketa (Santenard et al., 2010) eta poro nuklearraren eraketa (Inoue & Zhang, 2014; Zierhut et al., 2014) ahalbidetzen du. 12. irudian beha dezakegunez, genoma aitatiarra bat-batean aldatzen da, eta eraldaketen berreskuratzea pixkanaka ematen da, eta motaren arabera abiadura ezberdina da. Lehenak, H3 eta H4 histonetako azetilazioak dira,

eta horiek histonak agertu bezain laister katalizatzen dira. Ondoren, berriz, H3K9me2 eta H3K27me3 eraldaketak katalizatzen dira. Genoma amatiarraren kasuan, aldiz, ematen diren aldaketak gutxiago dira, eta hein handi batean, H3K9me3 eta H3K27me3 bezalako eraldaketak bere horretan mantentzen direlako prozesu guztian zehar.

Histonetako eraldaketek memoria epigenetiko transgenerazionalan eduki dezaketen garrantzia handia dela uste da (Castel & Martienssen, 2013). Esaterako, ugaztunetan oraindik frogatua ez bada izan ere, H3K9ren metilazioa belaunaldietan mantendu daiteke zizareetan. H3K9 hondarraren metilazioen inguruan ugaztunetan burututako azterketek frogatu dutenez, *crostalk* prozesuaren adibide garbi bat da; H3K9-metilatuaren bidez *Tet* genearen inhibitzailea den *Stella*-ren errekrutazioa ematen da, eta horrek TET bidezko zitosina metilatuaren ezabaketa oztokatzen du (Nakamura et al., 2012). Horrez gain, enbrioiko geneen kontrola hozi lerroko informazio epigenetikoaren bidez arautzen dela frogatu da; oozitoetako genoman topatzen diren H3K27 hondarraren metilazioek, enbrioio goiztiarreko adierazpena isilarazten dute (Inoue et al., 2017). Hori dela eta, oozitoetan H3K27me3 eraldaketaren presentzia eraldatua egonez gero, hurrengo belaunaldiaren adierazpena asaldatua egotea ekarriko luke.

Horrenbestez, histonetako eraldaketak gametoen bidez ondorengoetara heredatuak izateko birprogramazio epigenetikoan ezabatze-prozesutik ihes egin behar dute. Hala ere, ikerketa arlo honen inguruan asko dago oraindik ikertzeko; histonen modifikazio kobalenteen eta histonen isoformen gama zabalak, eta zelula kopuru baxuekin buruturiko kromatinaren mapatzeak izaten edo ekartzen dituzten arazoek edo zailtasunek, ikertzeko oso arlo zaila bilakatzen dute.

1.2.2.3. RNA ez-kodetzaileek eragindako memoria epigenetiko transgenerazionala

Orai arte, DNAREN metilazioa eta histonetako eraldaketak aztertu ditugu, baina bi eraldaketa horiez gain, RNA ez-kodetzaileek ere herentzia epigenetiko transgenerazional hori bultzatu dezakete. Molekula horien artean, herentzia epigenetiko zelularrean bezala, RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNA) eta laburrak (sncRNA) daude. Hala ere, bertan parte hartzen duten molekulak eta mekanismoak erabat ezberdinak dira. Animalia eredu ezberdinetan ebidentzia ugari topatu badira ere, ugaztunetan izan dezaketen garrantziaren zenbatekoa ezaguna dugu oraindik.

LncRNA molekulek, esaterako, garrantzi handia dute inpronta genomikoan. Jada aipatu dugun moduan, inpronta genomikoak zenbait geneen adierazpen monoalelikoa eta jatorri parental jakinekua ziurtatzen du, eta garrantzitsua izaten da garapen prozesuan bereziki. LncRNAek inprontadun geneen adierazpena kontrolatzen dute. 12. irudian beha dezakegunez, inpronta genomikoa enbrioia ren garapenean zehar finkatzen da *germline reprogramming* prozesuan. Hortaz, amaren eta aitaren bidez eskuratzen diren kromosoma sortak funtzionalki ez baliokideak izaten dira inprontadun geneei dagokionez, eta gametoen bidez iragaten dira hurrengo belaunaldietara. Inprontadun geneak bere horretan mantentzen dira indibiduoaren garapen prozesu osoan zehar; izan ere, *post-fertilization reprogramming* prozesuan bere horretan mantentzen dira, eta horrek geneen adierazpen monoalelikoa ziurtatzen du gerora (Ideraabdullah, Vigneau & Bartolomei, 2008; Latham, 1995). Prozesu horretatik ihes egiteko inprontadun geneen adierazpena kontrolatzen duten ICR eremuen babes aktibo bat gauzatzen da, eta hori bertan topatzen diren TGCCGC sekuentziei esker ematen dela uste da. Sekuentzia hori metilatuta agertzen denean ZFP57 proteinaren (ingelesezko *zinc finger protein: ZFP*) bidez identifikatua izaten da, eta horrek TRIM28 (ingelesezko *Tripartite Motif Containing 28*) (KAP1 moduan ere ezaguna) bezalako proteinak biltzen ditu. Guzti horrek, DNA metiltransferasen kontzentrazio handiago bat bultzatzen du sekuentzia horren inguruan, eta, ondorioz, demetilazio prozesutik aktiboki babestuak izaten dira. Beraz, *Germline reprogramming* prozesuan ematen den inprontadun geneen berrezartze prozesua saihestu eta bere horretan mantentzea lortzen duten marka epigenetikoek belaunaldiz belaunaldi heredatuak izateko aukera izango lukete, memoria epigenetiko transgenerazionala gauzatzeko hautagaia nagusiak direlarik egun (van Otterdijk & Michaels, 2016). Gizakiotan, adibidez, *Prader-Willi* sindromean ematen diren inpronta-akatsak metilazio-arrasto baten herentziari zor zaizkiola uste da, gizonezkoen lerro germinalaren bidez heredatzen dena (Buiting et al., 2003).

RNA ez-kodetzaile laburrak, halaber, belaunaldiz belaunaldiko herentzian garrantzi handia duten molekulak dira. Duela gutxi arte, ez zegoen ezagutza handirik arlo horren inguruan, baina hori erabat aldatu da; zizareen, eulien eta saguen herentzia epigenetiko transgenerazionalan nahasiak dauden RNA ez-kodetzaile labur (sncRNA) ugari identifikatu dira, eta horien inguruan dauden ebidentziak geroz eta handiagoak dira. Identifikatu diren RNA molekulen artean siRNA-k, piRNA-k eta miRNA-k daude, besteak beste (Rassoulzadegan et al., 2006; Wagner et al., 2008; Grandjean et al., 2009; Rechavi et al., 2011; Bagijn et al., 2012; Lee et al., 2012; Ashe et al., 2012; Shirayama et al., 2012). sncRNA molekulek marka epigenetikoetan, eta kromatinaren egoeran edo konformazioan eragin dezakete.

Kromatinaren konformazio-egoera mantentzeko eta ncRNA laburren herentzia transgenerazionala gauzatzeko interferentziako RNAen (ingelesezko *interfering RNA*; iRNA) makineriak duen garrantzia bereziki handia da (Ashe et al, 2012; Shirayama et al., 2012; Buckley et al., 2012), *C. elegans* zizareetan behatu den moduan. ncRNA molekulen pilaketak histonaren eraldaketa dakar, eta eraldaketak bi belaunalditan mantentzen dira ncRNA labur horien presentziarik gabe (Burton et al., 2011; Gu et al., 2012). Makineria proteiko hori (ingelesezko *heritable RNAi defective-1*; hrde-1) denbora luzean zehar falta denean, berriz, hozi lerroko geneetan H3K9me3 marka epigenetiko errepresiboaren galera progresiboa ematen da belaunaldietan zehar, isilduta dauden geneen adierazpena emendatuz, eta zizareen antzutasun eraginez (Ashe et al, 2012).

PIWI molekuletara loturiko RNAek (piRNA) ere garrantzi handia dute metilazio patroia mantentze prozesuetan. Izan ere, *de novo* DNA metiltransferasen aktibitatea gidatzeko gaitasuna dute (Aravin et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004). *C. elegans*-etan esaterako, piRNA horiek transgeneen isiltze egonkorra gauzatzen dute belaunaldietan zehar. Isiltze mekanismo hori, transkriptoaren parekatze inperfektuen bidez gauzatzen da, eta PIWI endonukleasen aktibitatearekiko independentea da (Bagijn et al., 2012; Lee et al., 2012; Ashe et al, 2012; Shirayama et al., 2012). iRNAetan (ingelesezko *interfering RNA*) ematen den modu berean, RNA ez-kodetzaileen eta kromatinaren artean elkarrekintza bat egoten da herentzia epigenetiko transgenerazionala bermatuz. Eulietan ere, piRNAk hozi lerroetako geneen errepresioaren herentziarekin erlazionatu dira (Grentzinger et al., 2012; Aravin et al., 2007); kromatinaren trinkotzea bultzatuz, piRNAek hozi lerroa babesten dute TE elementuetatik. Prozesu horretan parte hartzen duten zenbait eragileen ekoizpena heredagarria da belaunaldi batetik bestera, eta 50 belaunaldi iraun ditzake. Lorturiko ebidentzien arabera, herentzia hori bide amatiarretik ematen da zitoplasmaren bidez (de Vanssay et al., 2012). Ugaztunetan, aldiz, saguaren espermatogenezian zehar mota ezberdinetako piRNAk topatu direnez (Gan et al., 2011) paper garrantzitsua joka dezaketela uste da.

mikroRNA-ei (miRNA) dagokionez, berriz, ez dago garbi ea memoria epigenetikorako bitartekari gakoak diren, edo besterik gabe herentzia prozesuarekiko sentikorak diren. Ernaldu berri diren saguen obuluetan buruturiko miRNA espezifikoen injekzioek zenbait ezaugarri fenotipoko herentzia transgenerazionala gauzatu dezaketela behatu da (Wagner et al., 2008; Grandjean et al., 2009). Horrez gain, gurasoen bizi baldintza jakinek miRNA molekulen adierazpen baxuago bat eragiten dutela behatu da, hurrengo belaunaldian aldaketa fenotipokoak emanez (Morgan & Bale, 2011). Eraitza horiek herentzia transgenerazionalan parte hartu dezaketela adierazten badute ere, oraindik asko dago aztertzeko.

Laburbilduz, organismo ezberdinen bidez ncRNAen bidezko belaunaldiz belaunaldiko herentzia bat egon daitekeela frogatu da, baina ugaztunetan izan dezakeen garrantziaz gutxi dakigu. Ezagutza falta horren arrazoi nagusienetariko bat, oro har, organismoen konplexutasuna da; bizi zikloaren luzerak, eta marka epigenetikoek organismo bakoitzean jasaten dituen gora-beherek (birprogramazio epigenetikoa esaterako) horren ikerketa errazagoa edo konplexuagoa izatea eragiten du.

1.3. Ingurumena eta epigenetika

Orain arte aipatu ditugun eraldaketa epigenetikoak organismoaren edo norberaren garapenari atxikita dauden aldaketa fisiologikoen ondorio edo emaitzak dira, hau da, barne inguruneko estimuluen bidez guztiz doituak dauden aldaketak. Nolanahi ere, hori ez da beti horrela izaten; ikerketa ezberdinek frogatu duten moduan, eraldaketa epigenetikoak kanpo faktore edo inguruneko eragile ezberdinengatik baldintzatuak egon daitezke. Hortaz, gure bizimoduak edota bizi baldintzek aldaketak sortu ditzakete une jakin horretan dugun eraldaketa epigenetikoaren patroian, eta horietariko batzuk denboran zehar irauteko gaitasuna dute, faktore-eragilea desagertua badago ere. Baieztapen horren onarpenak berriro atara zuen eboluzioaren inguruko eztabaida, Darwinen *hautepen naturala* teoriak galdu egin zuen garrantzia, eta, ondorioz, Lamarcken teoria indartua atara zen. Lamarcken teoriak zioenez izaki bizidunok ingurura egokitzeo dugun gaitasunak ahalbidetzen du eboluzioa, espezie bakoitzak bere garapen propioa izaten duelarik, eta hori inguruko baldintzen araberakoa izaten da; hau da, “eskuratutako ezaugarrien oinordekotzak” gidatzen du eboluzioa. Hortaz, garai hartan onartuta zegoen eboluzioaren teoria birplanteatu zen, Darwinen teoriaren adaptazio berri bat gauzatu. Adaptazio horretan ingurunearen epigenetikak eboluzioaren mekanismo molekularrak bultzatzen dituela onartu zen: Inguruneak fenotipoan eragiten du eta heredagarria izan daiteke, ingurunearekiko adaptazio bat emanez (Lamarck, 1802; Calabi, 2001; Darwin, 1985).

Hortaz, eraldaketa epigenetikoek organismo ezberdinon garapen prozesua bideratu, eta berta zelula bakoitzaren desberdintzapen prozesua gauzaten dute, organo eta ehun espezializatuak eratuz. Baina prozesu horretan kanpo faktoreak sartu daitezke jokoan aldaketak sortuz patroia epigenetikoan. Kasurik hoberenean ingurunearekiko adaptazio bat ematen da, edota txarrean kalte larriak ematen dira garapen prozesuan edota gerora: gaixotasun ezberdinen garapena eta minbizia, esaterako. Hori guztia dela eta, epigenetika, eta zehazki ingurunea eta epigenetikaren arteko erlazio hori, ikerkuntza arlo garrantzitsua bilakatu da azken urteetan (Reamon-Buettner, et al., 2008), eta kanpo faktoreek sortutako aldaketa epigenetikoak itu garrantzitsu bilakatu dira zelula barneko funtzio fisiologikoetan duten garrantzi handiarengatik.

1.3.1. KANPO FAKTOREAK

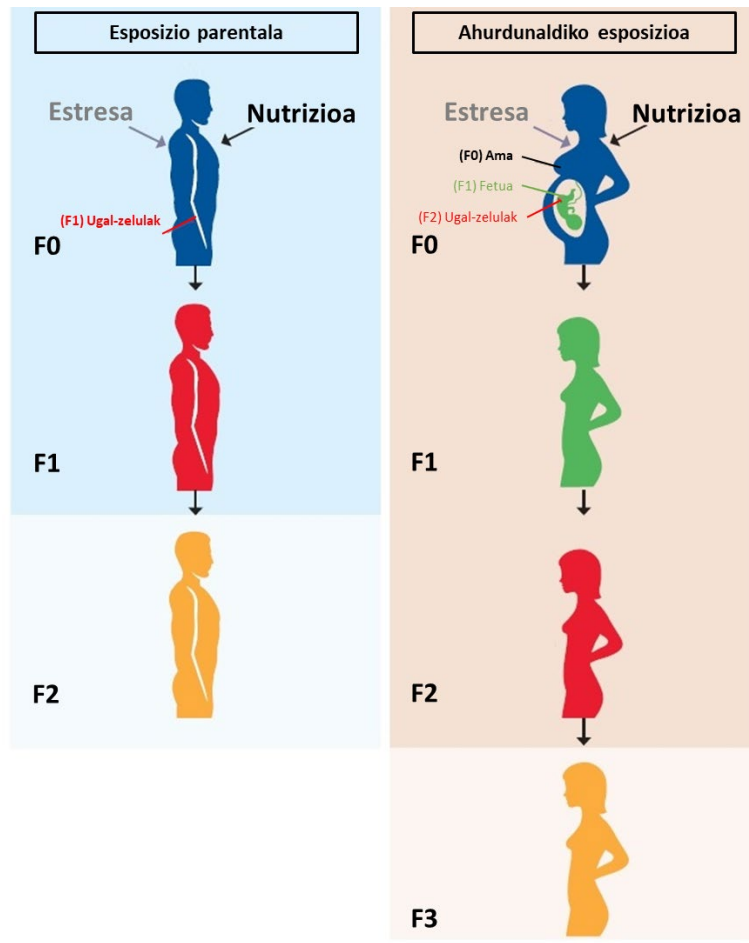
Inguruneak eta kanpo faktoreek organismoen patroia epigenetikoan aldaketa epigenetikoak eragiten dituztenez, eragina izan dezakete geneen adierazpenean, geneen adierazpena piztuz edo isilaraziz (Jaenisch & Bird, 2003). Transkripzioan ematen diren aldaketak kanpo faktoreen ondorioz eman daitezke, eta zenbait kasuetan denboran zehar mantendu daitezkeen kromatinaren aldaketa egonkorren bidez gauzatzen dira. Kanpo faktore horien artean, elikadura mota (Dunn & Bale, 2011; Kaati et al., 2002; Ng et al., 2010; Whitelaw & Whitelaw, 2006), estresa (Morgan & Bale, 2011), egoera fisikoa eta toxiko ezberdinekiko kontaktua edota kontsumoa daude. Tabakoa eta dependentzia sortzen dituzten drogak azken horren adibideak dira (Vassoler et al., 2014; Yohn et al., 2015). Norbanako bakoitzaren bizimoduak patroia epigenetiko espezifikoak garatzea ekartzen du, eta denboran zehar mantentzen badira norbanakoaren fenotipoa modu egonkorrean aldatua daiteke, une horretan bertan edota aurrerago ezaugarri fenotipikoen agerpena emanez (Skinner, 2014; Heard & Martienssen, 2014; Skinner, 2014; Cortessis et al., 2012; Guerrero-Bosagna & Skinner, 2012; Skinner et al., 2010).

Patroia epigenetikoan sortutako aldaketa horien herentzia emateko mekanismo ezberdinak behar dira denboran zehar iraun (nahiz eta faktore eragileak presente ez egon), eta bidean zehar topatuko dituzten oztopo ezberdinak gainditzeko (Sharma & Rando, 2017). Zelula batetik bestera pasatzeko, marka horiek zatiketa zelular mitotikoa gainditu behar dituzte (Campos et al., 2014), eta belaunaldi batetik bestera iragateko (ugaztunetan behintzat), berriz, meiosi prozesua, gametoen bidezko transmisioa, eta birprogramazio epigenetikoa. Aipatutako oztopoak gaindituz gero, ondorengo belaunaldiek patroia epigenetikoa aldatua izateko aukerak handiak dira. Horren ebidentziak badaude ere, prozesua bideratzen dituzten azpi-mekanismoen inguruko ezagutzarik ez dago. Hortaz, oraindik asko dago aztertzeko (Bohacek & Mansuy, 2013; Dolinoy et al., 2007; Moosavi & Motevalizadeh Arkani, 2016).

Gizakiotan, kanpo faktoreek belaunaldi arteko memorian duten inpaktuaren inguruan maila molekularreko ebidentzia gutxi baieztatu ahal izan badira ere, historian eman diren zenbait gertaera bereizgarriren ikerketa epidemiologikoen marka horien herentzia posible direla iradokitzen dute. Populazio edo norbanako bat muturreko bizi egoeretara bultzatua denean, bizimodu gogor horren eraginak agerikoak izatera iritsi daitezke, eta zenbait kasutan ondorengo belaunaldietara iragan daitezke (Bell & Spector, 2011). Horren adibide izan diren gertaerak existitu dira: 40. hamarkadan Herbehereetan gertatu zen goseteak

osasun arazo ugariaren emendioa ekarri zuen ondorengo belaunaldietan, obesitatea, glukosarekiko intolerantzia eta bihotzeko gaixotasunak, esaterako (Lumey et al., 2011; Painter et al., 2008; Veenendaal et al., 2003); Suediako Overkalix kohortean elikadura-baliabideen eskuragarritasunak agerian utzi zituen elikadurak izan ditzakeen ondorioak, bizi-itxaropenean edota diabetesean eraginez hurrengo belaunaldian (Kaati et al., 2002; Bygren et al., 2001); II. Mundu Gerran, Holokaustotik bizirik irten ziren pertsonen ondorengoek estres eta portaera arazoak heredatu zituzten (Vaage et al., 2011; Kellermann, 2013).

Edozein kasutan, belaunaldiz belaunaldiko herentziaz hitz egiten dugunean bi kontzeptu ezberdin behar ditugu: batetik, herentzia epigenetiko intergenerazionala, eta bestetik, herentzia epigenetiko transgenerazionala. Belaunaldiz belaunaldiko herentzia emateko, marka epigenetikoak ondorengo belaunaldietara iragan eta bertan mantendu behar dira, baina ez da herentzia epigenetiko transgenerazionala izatera iristen aldaketa horiek sortu dituzten kanpo faktoreekiko kontaktua eten arte (1.13. irudia). Hau da, aldaketa agerrarazi edo sortarazi duen faktorea F0 belaunaldian amaitzen bada, F1 belaunaldia eratzeko erabiliko dituen hozi zelulak bere baitan ditu, eta, ondorioz, F1 belaunaldia ere faktore-eragile horrekin kontaktuan egon dela esan dezakegu. Horri, herentzia epigenetiko intergenerazionala deritzogu, eta herentzia transgenerazionala, F2 belaunalditik aurrera ematen da (1.13. irudia, urdina). Bide hori esposizio parental moduan ezagutzen da, hala ere, esposizio parental hori ahurdunaldiko esposizioarekin bereiztu behar da; haurdun dauden emakumeetan ematen denean esposizioa egoera ezberdina da (1.13. irudia, gorria). Kanpo eragilearekiko esposizioa ahurdun dagoen indibiduo emean ematen bada, indibiduo emeak hozi zelula garatuak izango dituen enbrioi bat izango du barnean, eta, ondorioz, ez da herentzia transgenerazionala kontsideratzen F3 belaunaldia sortu arte (Bodnar, 2018).



1.13. irudia. Belaunaldiz belaunaldiko herentzia epigenetikoa. Irudi honetan herentzia intergenerazionala eta transgenerazionala bereiztu ditzakegu. F0 belaunaldia, kanpo faktorearen eragina edo esposizioa eduki duten indibiduoek osatzen dute. Herentzia intergenerazionalaz hitz egiten dugunean, F1 belaunaldiaz ari gara orokorrean, eta transgenerazionalaz hitz egiten dugunean berriz, F2 belaunaldiaz. Hala ere, emakumeetan kanpo faktorearekiko esposizioa ahurdun daudenean emanez gero, bere lehengo bi belaunaldiak herentzia intergenerazionalaren parte izango dira eta herentzia transgenerazionala, F3 belaunalditik aurrera (Irudi moldatua; Otterdijk & Michels, 2016).

Aipatu ditugun azterketa epidemiologiko horiek kanpo faktoreek ondorengo belaunaldietan eragindako ezaugarri fenotipokoak aztertzeke aukera ekarri bazuten ere, horien bidez ez zen erlazonaturiko ebidentzia molekularrik topatu. Ondorio fenotipoko heredagarriak bideratzen dituen kanpo faktorearen lehen adibide garbia “vinclozolin” fungizida izan zen (Anway et al, 2005). Kimiko horrek aldaketa epigenetiko egonkorak sortzen ditu, eta marka epigenetiko horiek ondorio fenotipoko jakinekin erlazonatu dira. Harrezkero, herentzia epigenetiko transgenerazionalan eragina duten kanpo faktore gehiago deskribatu dira: jaiotze aurreko alkohola (Govorko et al., 2012), nikotina (Zhu et al., 2012) edota opioideak (Vassoler et al., 2014), besteak beste. Hala ere, kanpo faktoreek

eraldaketa epigenetikoengan duten eregin erreala, eta ondorengoetara iragateko duten aukeraren inguruan, hori baimentzen duten mekanismo molekularrekin batera, asko geratzen da ikertzeko.

1.3.2. SISTEMA OPIOIDEA

Sistema opioidea, zelula barneko komunikazio sistema bat da, eta sistema hori hartzaile opioideez, barne-peptido opioideez (BPO) eta andeakuntza-prozesuetan parte hartzen duten entzimez osatua dago. Nagusiki minaren eta plazerraren erregulazio prozesuekin erlazionatzen bada ere, izugarritzko garrantzia du zelulan eta zelula barneko gainerako prozesu fisiologikoetan (Dickenson et al., 2005; Zollner & Stein, 2007; Fabbri et al., 1989; Subiran et al., 2011; Bodnar, 2018). Izan ere, zelula barneko seinaleztapen bidezidor ezberdinak pizten ditu, horien artean: adenilato ziklasaren inhibizioa, boltai menpeko kaltzio kanalen inaktibazioa, potasio kanalen aktibazioa, kaltzio erreserben mobilizazioa eta MAPK-en transdukzio bideen estimulazioa (Waldhoer et al., 2004).

Hartzaile opioideak, G proteinetara akoplaturiko hartzaileen taldeko kideak dira (GPCR), eta 7TM egitura dute. Hau da, zelulaz kanpoko N- domeinua, mintz arteko 7 domeinu, eta zelula barneko C- domeinua. Hartzaile-opioideen artean hiru mota nagusitzen dira: mu hartzailea (μ = mu, ingelesezko *μ opioid receptor*; MOR), delta hartzailea (δ = delta, ingelesezko *δ opioid receptor*; DOR) eta kappa hartzailea (κ = kappa, ingelesezko *κ opioid receptor*; KOR) (Lord et al., 1977). Horiez gain, aurrerago oso antzekoa den beste hartzaile opioide bat ere deskribatu da: nozizeptina hartzailea (ingelesezko *nociceptin opioid receptor*; NOR) (Mollereau et al., 1994; Wick et al., 1994). Lau hartzaileek, %60ko antzekotasuna dute sekuentziari dagokionez, eta portzentai hori %73-76koa izatera iristen da mintzeko domeinuak konparatzen baditugu (Minami et al., 1995). BPOen eraketari dagokionez, nerbio sistema zentralean aurkitzen diren peptido gehienak (guztiak, karnosina dipeptidoa eta glutation tripeptidoa izan ezik) neuronetako erribosometan sortzen dira molekula-peptidiko aitzindarien bidez (Siegel et al., 1993). Molekula aitzindari horiek eratzen dituzten geneak lau dira: 1) proentzefalina (PENK), nerbio sistema zentralean eta muin adrenalean sintetizatzen da, eta zazpi peptido opioide sortzen ditu, ezagunena entzefalina izanik (Comb et al., 1982); 2) propiomelanokortina (POMC), β -endorfina bezalako BPOak sortzeaz gain, hormona adrenikortikotropikoa (ACTH), α eta β -lipotropinak (LPH), eta α eta β - melanotropinak (MSH) ere sortzen ditu

(Nakanishi et al., 1979); 3) prodinorfina (PDYN), A eta B dinorfinak, eta β -neo-endorfina bezalako BPOak sortzen ditu (Kakidani et al., 1982); eta azkenik, 4) pronociceptina (PNOC).

BPOen jarduera, hartzaile opioideekin elkartzeko duten gaitasunari esker ematen da, eta hori inaktibatua izan daiteke zenbait entzimen bidez. Orain arte, 20 BPO inguru identifikatu dira, eta ugaztunetan deskribatu izan direnak honako hauek dira: met-entzefalina, leu-entzefalina, β -endorfina, dinorfina A, dinorfina B, α -neoendorfina, nozizeptina, eta endomorfinak (Florez-Beledo et al., 1998). BPOen funtzionamenduari dagokionez, ikerketa batzuek iradoki dutenez, BPOek bere hartzaileekiko duten afinitatea ez da eskusiboa izaten (Subiran et al., 2011). Met eta leu-entzefalinek, esaterako, DOR-ekiko afinitate altua badute ere, MOR-era elkartzeko gai izaten dira ere, nahiz eta horretarako duen afinitatea txikiagoa izan. β -endorfinen kasuan, berriz, MOR eta DOR-ekiko duten afinitatea antzekoa da, eta dinorfinak KOR-era batzen dira. Peptido opioide horien inaktibazioaz arduratzen diren entzimak peptidasak dira, N aminopeptidasa (APN) eta N 24.11 endopeptidasa neutrala (NEP), zehazki; entzima horiek biologikoki aktiboak diren peptidoak apurtuz lortzen dute inaktibazioa (Subiran et al., 2011; Iversen, 1987).

G proteinetara loturiko gainerako hartzaileen antzera, hartzaile opioideek zenbait erantzun zelular eragiten dituzte, eta hori G proteinen inhibitzaileak diren Gai/Gao azpiunitateen ekintzaren bitartez gauzatzen dute. Hartzailea aktibatua denean, adenilato ziklasaren (cAMP) inhibizioa gertatzen da neuronetan, eta horrek zelula barneko cAMP mailaren jaitsiera bat ekartzen du, cAMP-menpeko proteina kinasaren (PKA) funtzionamendua inhibituz (Koch & Hollt, 2008). Horren bidez, zelula barneko eta nukleoko proteina askoren fosforilazio-egoera kaltetua edota eraldatua geratzen da, transkripzio mailan aldaketak emanez. Hortaz, sistema opioidea osatzen duten hartzaile eta peptido horiek opioideekiko tolerantziaren edota abstinentsia sindromearen eragile nagusiak direla esan daiteke (Loreno et al., 1999). Peptidoen Gai azpiunitatearen aktibazioak, boltai-menpeko kaltzio kanalen inaktibazioa eta potasio kanalen aktibazioa ekartzen du (Law et al., 2000). Bestalde, opioideek hartzaile opioideen fosforilazioa burutzen dutenean, MAPK bidezko seinaleztapen bidezidorraren aktibazioa bultzatzen da, zenbait proteina gakoren aktibazioa gauzatuz: ERK, p38 edota JNK (Law et al., 2000; Al-Hasani & Bruchas, 2011). NOR-en kasuan, ERK proteina aktibazioa C fosfolipasaren (PLC) aktibazioaren bidez ematen da (Fukuda et al., 1998; Lou et al., 1998). Hartzaileen erantzun molekularrak nerbio ehunetako aktibitate bioelektrikoaren inhibizioa, eta neurotransmisoreen askapenaren inhibizioa eragiten du. MOR eta DOR-en aktibazioa gertatzen denean, aldiz, zelulen mintzaren hiperpolarizazioa eta jarduera bioelektriko neuronalaren inhibizioa ematen da, eta horrek, potasio kanalak irekitzea eta agonisten bidezko zelula barneko kaltzioaren askapena bultzatzen du (Williams & Clouet, 1982).

Azkenik, KOR aktibatzen denean tentsioaren menpeko kaltzio kanalen inaktibazioa ematen da, eta horrek kaltzioa neurona barrura sartzea eta neurotransmisoreen askapena ekiditen du (Lorenzo et al., 1999; Surprenant et al., 1990).

Sistema opioidearen funtzio ezagunena minaren ezabapenarekin edo analgesiarekin erlazionatu badago ere, bestelako funtzio biologiko esentzialekin ere erlazionatu da, eta funtzio mota hori opioide motaren eta aktibatutako hartzailearen arabera izaten da (Fabbri et al., 1989). Aldi berean, sistema opioideak arazoak ugari sortzen ditu funtzio fisiologikoen modulazioan: depresioan, gaixotasun mentaletan eta aldarte aldaketetan, tolerantzian eta mendekotasunean, estresan, oroitzapenean eta ikaskuntza funtzioetan, elikadura portaeran, drogen eta alkoholaren abusuari, sexu aktibitatean eta prozesu hormonaletan, haurdunaldian, garapenari eta endokrinologian, gorputz dardaran eta gaixotasun neurologikoetan, jarduera elektrikoan eta neurofisiologian, aktibitate orokorrean eta lokomozioan, funtzio gastrointestinalak, giltzurrun eta gibel funtzioan, odol presioaren eta erantzun kardiobaskularraren erregulazioan, arnasketan eta erantzun termoerregulatzailen modulazioan, eta erantzun immunologikoetan (Bodnar, 2020).

Epigenetikak sistema opioidean duen inplikazioaren inguruan dagoen ezagutza ez da oso handia. Sistema opioidea osatzen dituzten hartzaile eta peptidoen eginkizun biologikoa guztiz ezagutzeko azterketa sakonagoak burutu behar dira, eta horretarako testuinguru fisiologiko eta farmakologiko ezberdinetan ikerketak gauzatzea ezinbestekoa da, interes berezia jarriz tratamendu eta tratamendu osteko erregulazio transkripzionalaren azterketan. Edonola ere, orain arte buruturiko ikerketek hartzaile opioideek erregulazio epigenetikoak badutela berretsi dute: DNAREN metilazioari dagokionez, *Oprm1*, *Oprd1* eta *Oprl1* geneetan erregulazio transkripzionalaren aldaketa ekartzen duen modulazioa frogatu da; Histonen eraldaketei dagokienez, berriz, lau hartzaileetan behatu da erregulazioa; eta azkenik, RNA ez-kodetzaileetan *Oprm1* hartzailearen kasuan soilik ikusi da. Lau hartzaileen gune sustatzaileen artean antzekotasunak badaude ere, horien erregulazio epigenetikoak desberdina da kasu bakoitzean. Peptido opioideen aitzindariak ere epigenetikoki erregulatu dira: DNAREN metilazioa eta histonen eraldaketak lau peptidoetan berretsi dira; eta RNA ez-kodetzailea, berriz, *Pomc* eta *Penc* kasuetan, soilik. Kasu horretan ere, mekanismo ezberdinak erabiltzen dira horien adierazpena erregulatzeko, eta, ondorioz, adierazpen eredu ezberdinak dituzte. Hori garrantzitsua da geneen adierazpenaren eta ehunaren espezifikotasuna eskuratzeko. Hortaz, sistema opioidea osatzen duten gene horien adierazpena ingurumen-faktoreen bidez aldatuak izan daitezke tenporalki eta espazialki modulatu, jada korapilatsua den erregulazio sistema are gehiago konplikatu (Muñoz et al., 2015).

1.3.3. KANPO FAKTOREAK: MORFINA

Geneen adierazpenean aldaketak eragiten dituzten kanpo faktoreen artean, menpekotasuna sortzen dituzten drogak daude. Opioideetatik eratorritako substantziak, esaterako, droga horien artean topatzen dira, eta frogatu ahal izan denez, opioideen gehiegizko erabilerak aldaketa epigenetiko nabarmenak sortzen ditu (Zhu et al., 2012; Byrnes et al., 2011; Byrnes, 2005; He et al., 2006; Novikova et al., 2008; Saab & Mansuy, 2014). Opioide esanguratsuenetariko bat morfina da, eta substantzia hori opioaren osagarri aktiboenetariko bat da. Morfina, oso erabilia da medikuntzan bere balio terapeutikoak direla eta, analgesia eta sedazioa bezalako eragin fisiologikoak lortzeko kasu. Hala ere, hainbat albo-efektu kaltegarri ere badituela deskribatu da (Subiran et al., 2011). Morfinaren eragin fisiologiko horiek, hein handi batean, MOR hartzailerekin burutzen dituen elkarrekintzen ondorioz ematen dira. Jada aipatu dugun moduan, MOR hartzailera Oprm1 genearen bidez eratzen da, eta horrek ondorio esanguratsuak eragiten ditu analgesian, tolerantziaren garapenean eta mendekotasun fisikoaren sorreran. MOR da opioide endogenoen, opiazeoen (morfina, metadona eta heroina) eta medikamentu analgesiko opioideen ekintza jasotzen duen lau hartzaille-opioideetan nagusia (Kreek et al., 2002).

Morfinak sortu ditzakeen aldaketa epigenetikoak mota askotarikoak dira, eta horren inguruan burutu diren ikerketak eta eskuratu diren ebidentziak esanguratsuak dira oso. DNAREN metilazioan eta hidroximetilazioan oinarritutako ikerketa gehienak, gene partikularrek tratamendua eta gero aurkeztzen dituzten metilazio mailetan zentratu dira, eta nagusiki, garunean zentratu izan dira. Izan ere, garuna da morfinaren itu organo garrantzitsuena. Ikerketa gehienak burmuinean eragiten dituen aldaketetan zentratu badira ere, beste ehun espezifikoetan ere aztertzeko saiakerak egin dira, odolean edota esperman esaterako (Cecil et al., 2015; Chorbov et al., 2011). Horiek guztiek, argi utzi dute metilazio-patroian emandako aldaketa-joerak ez direla berdinak kasu guztietan, ehun edo zelula motaren arabera izaten direlarik (Barrow et al., 2017). *In vivo* kokainarekin burututako entseguek (Novikova et al., 2008; Tian et al., 2012), eta *in vivo* morfinarekin zelula neuronaletan burututako entseguek, genomaren hipometilazio globala eragiten dutela adierazi zuten (Trivedi et al., 2014); zelula barneko erredox egoera aldatuz metilo taldearen presentzia baldintzatua geratzen da S-adenosil metioninaren (SAM) eskuragarritasun maila jaitsiz (metilo taldearen emaitza nagusia). Aitzitik, jaitsiera hori ez da kasu guztietan ikusten. Leukozitoetan, esaterako, morfinak kontrako efektu bat eragiten du (Doehring et al., 2013). Heroinara lotuta dauden gizakietan ere, DNAREN

hipermetilazioaren berri eman izan da geneen exoi eta gorputz ugaritan (Kozlenkov et al., 2017). Azkenik, burmuineko hainbat eskualdetan metilazio-patroiaren joera bera hauteman da (Barrow et al., 2017).

Morfinak metilazioan aldaketak sortzeaz gain, histonetako eraldaketetan eta ncRNAtan ere aldaketak eragiten ditu, eraldaketa epigenetiko horiek analgesiaren, tolerantziaren garapenaren eta mendekotasun fisikoaren sorreran parte hartzen dutelarik (Bali & Kuner, 2014; Lutz et al., 2014; Zheng et al., 2012; Toyama et al., 2017). Adibidez, nukleo accumbens-etan eta burmuineko beste hainbat eremuetan histonen metilazio aldaketak topatu dira (Maze et al., 2010; Sun et al., 2012), zenbait geneen adierazpena handituz (Rice & Allis, 2001). Histonen azetilazioak ere kaltetuta agertu dira arratoietan bururutako morfinaren tratamenduarekin (H3K14 histonaren azetilazioa) (Sheng et al., 2011; Wang et al., 2014; Wang et al., 2015). ncRNAei dagokionez, ostera, eretrotransposoiien familiako LINE-1 molekulek drogen menpekotasun prozesuan parte hartzen dutela deskribatu da (Maze et al., 2011; Prak & Kazazian, 2000).

Hortaz, morfinak organismoaren barnean eragiten dituen aldaketa epigenetikoak eta eragin fisiologikoak nabariak badira ere, aldaketa horiek hurrengo belaunaldietara heredatu daitezkeen edo ez, argitzeko dago oraindik. Hala ere, azken urteetan bururutiko zenbait ikerketek morfinak eragindako efektu fenotipokoan herentzia bat badagoela baieztatu dute, belaunaldiz belaunaldiko herentzia epigenetiko bat egon daitekeela iradokiz. Ikerketa horiek, morfinak hurrengo belaunaldiek duten analgesiaren tolerantzian eta portaera aldaketan eragin dezakeela nabarmendu dute (Gapp et al., 2014; Byrnes et al., 2011; Byrnes, 2005; Hammoud et al., 2009). Arratoietan bururutiko zenbait ikerketek, esaterako, morfinak portaeran izan ditzakeen ondorioez gain, dopaminaren seinaleztapen bidezidorrean, plastikotasun sinaptikoan eta egitura neuronaletan eragin ditzakeen aldaketak deskribatu dituzte (Yohn et al., 2015; Byrnes et al., 2013; Cicero et al., 1991; Sarkaki et al., 2008; Vyssotski, 2011). Horrez gain, morfinak sexuari loturiko herentzia diferentzial bat sortzen duela erakutsi dute horren inguruan bururutiko entsegu batzuek, sortzen dituen aldaketa fenotipokoak ezberdinak direlarik sexuaren arabera. Emeen belaunaldi berriek, antsietatea jasateko joera handiagoa erakusten dute, eta arren kasuan, ordea, morfinarekiko analgesiaren garapen bat aurkezten dute. Tratamendu intentsitatea handitzean, berriz, analgesiarekiko tolerantzia izatera pasatzen dira (Gapp et al., 2014; Byrnes et al., 2001; Byrnes, 2005; Hammoud et al., 2009).

Morfinak eragiten dituen aldaketa fenotipokoek belaunaldi arteko transmisioa izan dezaketela baieztatzen duten ebidentziak badaude ere, horren atzean dauden mekanismo epigenetikoaren inguruan oso gutxi ezagutzen da, bereziki ugaztunotan (Muñoz

et al., 2015). Soilik, belaunaldi bakar bateko herentzia epigenetikoak topatu izan da ugaztunetan (Gapp et al., 2014; Byrnes et al., 2010; Yohn et al., 2015). Herentzia hori ahalbidetzen duten bektoreak ugal-organoetako hozi zelulak dira; izan ere, horiek dute informazio epigenetikoak ondorengo belaunaldietara pasatzeko gaitasuna. Hortaz, bertan topatzen diren eraldaketa epigenetikoak baldintzatuko dute hurrengo belaunaldiko indibiduen patroia epigenetikoak, horren arabera fenotipoa agerraraziz (Heard & Martienssen, 2014; Jablonka & Raz, 2009). Hori dela eta, eraba interesgarria da hozi zelula horietan belaunaldi batetik bestera transmititu daitezkeen marka epigenetikoak zein izan daitezkeen identifikatzea, jokoan sartzen diren mekanismoen inguruan dugun ezagutza handitzeko helburuarekin.

Laburbilduz, morfinak eragindako aldaketa fenotipokoak ondorengo belaunaldietan mantendu daitezkeela argi badago ere, hori ahalbidetzen dituzten aldaketa epigenetikoak eta mekanismoen ezagutza oso txikia da. Ondorioz, garbi dago oraindik lan asko geratzen dela gai horren inguruan ezagutza orokor bat eskuratzeko. Gainera, gai horrek medikuntzan duen garrantzia ikaragarri handia da; ernalkuntzaren ondoren modu naturalean gertatzen diren birprogramazioetako mekanismoak xehetasun handiarekin ezagutzeak, birprogramazio prozesu horretatik alde egiten dituzten mekanismoak ezagutzeko aukera eskaintzen du. Modu berean, birprogramazioan ematen diren mekanismo epigenetikoak ezagutzeak tumoreen formakuntza eta zahartze prozesua bezalako prozesu patologikoak argitzen edota ulertzen laguntzen dute. Hori dela eta, enbrioaren aurre-ezarpen etaparen ikerketa nahitaezkoa bihurtu da biomedikuntzako zenbait arloetan: ugalkortasunean, ugalketa-bideratuaren aplikazioan, terapia zelularrean, zelula amen ekoizpenean, ikerkuntzarako animalia transgenikoen ekoizpenean, eta minbizi edota zahartze prozesuan. Horrez gain, kanpo faktore moduan morfina erabiltzeak, horren bidez lorturiko informazioak bestelako substantzia jakinek gure osasunean izan ditzaketen ondorioak aztertzeak aurrekari moduan balio dezake; kanpo faktoreek eraginda aldaketa epigenetikoak pairatzeko aukera gehien dituzten sekuentziak identifikatzea aurrerapauso handia izan daiteke etorkizunean burutuko diren azterketetarako.

2. HIPOTESIA ETA HELBURUAK

Organismo baten garapena, morfologia eta fisiologia haren patroia epigenetikoak bideratzen du. Garapen hori oso koordinatua dago, eta organismoaren garapen egoki bat bermatzen du, zelularen edota ehun mota bakoitzaren funtzinamendua zehaztuz. Hala ere, patroia hori aldatua izan daiteke ingurumen-faktoreen bidez (Jaenisch & Bird, 2003; Turner, 2011), eta ikusi denez, belaunaldi batetik bestera iragan daiteke (Heard & Martienssen, 2014). Horrela, kanpo-faktore horiekin kontaktu zuzena izan duten izaki bizidunek eragin nabarmenak pairatzeaz gain, denbora zehar mantendu daitezke, memoria zelularra eta belaunaldiz belaunaldiko oroimen egokia ziurtatzen dituzten mekanismoetatik ihes eginez, eta, ondorioz, gure osasunean eraginez.

Morfinak oinazearen aurrean funtzio terapeutikoak baditu ere (Subiran et al., 2011) albo efektu ugari ditu, eta mendekotasuna sortzen duten bestelako drogen modura, belaunaldi arteko herentzia sortu dezake (Gapp et al., 2014; Yohn et al., 2015; Byrnes et al., 2011; Byrnes, 2005; Hammoud et al., 2009; Byrnes et al., 2013). Ondorioz, opioide horrek gure gizartean duen onarpena kontuan hartuta horren erabilpenaren arriskuak modu sakonago batean aztertzeak sekulako interesa du. Beraz, hautagi paregabea da gure ikerketan kanpo faktore moduan erabili, eta memoria epigenetikoan dituen eragin zehatzak aztertzeko.

Aipaturiko aurrekariak kontuan hartuta, morfinak eragin ditzakeen eta zelula-oroimenerako garrantzitsuak izan daitezkeen mekanismo epigenetikoak argitzea da doktore-tesi honen helburu nagusia. Prozesu-komplexu hori ulertzeko, ezinbestekoa da, morfinak eragindako aldaketa epigenetikoak, eta horien eragin zelular eta fisiologikoa ezagutzea. Aldaketa horien ezagutzak, oroimen zelular epigenetikoan nola eragiten duten ulertzea erraztu dezake, horren atzean dauden mekanismo epigenetikoak aztertzeko ateak irekiz. Horrenbestez, hauek dira nire tesian aztertuko ditugun helburu nagusiak:

1. Helburua: Morfinaren tratamenduak DNAREN metilazioaren patroian sortzen dituen aldaketak aztertzea, maila zelularrean eta fisiologikoan izan ditzakeen eraginak bereiztuz.

2. Helburua: Morfinaren tratamenduarekiko sentikorrek diren eta DNAREN metilazioaren bidez eraginda dauden gene-dianen identifikazioa, memoria epigenetikoan eragiteko potententziala duten geneetan zentratuz, belaunaldi batetik bestera iragateko hautagaiak izanik.

3. MATERIALAK ETA METODOLOGIA

3.1. Materialak

Atal honetan, nire tesian zehar gauzaturiko esperimentaziorako behar izan ditugun materialak aipatuko ditugu: laborategian eskuragarri izan genituen gailuak, errektibo komertzialak eta eginiko edo preparaturiko soluzio eta tanpoiak, hurrenez hurren. Azken atal horretan, soluzio bakoitza prestatzeko beharrezkoa izan genuen informazioa ere adieraziko dugu. Guzti hori, erabat beharrezkoa izan zen esperimentazioa modu egoki eta eraginkor batean burutu ahal izateko.

3.1.1. GAILUEN ZERRENDA

Laborategian erabili genituen gailu guztiak ondoren aurkezten dugun 3.1. taula honetan jaso ditugu.

3.1. taula. Esperimentaziorako erabili diren gailuen zerrenda.

Gailua		Etxe Komertziala
Zelulen hazkuntzarako CO2-dun inkubagailua	MCO-15AC	Sanyo
Fluxu laminar bertikaleko kanpaia	F72600350	Faster Bio 48
Errotore baskulantedun zentrifuga	Heraeus MegaFuge 40R	Thermo
Mikroskopia alderantzikatua	Axioscope EclipseTS100	Nikon
Mikroskopia fase-kontrasteduna	NiconEclipse 50i-H550S	Nikon
Mikroskopia atxikitako kamera	D07739	Jenoptik
Lupa Mikroskopia	Sz51	Olympus
Neubauer	0640010	Paul Marienfeld
Ur-bainu termostatikoa	TBN-06/100	ICT SL
Nitrogeno likidorako tankea	GT-40	Air Liquide
Mr Frosty edukiontzi izotzailea	Mr Frosty	Thermo Fisher Scientific
Magnetic stirrer	ARE Heating Magnetic Stirrer	VELP Sientifica
Magnetic stirrer	MMS-3000	biosan
Timer Clock ordularia		LabBox
Balantza	AE200	Mettler

Balantza	AD-J	KERN
Mikrozentrifuga	Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuga	5424R	Eppendorf
Zentrifuga	5702	Eppendorf
Zelula homogenizatzailea (Ultraturrax)	D-1 30170	MICCRA
Homogeneizagailua	Heidolph GIRALT	Heidolph
Fluorometroa	Qubit 4 fluorometer	Invitrogen
Fluorometroa	FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech
Elektroforesi eta transferentzia euskarriak		Bio-Rad
WB-erako energia hornidura	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad
Inkubagailu lehorra	Hotcold S	Selecta
Balantzina	Duomax 1030	Heidolph
WB kubeta	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis	BioRad
WB kubeta	Criteion Blotter	BioRad
Chemidox XRS sistema	Chemidoc XRS	Bio-Rad
Espektrofotometroa	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Termozikladorea	Mycycler	Life technologies, BioRad
qPCR detekzio sistema	PerkinElmer CFX96 Real Time	BioRad
Plaka zentrifuga	Sorvall RT 7	Sorvall
Bortize nahasgailua	Zx ³	VELP Scientifica
Termoblokea	AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet international Inc.
Irabiagailu eta berogailua	Thermomixer	Eppendorf
pH metroa	pH meter GLP21	Crison
Sonikatzailea	Soniprep 150	Soniprep&Process Timer MSE
Ultrasonikatzailea	LE220	Covaris

3.1.2. ERABILITAKO ERREAKTIBOEN ZERRENDA

Laborategian erabili genituen erreaktibo komertzialak, berriz, hurrengo taula honetan zerrendatu ditugu (3.2. taula).

3.2. taula. Esperimentaziorako erabili diren erreaktiboen zerrenda.

Erreaktiboak	Erreferentzia	Etxe komertziala
PBS 10X	BE17-517Q	Lonza
TrypLE Express Enzyme (1x)	12605028	ThermoFisher
ReLeSR	05872	StemCell Techn. Inc.
Txerriaren azaleko gelatina	G189	Sigma-Aldrich
hESC-qualified Matrigel	354277	Corning
Knock Out DMEM hazkuntza medioa	10829-1018	Gibco
mTeSR1 medium	85870	StemCell Techn. Inc.
KSR	10828-028	Gibco
C3H3NaO3 (Sodium pyruvate)	S8636	Sigma-Aldrich
Aminoazido ez-esentzialak (NEAA)	M7145	Sigma-Aldrich
Penizilina/estreptomizina antibiotikoa	P4333	Sigma-Aldrich
L-Glutamina	G7513	Sigma-Aldrich
B-Mercaptoetanol-a	146250	Sigma-Aldrich
GKF3 inhibitzailea	BX33140	StemCell
MEK ½ inhibitzailea	04-0006	Stemgent
LIF inhibitzailea	ESG1107	Sigma-Aldrich
Morfina hidrokloruroa (98,8%-ko purutasuna)	1/13	Alcaliber S.L
DMSO	SU01502500	Scharlau
DMEM/F12 hazkuntza medioa	H3BE12-741F	Lonza
N2	17502-048	Gibco
Intsulina	16634-50MG	Sigma-Aldrich
Apotransferrina	T1428	Sigama-Aldrich
Progesterona	P0130	Sigma-Aldrich
Putreszina	51799	Sigma-Aldrich
Na ₂ SeO ₃ (Sodium selenite)	S5261	Sigma-Aldrich
Neurobasal hazkuntza medioa	21103-049	Invitrogen
B27	17504-044	Gibco
Activin A	120-14E	Preprotech
bFGF	13256-029	Invitrogen
Fibronectina	FC010	Millipore
Lipofectamine 3000 erreaktibo	L3000008	Thermo Fisher

Opti-MEM errektiboa	31985062	Thermo Fisher
C₂₂H₂₉N₇O₅ · 2HCl (Puromycin dihydrochloride)	P7255	Sigma-Aldrich
PMSG hormona	G4527	Sigma-Aldrich
hCG hormona	C8554	Sigma-Aldrich
Hialuronidasa	H1136	Sigma-Aldrich
EmbryoMax KSOM hazkuntza medioa	MR-020P-5F	Merck-Millipore
Parafinazko olio	18512-1L	Sigma-Aldrich
Hepes	H3375	Sigma-Aldrich
KCl	P9541	Sigma-Aldrich
EGTA	E4378-25	Sigma-Aldrich
EDTA	1084180250	Merck
Sakarosa	131621.1211	Panreac
TritonX-100	X100	Sigma-Aldrich
Glizerola	G7757	Sigma-Aldrich
DTT	DTT-RO	Sigma-Aldrich
Azetona	BPA181	Fisher Chemicals
cOmplete, Mini, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail	0469315900 1	Roche
Pierce BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Scientific
Precision Plus Protein Dual Color Standards	1610374	BioRad
30% Acrilamida/Bis Soluzioa 29:1	1610156	BioRad
N,N,N',N'-Tetrametiletileneadamina TEMED	T9281	Sigma-Aldrich
Amonio persulfatoa (PSA)	A3678	Sigma-Aldrich
0.2µm PVDF mintzak	10600021	Sigma-Aldrich
Behitik eratorritako serumeko albumina (BSA)	A7906	Sigma-Aldrich
Trizma Base	T1503	Sigma-Aldrich
SDS	142363.1209	PanReac
Bromofenol urdinaren sodio gatza	B5525	Sigma-Aldrich
Glizina	G8898	Sigma-Aldrich
MetOH	141091.1214	PanReac
NaCl	31414	Sigma-Aldrich
Luminola	A8511	Sigma-Aldrich
Azido p-kumarikoa	C9008	Sigma-Aldrich
H₂O₂	H1009	Sigma-Aldrich
NH₂C(=NH)NH₂ · HSCN (Guanidine thiocyanate)	G6639	Sigma-Aldrich
NucleoZOL errektiboa	740404.200	Macherey-Nagel
CHCl₃ (Chloroform)	CL01981000	Scharlau
Isopropanola – 2-propanol	A3928	Panreac AppliChem
Analisirako etanol absolutua	121086	Panreac AppliChem
DEPC-rekin trataturiko ur ultrapurua	750023	ThermoFisher Scientific
Midori Green	MG40	Nippon Genetics Europe

		GmbH
EZ Load 100 PCR Molecular Ruler	170-8353	BioRad
Agarosa	118282B	BioRad
Arcturus® PicoPure™ DNA Extraction Kit	KIT0103	ThermoFisher
iScript cDNA sintetizatzeke Kita	1708891	BioRad
SMARTer Universal Low Input RNA Kit	634940	Takara
iTaq Universal SYBR Green Supermix	1725121	BioRad
DNA degradase plus erreaktiboa	E2020	Zymo Research
DNA standard set kit	D5405	Zymo Research
C ₆ H ₆ O (Phenol)	P4557	Sigma-Aldrich
C ₂ H ₃ NAO ₂ (Sodium acetate)	W302406	Sigma-Aldrich
Azido azetiko glaziala	211008.1211	Panreac
RNAse	EN0531	ThermoFisher
Proteinase K	25530049	ThermoFisher

3.1.3. PRESTATUTAKO SOLUZIOEN ZERRENDA

Azkenik, laborategian prestatu genituen soluzio guztiak ondorengo taula honetan (3.3. taula) jaso ditugu. Soluzio edo tanpoi bakoitza prestatzeko beharrezkoa den informazioa bertan dago adierazita, osagai guztiak eta beraien kontzentrazio finalak edota beharrezko kantitateak zehaztuz.

3.3. taula. Laborategian prestatu diren soluzioen zerrenda.

Soluzioa	Osagaiak
Kargatze-tanpoia 4X	250mM Tris-HCl pH 7.5, %40 glizerola, %4 SDS, %0.025 Bromofenol urdina p/b. *Lagina preparatzean %5 DTT p/b gehitu.
Tris-HCl 1M pH 8.8	1L: 121.14g Tris-Base, HCl pH 8.8-an kokatzeko.
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1L: 62.07g Tris-Base, HCl pH 6.8-an kokatzeko.
Sodio dodezil sulfatoa (SDS) %10	10g SDS 100 ml H ₂ Otan.
Persulfato amonikoa (PSA)	1g persulfato amoniko 10 ml H ₂ Otan.
Elektroforesi indargetzailea - 10x	250mM Tris-Base pH 8.3, %1 SDS, 2M Glizina.

Transferentzia Indargetzailea - 10x pH 8.3	250mM Tris-Base, %0.25 SDS, 1.92M Glizina. *Erabiltzerako garaian %20 metanol gehitu.
Blokeo soluzioa	%5 BSA p/b Blotton.
Garbiketa Indargetzailea-a (Blotto)	20mM Tris, 150mM NaCl, %0.1 Triton X-100.
Kimioluminiszentzia areagotzailea (ECL)	1.25mM luminol, 0.2mM azido p-kumarikoa, 0.1M Tris-HCl pH 8.5. *Erabiltzerako garaian %0.3 H ₂ O ₂ gehitu.
RNA/DNA TAE Elektroforesi indargetzailea - 10X	1L: 242g Tris-Base, 57.1ml azido azetiko glaziala, 0.5M EDTA.
DNAren lisirako indargetzailea	100mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 200mM NaCl. *Erabiltzerako garaian %0.2 SDS gehitu.
Sodio Azetato 3M pH 7.0	1L: 246g Sodio azetato anhidridoa, azido azetiko glaziala pH 7.0-an kokatzeko.
TE/NaCl Indargetzailea	10mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 50mM NaCl.
TE Indargetzailea	1mM Tris pH 8, 1mM EDTA.
"A Indargetzailea"	100mM Hepes pH 7.8, 150mM KCl, 10mM EGTA, 10mM EDTA, 3.2M Sukrosa, %3 Triton X-100, 1 M DTT.
"Gatz gutxiko Indargetzailea"	100mM Hepes pH 7.8, 150mM KCl, 10mM EGTA, 10mM EDTA, 80% Glizerola, 1M DTT.
"Gatz askoko Indargetzailea"	100mM Hepes pH 7.8, 4M KCl, 10mM EGTA, 10mM EDTA, %80 Glizerola, 1M DTT.

3.2. Laginak

Atal honetan nire tesiko esperimazioan erabili ditugun lagin biologikoen inguruan hitz egingo dugu. Horri dagokionez, bi esperimazio eredu mota nagusi ezberdin ditzakegu. Alde batetik, *in vitro* prozedura esperimentalak, non gauzatuko ziren esperimazioak kultibotan eta kondizio artifizialeetan mantentzen diren zelulen bidez burutu ziren. Eta beste alde batetik, *in vivo* prozedura esperimentalak, non gauzatuko ziren prozedura esperimentalak modu autonomoan bizirik egon daitezkeen organismoen gain burutu ziren. Tesi lanean zehar erabili genituen bi prozedura horiek hurrengo bi azpiataletan azaldu ditugu.

3.2.1. *In vitro* prozedura esperimentalak: ZELULAK

In vitro prozeduren barruan, kultibotan mantendu genituen zelula lerro ezberdinen hazkuntza eta mantenuaz aparte, horiengan burutu genuen morfinaren tratamendu kronikoa gauzatzeko pausuak, eta bestelako zenbait prozedura azalduko ditugu: zelula amen diferentziazio prozesua, eta zelulen transfekzioa *knockout* lerroak eratzeko, besteak beste.

3.2.1.1. Zelula lerroak eta bakoitzaren kultiboa

Erabili genituen zelula lerroak bi dira, hurrengo bi azpiataletan apaituko ditugun moduan. Hala ere, esperimentazioaren zati handiena lehenengo zelula lerroarekin gauzatu genuen nagusiki, hots, mESC zelulekin.

3.2.1.1.1. Sagu blastozistoen barne masatik eratorritako zelula amak (mESC)

Ikerketa proiektu honetan *in vitro* buruturiko esperimentuetarako sagu-enbrioien barne masatik eratorritako zelula amen (mESC) lerro zelular komertzial bat erabili genuen, *Mouse Oct4-GFP ES Cells* (PCEMM08, PrimCells LLC.) izenekoak, zehazki. Zelula lerro horrek GFP proteina fluoreszentea adierazten du OCT4 genearen sustatzailearen menpe.

Zelula horien kultiboa beraien jatorrizko ezaugarriak mantentzea ahalbidetzen duen medio baten laguntzaz gauzatu zen, *Knock Out Serum DMEM* hazkuntza medioa. Hala ere, erabili aurretik osagai ezberdinekin osatzen zen: KSR-a %15eko amaierako kontzentrazioan (ingelesezko *KnockOut Serum Replacement*; behi umekiaren sueroaren (edo FBS-aren) ordez erabiltzen da zelula amen pluripotenzia mantentzeko), Na Pirubatoa %1ean ($C_3H_3NaO_3$), aminoazido ez-esentzialen soluzioa %1ean, penizilina-estreptomizina %1ean, L-Glutamina %1ean eta β -Mercaptoetanol %0.07an. Horrez gain, hainbat bide zidorren inhibitzaileak ere gehitzen ziren medioa erabiltzerako garaian (azken unean): 10mM PD0325901, 30mM CHIR99021 eta 1000U/ml LIF (ingelesezko *leukaemia inhibitor factor*). mESC zelulak hazteko ezinbestekoa da hazkuntza plaketan oinarri bat edukitzea, eta horretarako gelatina erabili genuen nagusiki: zelulak plakan

erein baino 20 minutu lehenago gelatina %0,1eko kontzentrazioan gehitzen zen hazkuntza plakara, eta homogeneouski banatzen zen. Zelulak gehitu aurretik, soberan zegoen gelatina guztia deuseztu egiten zen. Zelulak hazteko, 37°Ctan dagoen eta %5eko CO₂ emaria duen inkubagailuan mantentzen ziren, bi egunetik behin medioa aldatuz. Zelulak %80-90eko konfluentziara heltzean, plakeatu edo altxatu egiten ziren. Zelulak altxatzeko, lehenengo hazkuntza medioa kendu eta zelulak PBS 1x-arekin garbitzen ziren, ondoren tripsina gehitu, eta giro tenperaturan edo 37°Ctan inkubatzen ziren 2-3 minutu inguru, zelulak plakatik desitsazteko. Tripsinaren eragina txikitzeke medioa gehitu (erabilitako tripsinaren bolumen bikoitza) eta zelulak *falcon* hodi batean biltzen ziren. Ondoren, errore baskulantedun zentrifugan *spin* bat eman zitzaizen sedimenta zitezen (5000 r.p.m., 5 min., 25°C), eta medio guztia eliminatzen zen, tripsinaren arrasto guztiekin batera. Amaitzeko, alde aurretik 20 minutuz gelatinarekin trataturiko hazkuntza plaka edo flask berrian ereiten ziren medio berriarekin, zelulak modu homogeneousoan birsuspendituz.

3.2.1.1.2. Giza zelulak (hIPSC)

Ikerketa proiektu honetan in vitro prozeduretako erabili genuen beste zelula lerro bat giza jatorriko hIPS zelulak izan ziren (ingelesezko human Induced Pluripotent Stem). Zelula horien kultiboa beraien jatorrizko ezaugarriak mantentzea ahalbidetzen duen medio baten laguntzaz gauzatu zen fabrikatzaileen jarraibideak jarraituz, mTeSR1 (85870, StemCell Technologies Inc.) hazkuntza medioa. hIPS zelulak hazteko ezinbestekoa da hazkuntza plaketan oinarri bat edukitzea, eta horretarako zelula horien hazkuntzarako sortutako Matrigel (354277, Corning) oinarria erabili genuen hazkuntza plakan homogeneouski banatuz. Zelulak hazteko, 37°Ctara dagoen eta %5eko CO₂ emaria duen inkubagailuan mantentzen ziren, egunero medioa aldatuz. Zelulak %80-90eko konfluentziara heltzean, plakeatu edo altxatu egiten ziren, 5-7 egunetan behin. Zelulak altxatzeko, lehenengo hazkuntza medioa kendu eta zelulak PBS 1x-arekin garbitzen ziren, eta ondoren *ReLeSR* errektiboa erabiltzen zen (05872, StemCell Technologies Inc) zelulak plakatik desitsazteko. Behi zelulak altxatzean, errektiboa ezabatzeko zelulak *falcon* hodi batean biltzen ziren errore baskulantedun zentrifugan *spin* bat emanaz (5000 r.p.m., 5 min., 25°C), zelulak sedimentatu eta gainjalkina baztertzeko helburuarekin. Amaitzeko, alde aurretik *ReLeSR* errektiboarekin trataturiko hazkuntza plaka edo flask berrian ereiten ziren medio berriarekin, eta zelulak modu homogeneousoan birsuspendituz.

3.2.1.2. Zelulen tratamendu kronikoa

Gure sistema-ereduan kanpo estimuluek sortzen dituzten aldaketa epigenetikoak aztertzeko morfinaren tratamenduak gauzatu genituen. Tratamendu hori gauzatzeko, zelulak %50eko konfluentzian aurkitzen ziren unean, hazkuntza medioa aldatu, eta horrekin batera morfina gehitzen zitzairen $10\mu\text{M}$ -ko kontzentrazioan. Zelulak 24 ordutan zehar mantentzen ziren morfinarekin, eta 37°C tan eta %5-eko CO_2 emariarekin. Kontrol moduan, morfina gehitu beharrean sodio kloruroa gehitzen zen %0.9 (p/v)-ko kontzentrazioan (serum fisiologikoa) (Yang et al., 2019). Behin 24 orduko tratamendua amaitzean, morfina edo serum fisiologikoa zuen medioa deseuztatu, eta zelulak jasotzen ziren ondoren analisi ezberdinak gauzatzeko. Analisi horiek burutu bitartean, zelulak sedimentaturik gordetzen ziren -20°C zko izozgailuetan.

3.2.1.3. mESC zelulen desberdintze-prozesua (EpiLC)

mESC zelulen desberdintze prozesuan morfinaren presentziak eragin dezakeen aldaketak aztertzeko helburuarekin, morfinarekin tratatutako eta tratatu gabeko mESC-ak desberdintze prozesu batera bultzatu ziren, epiblasto antzeko zelulak (ingelesezko *Epiblast Like Cells*; EpiLC) lortu arte. Horretarako, 2013. urtean Katsuhiko Hayashi eta Mitinori Saitou-k *Nature Protocols* (Hayashi & Saitou, 2013) aldizkarian argitaratu zuten desberdintze protokoloa jarraitu zen. Desberdintze prozesu hori burutzeko, hainbat hazkuntza faktore gehitzen dira hazkuntza mediora, bFGF (ingelesezko basic fibroblast grow factor) eta aktibin A, zehazki. mESCatik EpiLCtara desberdintze prozesua burutzeko, hazkuntza plaken oinarria giza plasmatik eratorritako fibronektinarekin (16,6%-ko kontzentrazioan PBS-an disolbatua) tratatu zen ordu batez, eta zelulak N2B27 hazkuntza medioarekin kultibatu ziren, desberdintzapen prozesua modu egoki batean emateko. Zelulen kopurua oso kritikoa da desberdintze prozesua modu optimoan gertatzeko: 12 putzutako hazkuntza plaka bateko putzu bakoitzean ($3,5\text{cm}^2$ -ko azalera) 1×10^5 zelula inguru erein ziren. N2B27 medioaren prestakuntza, ondoren zehazturiko pausuak jarraituz burutu zen: N2B27 hazkuntza medioa, 500ml DMEM/F2+N2 eta 500ml Neurobasal+B27 medioak elkartuz lortu zen, eta ondoren 1,8ml β -mercaeptanol (5mM) gehitu zen. Bi medio horiek modu bananduan osatu ziren. DMEM/F2+N2 medioaren 500ml egiteko, 494ml DMEM/F12 medio komertzialari, 5ml N2, 0,5ml intsulina (25mg/ml), 0,5ml apotrasferrina (100mg/ml), 0,33ml BSA (%7,5), 16,5 μl progesterona (0,6mg/ml), 50 μl putreszina (160mg/ml) eta 5 μl Na_2SeO_3 (3mM) gehitu zitzaizkion. Neurobasal+B27 medioa osatzeko, berriz, 480ml Neurobasal medio komertzialari, 10ml

B27, 5ml penizilina/estreptomizina eta 5ml L-glutamina (200mM) gehitu zitzaizkion. Aipaturiko bi medioak osatu ondoren, eta hasiera esan bezala elkartu eta gero, medio horri hainbat osagai gehitu zitzaizkion, soilik erabiltzeko garaian (azken unean): KSR %1ean, eta aurretik aipatu ditugun hazkuntza faktoreak, bFGF (12ng/ml) eta aktibin A (20ng/ml). Behin mESCak desitsatsita, zelula horiek fibronektinarekin trataturiko hazkuntza plakara plakeatu ziren aipaturiko medio preparatuarekin batera, eta modu homogeneoan zabalduz. Zelulak hazteko, 37°Ctan eta %5eko CO₂ emaria zuen inkubagailuan mantendu ziren, hazkuntza medioa egunero aldatuz. mESCtik EpiLCetara diferentziazio prozesu horrek 2-3 egun artean iraun zuen.

Desberdintze prozesua egiaztatzeko, zelulek EpiLC zelulen morfologia bereizgarria eskuratu zuten ala ez behatu zen. Horrez gain, lorturiko zelulak jaso eta gero, zeluletatik ateratako RNA totalarekin zenbait geneen adierazpena neurtu zen, mESC zelulak kontrol moduan erabiliz. Neurketa hori, aurrerago 3.3.2 atalean azalduko dugun RT-qPCR teknikaren bidez burutu zen, eta bertan *Dnmt3b* eta *Xist* geneak aztertu genituen. Diferentziazio prozesua modu egokian emanez gero, bi gene horien adierazpenak asaldatuta egon behar dute: *Dnmt3b* genearen adierazpena igo egin behar da, eta *Xist* genearen adierazpena berriz, jaitsi (Hayashi et al., 2011).

3.2.1.4. *in vitro* mESC zelulen SmcHD1 *KnockOut* eraketa *Crispr-Cas9* metodoaren bidez (transfekzioa)

SmcHD1 entzimak mESC zeluletan betetzen duen funtzioa eta garrantzia aztertzeko helburuarekin proteina horren *KnockOut* entseguak burutu genituen CRISPR-Cas9 metodoaren bidez. Horretarako, metodo horretan oinarritzen den plasmido baten transfekzio prozesua gauzatu zen Michal R. Gdula eta lankideek 2019. urtean *Nature Communications* aldizkarian argitaratu zuten artikuluan aipatzen den moduan. Horretarako, SmcHD1 proteinan MommeD1 mutazioa ematen den lekura (23. exoia) bideraturiko 3 RNA gidari (ingelesezko *single guide RNA*; sgRNA) diseinatu ziren, eta horiek pX459 plasmidoan klonatu ziren, *GenScript* enpresak eskeinitako zerbitzuaren bidez. pX459 plasmidoa, plasmido komertziala da, eta horrek CRISPR-cas9 metodoaren bidez eta RNA gidak zehaztuta interesezko genearen *knockout*-ak eratzeko aukera eskaintzen du. Kasu horretan, transfekzioa modu egokian eman zela baieztatzeko puromizina bidezko zelulen hautaketa burutu zen, puromizina mediora gehituz. Izan ere, plasmidoak puromizinarekiko erresistentzia ematen die zelulei. Hortaz, puromizinarekin presentzian bizirik mantentzen diren zelulak, plasmidoa dute barnean. Esan bezala, erabilitako

oligonukleotido edo RNA gidariak hiru izan ziren: caccgTTACAGTGGACGATCAGCTT; caccgCTGCAATCCACAGTATAGAC; eta caccGGCGATCCAGATCAAACATC. Erabilitako plasmidoa berriz, eSpCas9-2A- Puro (PX459) V2.0 izan zen (9.2kb).

Mouse Oct4-GFP ES Cells (ES OCT4) lerroaren transfekzioa, *Lipofectamine 3000* izeneko transfekzio erreaktiboa erabiliz gauzatu zen. Transfekzio bakoitza bi aldiz burutu zen, transfekzio beraren erreplika tekniko bi edukitzeko helburuarekin, eta transfekzio soluzioa horrela prestatu zen: transfekzio mota bakoitzeko OPTI-MEM medioaren 50 µl ipini ziren bi hodi independenteetan, lehenengoan 3µl *Lipofectamine* erreaktiboa ezarri ziren, eta bigarregoa, berriz, 2µl *Lipofectamine 3000 Reagent* erreaktiboa, plasmidoaren 1µg kantitatearekin batera. Ondoren, bi hodiak elkartu eta 5-10 minututan zehar inkubatu zen giro-tenperaturan, guztira 100µl izanik transfekzio-soluzio mota bakoitzeko. Transfekzioa burutzeko, zelulak aurreko egunean prestatu ziren. Horretarako 24 putzutako plakak erabili ziren, eta zelulak %30-20ko koefluentzian ezarri ziren, aurretik %0.1eko gelatinarekin trataturiko plaken gainean, eta 500µl ES OCT4 zelulen hazkuntza medio osatuarekin (3.2.1.1.1. atalean zehaztu dugun medioa: %81 *Knock Out Serum DMEM* hazkuntza medioa, %15 KSR, %1 Na Pirubato, %1 aminoazido ez-esentzialen soluzioa, %1 penizilina/estreptomizina, %1 L-Glutamina, %0.07 β-Mercaeptanol, gehi azken unean gehituriko 3 inhibitzaile: 10mM PD0325901, 30mM CHIR99021 eta 1000U/ml LIF). 5-10 minututako inkubazioa bukatu orduko, zelulek aurretik zuten medioa aldatu eta medio berria gehitu zitzairen, horien gainean transfekziorako soluzio preparatuaren 50µl gaineratuz tantaz tanta. Plakak 37°Cko inkubagailuan, %5eko CO₂ emariarekin mantendu ziren 24-48 ordutan zehar transfekzioa eman ahal izateko.

Transfekzioak egiaztatzeko, puromizina erabili zen selekzio metodo moduan. Puromizina 4µg/ml kontzentrazioan gehitu zen aurreko medio zaharra eliminatu eta gero, medio garbi/berriarekin batera. Ondoren, zelulak beste 3 bat egunetan zehar mantendu ziren erresistentziarik gabeko zelula guztiak hil arte. Horren ondoren, zelula erresistenteen anplifikazioa burutu zen, eta lorturiko zelulei aurrerago azalduko dugun RT-qPCR teknikaren (3.3.2. atala) bidez SmcHD1 genearen adierazpen-maila neurtu zitzairen, bere espresioa nabarmenki jaitsi zela konprobatu ahal izateko.

3.2.2. *In vivo* prozedura esperimentalak: ANIMALIAK

Ikerketa proiektu honetan *in vivo* ereduak aztertzerako garaian, *Swiss Webster* (SW) saguak erabili ziren (*mus musculus*), Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU/UPV) SGIKER ikerkuntzarako zerbitzu generaleko animaliategiak ekoiztutako saguak. Ikerketa horretan buruturiko prozedura esperimental guztiak Europar Batasunak ikerketarako eta animaliekin esperimentuak burutzeko ezarrita dituen arauen arabera gauzatu ziren (2010/63/EU). Horrez gain, prozedura horiek guztiak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) animaliekin esperimentazioa egiteko etika batzordeak baimenduak izan ziren (CEBA) (CEEA/339/2013/SUBIRAN CIUDAD eta M20/2016/142).

Erabilitako sagu guztiak 2 hilabeteko adinarekin jaso ziren, eta Bizkaiko kanpusak duen animaliategia zerbitzu orokorrean mantendu ziren sexuaren arabera bananduta, hamarnaka. Saguak, 12 orduko argitasun zikloekin eta *ad libitum* mantendu ziren; hau da, janaria eta ura eskuragarri uneoro. Esperimentuetan zehar saguen manipulazioak beraiengan eragindako estresa minimizatzeko helburuarekin, esperimentuekin hasi baino astebete lehenago saguekin hartu-eman bat bultzatu zen saguak ikerlariaren ekintzetara eta usainera ohitzeko. Horretarako, egunean behin 15 minutuko tartez kontaktu fisikoa landu zen, eta honek euren estres maila nabarmen gutxitu zuen.

3.2.2.1. Sagu emeen hiperestimulazio obarikoa

Sagu emeetan hiperestimulazio obarikoa egitearen arrazoi nagusia, esperimentuan parte hartuko zuten eme guztien obulazio aldia sinkronizatzea, eta horrela haien egoera hormonalak kontrolatzea izan zen, hormonek ekarri ditzaketen bariazioak minimizatzeko helburuarekin. Hortaz, morfinazko tratamenduarekin batera burutu zen hiperestimulazio obarikoa sagu emeetan. Horrez gain, emeek ernaltzen dituzten enbrioien kopurua handitzeko ere erabilgarria da; saguen enbrioia aztertu nahi izanez gero, animalia gutxiago hiltzea dakar.

Kanpo hiperestimulazio obarikoa burutzeko bi hormona injektatu zitzaizkien sagu emeei, eta hori injekzio intraperitonealaren bidez burutu zen: lehenengoa, umedun behorren sueroko gonadotropina edo PMSG (ingelesezko *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*), hormona folikuloestimulatzaile edo FSH hormonaren analogoa, eta, beraz, hazte

prozesuan dauden obozito guztiak errekrutatzen dituen; eta bigarrena, giza gonadotropina korionikoa edo hCG (ingelesezko *human Chorionic Gonadotropin*), hormona luteinizantea edo LH hormonaren analogoa, eta, beraz, obulazio prozesuan eragiten duena (injektatu eta 14-15 ordutara). Saguek hormona bakoitzetik 5IU-ko injekzioa jaso zuen, batetik bestera 48 ordu iraganez: PMSG-aren injekzioa morfinazko tratamenduaren hirugarren egunarekin bateratu zen, eta hCG-aren injekzioa morfinazko tratamenduaren azken egunarekin.

3.2.2.2. *in vivo* saguen tratamendu kronikoa

Saguetan buruturiko morfinazko tratamendu kronikoa, *Crain eta Shen*-ek (Crain & Shen, 1995) 1995. urtean deskribatu zuten protokoloa jarraituz gauzatu zen. Tratamendu hori larruazalpeko injekzioaren bidez gauzatu zen, eta egunean bi aldiz injektatzen zen morfina hidrokloruroa, 12 orduko denbora-tartearekin (8:00 eta 20:00). Pausu hori, 4 egunetan zehar gauzatu zen, egunetik egunera dosia emendatuz (20, 30, 40 eta 50mg/kg). Tratamendua amaitzerakoan, 5. Egunean, saguek injekzio bakarra jaso zuten (10mg/kg) goizeko 8:00tan. Talde kontrolari dagokionez, aldiz, morfinazko injekzioak eman beharrean sodio kloruroa (%0.9 (p/v)) injektatu zitzaizkien; hau da, serum fisiologikoa.

Morfinazko tratamendu-kronikoaren efizientzia behatzeko, *Plater beroaren analgesia test*-a (ingelesezko *Hot Plate Analgesia Test*) gauzatu zen. Horretarako, tratatu eta tratatu gabeko saguak banan-banan 60°C-tan zegoen plaka bero baten gainean ipini ziren, min-erreflexua neurtzeko helburuarekin. Bertan, saguek salto egin arteko denbora neurtzen da (Tzschentke et al., 2007; Ripoll et al., 2006). Morfinaren tratamenduak sorturiko analgesiak beroarekiko erresistentzia handiago bat sortzen du eta. Behin tratamenduaren efizientzia baieztatu eta gero, dislokazio zerbikalaren bitartez saguak hil ziren, eta ondoren organo biologiko ezberdinak erauzi ziren: bihotza, giltzurrunak, pankrea, gibela, obarioak eta testikuluak, besteak beste.

3.2.2.3. Enbrioien erauzketa, kultiboa, eta morfinaren tratamendu kronikoa

Enbrioien erauzketa burutzeko, lehendabizi saguen gurutzaketa egin zen. Animalien erabilpena ahalik eta egokiena izateko helburuarekin, sagu emeek hiperestimulazio obarikoak jaso zuten PMSG eta hCG hormonaren tratamenduaren bidez. Hormonaren

injekzioa eta gero, emeetan *Whitten* efektua bultzatu zen sagu arren gernuaz bustitako zerrautsa gehituz emeen kaiolei. Horrek emeen ziklo estralaren eta hormonon tratamenduaren sinkronizazioa ahalbidetzen du (Whitten, 1956; Whitten, 1957). Ziklo estralaren errekupeazio eta sinkronizazio hori arren gernuan dagoen feromona baten bidez lortzen da; izan ere, emeek *Lee-Boot* efektua dela eta ziklo estralaren desagerpena jasan dezakete (van Der Lee & Boot, 1956).

Hiperestimulazio obarikoaren injekzioaren bigarren eguna amaitzean bi eme gehitu ziren ar bakoitzeko kaiola indibidualetan, eta bertan utzi ziren gau osoan zehar sagu emeak estaliak izateko helburuarekin. Emeak estaliak izan zirela egiaztatzeke, hurrengo egunean tapoi baginala aztertu zitzaizen emeei. Tapoi baginala izateak emearen estalketa egoki bat ziurtatzen ez badu ere, saguek duten ugalketa-tasa altua kontuan hartuta, egokia izan dela ondorioztatzen da, oro har. Hortaz, saguak banandu, eta tapoiak izanez gero prozedurarekin jarraitu zen.

Enbrioien erauzketa gauzatu aurretik, erauzketa eta hazkuntza plakak prestatu ziren 4 ordu lehenago. Denbora hori beharrezkoa da plaketako medioa gasifikatu eta tenperatzeko. Sagu eme bakoitzeko erauzketa plaka bat prestatu zen, eta bertan 60 μ l-tako hialuronidasa tanta bat, KSOM hazkuntza medioaren 40 μ l-tako tanta bat, eta 20 μ l-tako bi tanta prestatu ziren, eta parafinazko olio kapa batekin estali ziren bere horretan mantentzeko. Bestalde, bi hazkuntza plaka prestatu ziren, morfinazko tratamendua jasoko zuten eta kontrolak izango ziren enbrioiak ezberdintzeko. Plaka horietan KSOM hazkuntza medioaren 10 μ l-tako 9 tanta gehitu ziren, eta parafinazko olioaz estali ziren ere. Ondoren, plaka guztiak 37°C-tara eta %5eko CO₂ emaria duen inkubadorean sartu ziren, gasifikatuak eta tenperatuak izateko helburuarekin.

Enbrioiak zelula bakarreko fasean erauzteko, ezinbestekoa da pausu guztien denbora kontrola: injekzio, gurutzatze eta erauzketa orduak ondo zenbatu behar dira. Hori dela eta PMSGaren injekzioa erauzketa baino 76 ordu lehenago, eta hCGaren injekzioa bitartean 48 ordu inguru igarotzea. Emeak lehenago hiltzen badira, baliteke ernalketa oraindik gertatu ez izana, eta beranduago hiltzen badira, berriz, cumulus oophorus izeneko zelula folikularren masa sakabanatua aurkitzeko arriskua dago.

Saguak hiltzeko lokadura zerbikala erabili zen, eta jarraian animalien sabela ebaki zen umetokia eta obarioak bistarazteko helburuarekin. Jarraian, obarioa eta umetokiaren artean kokatzen den obiduktuaren muturrak moztu, eta erauzketa plakako hialuronidasa tantanean ezarri zen. Ernalketa egokia izanez gero, obiduktuak anpulu antzeko egitura bat izaten du enbrioiak aurkitzen diren gunean. Enbrio zelulak anpulu horren barnean egoten

direnez, pintzen laguntzarekin anpuluak ziztatu, eta enbrioiak dituen kumulua kanporatu zen kontu handiz. Enbrioi kumulua hialuronidasa tantanean utzi zen giro tenperaturaren, kumuluko zelulak desegin eta enbrioiak garbitu arte. Ondoren, enbrioi guztiak KSOM medio garbira pasatu ziren plastikozko kapilarren laguntzaz. Bertan, hainbat garbiketa burutu eta beste bi tantanetara pasatu ziren, zigotoak zirela baieztatu eta haien morfologia aztertzeke. Azkenik, lortutako enbrioi egoki guztiak hazkuntza plaketako KSOM tantanetan banatu ziren 4-5 enbrioietako taldeetan.

Enbrioi hazkuntzarako, egunero hazkuntza medioa aldatu zitzaien, eta garapena modu egoki batean ematen ari zela aztertzeke jarraipen bat burutu zen mikroskopiaren bidez. Beraz, hazkuntza plakak goizean goiz prestatu ziren egunero, hazkuntza medioa aldatu aurretik plakak gasifikatu eta tenperatzeko denbora eduki zezaten. Morfinaren tratamendua gauzatzeko, erauzketa burutu eta 24 orduz, enbrioiak bi zelulatan banatuta zeudela egiaztatu zen. Baieztatuz gero, bildutako enbrioi erdiari morfinazko tratamendua gauzatu zitzaien KSOM hazkuntza medioaren tantanei 10 μ M morfina gehituz, eta horrela mantendu ziren 24 orduz. Gainerako enbrioi, aldiz, %0.9 (p/v)-ko sodio kloruroa gehitu zitzaien, 24 orduz. Behi tratamendua amaiturik, enbrioi garapena 4-6 zelulatan zegoela frogatu eta hazkuntza medio garbia zuten plaketara aldatu ziren plastikozko kapilarren laguntzaz. Enbrioiak 24-48 ordu mantendu ziren blastozisto mailara iritsi arte. Amaitzeko, enbrioi kopurua zenbatu, morfologia aztertu eta *ependorf* hodi banatan bildu egin ziren, euren mantenuerako -20°C an gordez.

3.3. Metodologiak

Ondorengo atal honetan, esperimenterako materialarekin eta eskura eduki genituen laginekin gauzaturiko analisi motak, eta horretarako erabili genituen metodologiak azalduko ditugu. Hortaz, proteinen analisia, geneen adierazpenaren analisia eta DNAREN metilazio eraldaketa epigenetikoaren analisia nola burutu genituen azalduko ditugu banan-banan.

3.3.1. Proteinen analisisa (WB)

Western Blotting (WB) edo *immunoblotting* teknika, edozein proteina nahasketan proteina jakinen detekzioa du helburu nagusia, eta horretarako intereseko proteina topatuko duen antigorputz espezifikoa erabiltzen da, beste gauzen artean (Towbin et al., 1992).

3.3.1.1. Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa

Proteinak erauzteko metodo ugari daude, eta laginen arabera horretarako aukeratzen den metodologia ezberdina izaten da. Horrenbestez, kultibo zeluletatik eratorritako laginetan proteinen erauzketa burutzeko jarraitu genituen pausuak zelula osoaren metodoan erabiltzen direnak izan ziren, eta laginen normalizazioa analisirako erabilitako zelulen kopurua berdinduz burutu zen. Zelulen kopurua kontatuz, lagin guztiak zelula-kantitate berera doitu ziren. Horretarako, *Neubauer* ganbarak erabili genituen etxe komertzialak gomendatzen dituen pausuak jarraituz. Lagin bakoitzaren kontzentrazio finala $1.25 \cdot 10^3$ zelula/ μl -etara doitu zen, "kargatze-tanpoia 4x"-arekin, eta proteasa eta fosfatasa inhibitzaileekin batera.

3.3.1.2. Western Blotting-aren (WB) prozedura

Western Blotting teknika gauzatzerako orduan, proteinez osaturiko laginak akrilamidazko gel batean ezarri eta bertan, tamainaren arabera separatzen dira. Hortaz, lehenengo pausua elektroforesia burutzeko akrilamidazko gelak prestatzea da. Gel hauek egiteko behar diren osagai guztiak eta hauen proportziak 3.4. taulan biltzen dira, eta bertan ikusi dezakegun moduan, gel berdinen parte izango diren bi gel ezberdin egiten dira: gel banatzailea eta gel kontzentratzailea. Gel banatzailea, proteinak banatzeko balio duen zutabea da eta kontzentratzailea berriz, banatzen hasi aurretik lagin guztiak kontzentratu ahal izateko gela. Amaierako gelak bi fase ditu, gel banatzailea akrilamidazko gelaren oinarria da eta gel kontzentratzailea aldiz, goiko partea, laginak sartzeko putzuak jartzen diren lekua. Gelen banatzailearen proportzioa, gure kasuan %10, ikertu nahi diren proteinen pisu molekularren arabera aukeratzen da.

3.4. taula. WB teknika burutzeko erabiliko diren gelak preparatzeko behar diren erraktiboak eta hauen proportzioak.

Gel banatzailea (%10)		Gel kontzentratzailea	
H2O	Bolumena bete arte	H2O	Bolumena bete arte
Tris 1M pH=8.8	%25 (bol)	Tris 0.5 M pH=6.8	%25 (bol)
Bis Akrilamida %30	%33,3 (bol)	Bis Akrilamida %30	%13.3 (bol)
SDS %10	%1 (bol)	SDS %10	%1 (bol)
PSA %10	%0.5 (bol)	PSA %10	%0.5 (bol)
Temed	5 µl	Temed	5 µl

Laginetako proteinen banaketak elektroforetikoa gauzatzeko, aurretik aipatu dugun moduan, laginak berotu egiten dira proteinen desnaturalizazioa burutzeko eta jarraian, gel kontzentratzailean dauden putzuetan sartzen dira banan-banan, pisu molekular ezaguneko markatzailea ere ipiniz. Hau burutu ahal izateko, aurretik preparatu dugun gela, elektroforesia burutzeko euskarriaren barruan egon behar du "elektroforesi indargetzailea"-rekin batera. Markatzailea eta lagin guztiak ezarrita daudenean, 100V-tako potentzial diferentzia aplikatu zen proteinen banaketa burutzeko eta hau, BioRad etxe-komertzialeko *PowerPac Basic Power Supply* gailuaren bidez gauzatu zen, *Mini PROTEAN Tetra* elektroforesirako kubetan. Elektroforesi zutabeen proteina guztiak banatu ondoren, laginen azterketarekin jarraitzeko asmoz, gelean dauden proteina guztiak mintz batera pasatu ziren, 0.22µm-ko porodun PVDF mintzera zehazki. Hau gauzatzeko, transferentzia moduan ezagutzen den teknika gauzatu zen, elektroforesirako erabili zen kubeta eta gailu berdinen laguntzaz. Hala ere, honetarako erabiltzen den indargetzailea eta euskarriak ezberdinak dira. Hau, transferentzia sandwich moduko muntaia erabiliz burutu zen, kanpoaldetik barrualderako ordenean, kuxinak, 3 whatman paper geruza, gel-a eta PVDF mintza erabiliz. Transferentzia indargetzailea eta 100V-ko korronea aplikatuz tenperatura hotzean, proteinak mintzera iragatea lortu zen.

Geleko proteinen transferentzia prozesua burutu eta gero, PVDF mintzaren blokeoa burutu zen eta horretarako BSA bidezko blokeoa burutu zen, honen %10-eko kontzentrazioa duen soluzioarekin. Blokeoa ordu betez gauzatu zen giro tenperaturan, ondoren burutuko zen proteinen detekzioa modu espezifikoan eman zedin. Hau bukatu eta gero, antigorputz primarioa gehitu zitzaion mintzari eta hau, gau guztian zehar

inkubatu zen 4°C-tan. Erabili ziren antigorputz primarioak, interesezko proteina identifikatzeko balio duten antigorputz espezifikoak izan ziren, eta hauetako bakoitzak WB-erako duen diluzio eta inkubazio denbora optimoa aldakorra da. Erabilitako antigorputz ezberdinak, hauen diluzioak eta inkubazio denborak, 3.5. taulan zehaztu ditugu. Hurrengo egunean, antigorputz primarioa kendu eta 3 garbiketa burutu ziren, *blotto* bidezko garbiketak. Beranduago, antigorputz primario bakoitzari zegokion eta HRP-dun (ingelesezko *Horseradish peroxidase*) antigorputz sekundarioarekin inkubatu zen mintzarekin batera ordu batez giro tenperaturan. Ondoren, antigorputz sekundarioa kendu eta beste 3 garbiketa burutu ziren *blotto* garbiketa indargetzailearekin.

Hurrengo pausua, interesezko proteinara elkarturiko antigorputzen detekzioa izan zen eta hau, antigorputz sekundarioa konjokaturiko HRP-aren bidez lortzen da mintza errebelatuz. Mintza errebelatzeko, HRP-arekin erreakzionatuko duen ECL substratu kimioluminiszentea gehitu zen eta *BioRad* etxeko *ChemiDoc XRS+* sistema eta *Quantity One* softwarea erabilia, HRP-aren aktibitatea neurtu zen, interesezko proteina mintzan kokatuz eta bere presentzia maila neurtuz; ECL substratuak, antigorputz sekundarioei atxikitako HRP entzimarekin erreakzionatzen du argia emitituz. Interesezko proteinaren kantitate erlatiboa kuantifikatzeko *Image J* softwarea erabiliz burutu zen; lagin ezberdinen banden tamaina eta intentsitatea kontutan hartuta, hauen ratioa kalkulatu zen, eta jarraian, kontrol eta morfinarekin trataturiko taldeen arteko ratio erlatiboa kalkulatu zen. Normalizatzaile (ingelesezko *housekeeping*) moduan erabili genuen proteina β -aktina izan zen.

3.5. taula. Tesi honetan erabili diren antigorputz primario eta sekundarioen zerrenda. WB: Western Blot; O/N: over night; RT: Giro tenperatura.

Antigorputz primarioak	Erreferentzia	Etxe komertziala	Ostalaria	Diluzioa	Inkubazio denbora
Anti-H2AK119ub	D27C4	Cell Signaling	Untxia	1:1000 (WB)	4°C-tan, O/N
Anti-H3K27me3	A2363	AbClonal	Untxia	1:1000 (WB)	4°C-tan, O/N
Anti- β -Actin- Peroxidase	A3854	Sigma-Aldrich	Sagua (monoklonala)	1:25000 (WB)	RT, 1 ordu
Antigorputz sekundarioak	Erreferentzia	Etxe komertziala	Ostalaria	Diluzioa	Inkubazio denbora
2º Anti-untxia HRP	Sc-2004	SantaCruz Biotech	Ahuntza	1:1000	RT, 1 ordu

3.3.2. Geneen adierazpenaren analisisa (qRT-PCR)

Bai zeluletan eta bai saguen organoetan, morfinaren eraginez gene adierazpenean emandako aldaketak neurtzeko polimerasaren kate-erreakzio kuantitatiboa edo RT-qPCR-a (ingelesezko *Real Time Polymerase Chain Reaction*) erabili zen. RT-qPCRa, DNAaren anplifikazio esponentziala eta kuantifikazio erlatiboa bateratzen dituen metodoa da. Polimerasa entzimaren laguntzaz intereseko oligonukleotidoen anplifikazioa burutzen da.

3.3.2.1. RNAren erauzketa

Laginetako RNA osoaren erauzketa *Nucleozol* errektiboaren bitartez burutu zen. Hala ere, laginen homogeneizatuak prestatzeko jarraitu zen prozedura ezberdina izan zen laginen arabera; prozedura ezberdina da zelulen edo ehun moten arabera.

Zelulen lagin homogeneizatua prestatzeko prozedura hurrengoa izan zen. Aztertu beharreko zelulak petri plaketatik jaso ziren. Horretarako, plakan zegoen hazkuntza medioa deseuztatu zen, zelulak PBS-arekin garbitu ziren, tripsina gehitu zen eta giro tenperaturaren 5 minutuz inkubatu eta gero, zelulak desitsatsiak geratu ziren. Tripsinaren efektua gutxitzeko helburuarekin, tripsinaren bolumenaren medio bikoitza gehitu zen eta plakako zelula guztiak 15ml-tako *falcon* hodian jaso ziren. Nahasketako tripsina guztia elimintatzeko, zelulak 800 g-tara zentrifugatu ziren 3 minutuz. Zelulak hodiaren beheko aldean prezipitatzen direnez, ondoren gainjalkina deuseztatu zen eta zelulen pelleta bi aldiz garbitu zen PBS-aren laguntzaz, garbiketa bakoitzean lagina 800 g-tara zentrifugatu zen 3 minutuz. Azken garbiketaren zentrifugazioa egin baino lehenago, zelulak 1.5ml-tako *ependorf* hodietara pasatu ziren eta bertan zentrifugatu ziren. Lorturiko zelulen pelletari *Nucleozol* errektiboaren 500µl gehitu zitzaion, pipetaren laguntzaz guztiz homogeneizatu. Laginak 5 minutuz inkubatu ziren giro tenperaturaren.

Saguen organoen lagin homogeneizatua prestatzeko, berriz, organo bakoitzaren 50mg hartu eta hau, bisturi baten laguntzaz zatikatu zen. Organo bakoitzaren zati guztiak 1.5ml-ko *ependorf* hodietan ezarri ziren, *Nucleozol* errektiboaren 500µl gehitu zitzaion eta homogeneizagailuaren edo ultraturax-aren bitartez homogeneizatu ziren banan-banan. Ondoren, lorturiko nahasketa homogeneizatua 5 minutuz inkubatu zen giro tenperaturaren.

Behin zelulen nahasketa homogeneousatua 5 minutuz inkubatu eta gero, bi lagin-moten kasuetan RNA totalaren erauzketarako jarraitu ziren pausuak berdinak izan ziren. Lehenik, nahasketa bakoitzari 200µl H₂O gehitu zitzaion, 15 segundoz nahastu zen bortizearen laguntzaz eta 5 minutuz inkubatu zen giro tenperaturan. Jarraian, aurretik 4°C-tara girotutako zentrifugan 12000 g-tara zentrifugatu ziren lagin guztiak 15 minutuz. Hemendik aurrera buruturiko pausu guztiak izotzetan burutu ziren eta zentrifugazio guztiak 4°C-tara burutu ziren. Honen bidez, bi-fasedun laginak lortu ziren; RNA totala zuen goiko fase urtsu eta garden homogeneousatua (RNA, gatzak,...), eta beheko fase arrea, gainerako hondakinekin (Proteinak, DNA, zelularen organuluaren arrastoak,...). RNA zuen fase urtsua beste *ependorf* hodi berri batera transferitu zen eta 500µl isopropanol-arekin nahastu zen, 10 minututako inkubazioarekin batera. Ondoren, RNA-dun nahasketa hau 12000 g-tara zentrifugatu zen 10 minutuz. Gainjalkina deuseztatu eta hodiaren oinarrian zegoen RNA-ren pelleta bi aldiz garbitu zen, %75eko purutasuneko etanolarekin eta 5 minutuz buruturiko 7500 g-tako zentrifugazioaren bidez. Amaitzeko, etanolaren arrasto guztia deseuztatu eta RNA garbia lehortzen utzi zen, jarraian nukleasarik gabeko uretan disolbatuz.

Azkenik, saguen enbrioietatik RNAren erauzketa burutzeko, zelula kopuru txikiekin lan egiteko gomendatzen den *Arcturus® PicoPure™ DNA Extraction Kit*-a erabili zen, hornitzailearen argibideak jarraituz.

3.3.2.2. RNAren kontzentrazioa eta purutasunaren neurketa

Erauzitako RNAren kuantifikazioa eta purutasunaren neurketa *NanoDrop* izeneko espektrofotometroaren bidez gauzatu zen. Laginen purutasuna, laginen absorbantzia neurtuz kalkulatu du gailu horrek, uhin-luzera jakinen absorbantziaren arteko ratioa kalkulatu. RNA laginen purutasuna egokia izateko, *NanoDrop*-ak kalkulaturiko A260/280 eta A260/230 ratioen balioak 2 zenbaki ingurura gerturatu behar dira eta absorbantziaren kurbak garbia izan behar du.

3.3.2.3. Alderantzizko transkripzioa

RNA laginak aztertu ahal izateko, RNA laginen alderantzizko transkripzioa burutu zen, lagineko RNA totalaren baliokidea izango den errepresentazio egonkorra lortzeko, hau da,

DNA osagarria (cDNA). cDNAren sintesia burutzeko, *iScript cDNA Synthesis Kit* komertziala erabili zen, bertan zehazten diren jarraibideak jarraituz. Hortaz, 15µl-ra doitutako 1µg RNA, 1µl “iScript alderantzizko traskriptasa” eta 4µl “5X iScript erreakzio nahasketa”-rekin nahastu zen (guztira 20µl) eta hau, *MyCycler* termoziklagailuan inkubatu zen hurrengo programa jarraituz: 5 minutu 25°Ctan, 30 minutu 42°Ctan eta 5 minutu 85°Ctan. Amaieran, lagin bakoitzeko 50ng/µl cDNA inguru lortuz.

Saguen enbrioietatik eratorritako RNA laginen cDNAren sintesia burutzeko, aldiz, RNA kopuru txikietan oinarritutako *SMARTer Universal Low Input RNA Kit*-a erabili zen, hornitzailearen argibideak jarraituz. Teknika hori Sevillako IIQ-CSIC ikerketa zentroan gauzatu zen, eta bertan, saguen enbrioietatik eratorritako RNA laginetatik cDNA sintetizatzeaz gain, lagin horien anplifikazioa ere burutu zen bertako lankideekin burututako lankidetzaren bitartez, eta horrela eskura genuen cDNA aberastu zen.

3.3.2.4. Hasle espezifikoen diseinua

Gene jakinen hasle espezifikoak diseinatzeko, software eta online dauden erreminta ezberdinak erabili genituen. Jarraituriko pausuak honako hauek dira: Lehendabizi, interesezko geneen mRNA sekuentzia bilatu zen, NCBI-ren (ingelesezko *National Center for Biotechnology Information*) orrialdeko *Nucleotide* sailaren bidez, espeziea eta interesezko genea zehaztuz. Ondoren, lorturiko sekuentzia osorako hasle espezifiko ezberdinak topatu ziren *Primer3 (v 0.4.0)* (Koressar & Remm, 2007) software-aren laguntzaz (Untergasser et al., 2012). Hautaturiko hasleen espezifikotasuna, NCBI-ren *Blast-Basic local alignment search tool* erramintaren *Nucleotide Blast* aukera erabiliz aztertu zen (Altschul et al., 1990). Amaitzeko, Kaliforniako Santa Cruz unibertsitateak sorturiko *UCSC Genome Browser* zerbitzuko *In-Silico PCR* erramintaren bidez eta espeziearen genomasekuentziaren azken bertsioa erabiliz (Saguen kasuan *GRCm38/mm10 (Dec. 2011)* eta gizakien kasuan berriz, *GRCh38/hg38 (Dec. 2013)*), aukeraturiko hasle espezifikoak genomako zein lekutan kokatuko diren aztertu zen, hauen espezifikotasuna berretsiz. Horrez gain, hasle hauek erabiltzen hasterako garaian zenbait entsaio burutu ziren hasleen efizientzia eta espezifikotasuna praktikan berresteko asmoarekin. Horretarako, jarraian azalduko dugun esperimenteren bidez lorturiko emaitzekin kurba patroiak eta disoziazio kurbak gauzatu ziren. Hasle espezifiko ezberdinak dira espeziearen arabera eta guztien sekuentziak 3.6. taulan jaso dira.

3.6. taula. Geneen adierazpen analisia burutzeko erabili ziren hasleen sekuentzia. mRNA: intereseko geneen mRNA-ren detekziorako hasle espezifikoak.

Genea	Izen osoa	Sekuentzia (5'->3')
hActb	Actin Beta	(f) TGGCATCCACGAAACTACCT (r) ACGGAGTACTTGCGCTCAG
hDnmt1	DNA Methyltransferase 1	(f) CGACTACATCAAAGGCAGCA (r) TGGACTTGTGGGTGTTCTCA
hHprt1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	(f) CCTGGCGTCGTGATTAGTGA (r) CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
hSmcHD1	Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1	(f) AGGCAGTGGAGATGTTTTGG (r) GCGTCAGTGGTTAGGGTGA
mActb	Actin Beta	(f) GGGCTATGCTCTCCCTCAC (r) CACGCACGATTTCCCTCT
mDnmt1	DNA Methyltransferase 1	(f) GCCAGTTGTGTGACTTGGAA (r) GTCTGCCATTTCTGCTCTCC
mDnmt3A	DNA Methyltransferase 3 Alpha	(f) AACTTCGGGGCTTCTCCT (r) ATGGGCTGCTTGTTGTAGGT
mDnmt3B	DNA Methyltransferase 3 Beta	(f) ACTTGGTGATTGGTGAAGC (r) CCAGAAGAATGGACGGTTGT
mEed	Embryonic Ectoderm Development	(f) CCACAAATACGCCAAATGC (r) CAAACACCAGAGGGTCTCCT
mEzh2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit	(f) AGAATGTGGAGTGGAGTGGTG (r) CAGTGGGAACAGGTGCTATG
mGadph	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(f) TATGACTCCACTCACGGCAAATT (r) TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT
mMbd1	Methyl-CpG Binding Domain Protein 1	(f) CACGACCTTCCTGACTTCCT (r) CCAACCCCTCCTATCTCCTC
mMbd2	Methyl-CpG Binding Domain Protein 2	(f) ACACATCTCAACCCCTCTGC (r) GTGCCTCCTCCAGTTTCTTG
mMbd3	Methyl-CpG Binding Domain Protein 3	(f) TTGAGTGCCTTTGACATTGC (r) AGGGTGCTGGTGTGTAGAGC
mMbd4	Methyl-CpG Binding Domain Protein 4	(f) GCAAAAACCATTATCAAGTTCTCA (r) GATTCTCCCAAAGCCAGTCA

mPcx	Pyruvate Carboxylase	(f) CAACACCTACGGCTTCCCTA (r) CCACAAACAACGCTCCAT
mSmcHD1	Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1	(f) TGGATAGGACAGTAGCCGAGA (r) ATTGCTTCCCCCTTTTGTGTT
mTet1	Tet Methylcytosine Dioxygenase 1	(f) TGCTCCAAACTACCCCTTACA (r) CCCTCTTCATTTCCAAGTCG
mTet2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2	(f) TGGCTACTGTCATTGCTCCA (r) TGTCTGCTGGTCTCTGTGG
mTet3	Tet Methylcytosine Dioxygenase 3	(f) CGCCGTGATTGTTATCTTGA (r) TGTTAGGGTCTTTGCCTTGG
mSuz12	polycomb repressive complex 2 Subunit	(f) ACAGAAGCCAGAGACGACCT (r) GGAGCCATCATAAACACTCATTG
mXist	X Inactive Specific Transcript	(f) GCCTCTGATTTAGCCAGCAC (r) GCAACCCCAGCAATAGTCAT

Hasleak *Integratd DNA Technologies*-ek (IDT) eskeinitako zerbitzuaren bidez eskuratu genituen eta hauek, liofilizatuta jaso ziren. RT-qPCR prozesuan erabili ahal izateko, hasle hauen hodie *spin* bat eman zitzairen eta 100µM-eko kontzentrazioa doitu ziren, nukleasarik gabeko behar beste uretan disolbatuz (stock disoluzioa). Lanerako erabiliko den diluzioa 10µM-ekoa izan zen. Stock nahiz lanerako diluzioak hozkailuan mantendu ziren -20°C-tara.

3.3.2.5. Polimerasaren kate-erreakzio kuantitatiboa denbora errealean (RT-qPCR)

Interesezko geneen adierazpena modu semi-kuantitiboan analizatu zen Polimerasaren Kate-Erreakzio kuantitatiboa Denbora Errealean (ingelesezko *Real Time Polymerase Chain Reaction*; RT-qPCR) teknikaren bidez eta adierazpen hau neurtzeko, *iTaq Universal SYBR Green Supermix* erreaktibo komertziala erabili zen, detekziorako zunda floreszenteak dituen erreaktibo. Lagin bakoitzean aztertutako gen bakoitzeko 3 erreplika tekniko burutu ziren eta P96 plakaren putzu bakoitzean preparatu ziren nahasketek honakoa zeramaten: 5µl *iTaq SYBR Green Supermix 2X*, 0.15µl *Forward* haslea, 0.15µl *Reverse* haslea, 0.7µl nukleasarik gabeko ura eta 4µl cDNA (5ng/µl). Guztira, 10µl-ko bolumena

duen nahasketa 20ng cDNArekin. Segidan, P96 plakari zentrifugazio labur bat eman eta RT-qPCR prozesua burutzen duen gailura eraman zen cDNAren amplifikazio prozesua hasteko, hau da, *BioRad* etxe komertzialeko *CFX96 Real Time PCR* detekzio termoziklagailura. Temperatura eta denbora zikloak *iTaq Universal SYBR Green Supermix* errektiboak adierazitako jarraibideen bidez zehaztu ziren: desnaturalizazioa 95°Ctan 10 minutuz; hibridazioa 95°Ctan 20 segundoz eta luzapena, 59°Ctan minutu batez, 39 ziklo errepikatuz; azkenik, fusio kurba (ingeleseko *melting curve*) 65°Ctan burutu zen 5 segundoz.

Lehenago aipatu dugun moduan, hasle espezifikoen bikote bakoitzaren efizientzia, RT-qPCR teknikarekin kurba estandarrak burutuz aztertu zen; laginek duten cDNA kantitatearen diluzio jarraituen bitartez. Baldintza egokietan hasle espezifikoen kurbek -3.3ko (+/- 0.3) malda izaten dute, %100eko efizientzia adieraziz. Horretaz gain, geneen adierazpena neurtzeko beharrezkoa da kasu bakoitzerako egokienak diren normalizataile edo *housekeeping*-ak erabiltzea. Normalizataileak, zelula edo ehun mota bakoitzean modu egonkorrean adierazten diren geneak izaten dira, horregatik, hauek erabakitzeo *housekeeping* ohikoenen artean egonkortasun azterketak egin ziren, kontrolak eta tratamendua jaso zuten laginen artean adierazpen aldaketarik erakutsi ez zuten *housekeeping*-ak aukeratu ziren. Gure kasuan, ES OCT4 zelulentzako *Gapdh* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) eta *Pcx* (*Pyruvate Carboxylase*) erabili genituen eta animalientzat berriz, aukeraturikoak ezberdinak izan ziren organoaren arabera: *Gadph*, *Pcx*, *Actb* (*Actin Beta*) eta *Ppia* (*Peptidylprolyl Isomerase A*), besteak beste.

RT-qPCR teknikaren bidez lorturiko Ct balioak interpretatzeko, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodo bidezko gene adierazpenaren kuantifikazio erlatiboa burutu zen (Livak & Schmittgen, 2001), hau da, termoziklagailuan lortutako Ct balioak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -ra bihurtu ziren kontrol eta morfinarekin trataturiko taldeen arteko kuantifikazio erlatiboa lortzeko. Hala ere, lorturiko emaitzak berresteko eta analisi estatistikoa gauzatzeko, gene bakoitzaren adierazpena hiru/bost esperimendu independentetan neurtu ziren eta erreplikien arteko desbiderapen estandarra 0.2 unitate baino txikiagoa zen kasuetan soilik hartu ziren kontuan.

3.3.2.6. Gene adierazpen analisia *Fluidigm* PCR nanofluidikoaren sistemarekin

Aldi berean intereseko gene kopuru handien adierazpena neurtzeko *Fluidigm* PCR nanofluidikoa erabili genuen. Honek, lagin kantitate txiki batean gene mordoan adierazpena neurtzeko aukera eskaintzen du, oso teknika erabilgarria delarik. Gene bakoitza banan-banan RT-qPCR teknikaren bidez aztertzea saihesten duenez, abantaila nabaria ekartzen du lan karga aldetik. Hortaz, Euskal Herriko Unibertsitateko Genomika eta Proteomikako zerbitzuak eskaintzen duen *Fluidigm*-eko *Biomark HD Nanofluidic qPCR* sistema, *GE 48.48 Array Dinamikoaren* sistemarekin batera, erabili zen (<https://www.ehu.eus/es/web/sgiker/gene-adierazpenen-zerbitzuak>). Laburki, teknika hau gauzatzeko egindako pausuak RT-qPCRaren antzekoak izan ziren hasiera batean (3.3.2.1/2/3 atalak): Laginetako RNAREN erauzketa *Nucleozol* erreaktiboaren bidez gauzatu zen; kontzentrazioa, purutasuna eta integritatearen neurketa *NanoDrop*-aren bidez burutu zen; eta alderantzizko transkripzioa *iScript cDNA Synthesis Kit*-a erabiliz burutu zen. Jarraian, cDNAz osaturiko laginak prestatu eta gero, lagin hauetan aztertu nahi izan ziren geneen adierazpena aztertzeko erabili ziren hasle espezifikoak prestatu ziren bikoteka, bikoteko bakoitzeko 100µM ipiniz, erdi eta erdi. Detekziorako *EvaGreen* zunda fluoreszentea erabili zen. Azkenik, teknika honen bidez lorturiko emaitzen analisirako, RT-qPCRarekin bezala egin genuen moduan, lortutako Ct balioak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -ra bihurtu ziren kontrol eta morfinarekin trataturiko taldeen arteko kuantifikazio erlatiboa lortzeko.

3.3.3. DNAen metilazio globalaren analisia (LC-MS/MS)

Bai zeluletan eta bai saguen organoetan, morfinaren bidez DNAREN gaineko metilazio mailetan emandako aldaketak neurtzeko Kromatografia Likidora akoplaturiko Masa Espektometria (LC-MS/MS) teknika erabili zen. Metodo horrek, genomako zitosina metilatuen eta hidroximetilatuen portzentai globalak zenbateko diren aztertzeko aukera eskeintzen du.

3.3.3.1. DNAREN ERAUZKETA

Laginetako DNAREN erauzketa Fenol-Kloroformo/Isoamiliko teknika klasikoaren bidez burutu zen. Hala ere, laginen homogeneizatuak prestatzeko jarraitu zen prozedura ezberdina izan zen laginen arabera; prozedura ezberdina da segun *in vitro* hazitako zelulak izan edo saguen organoetatik eratorritako ehunetako zelulak izan.

In vitro zelulen lagin homogeneizatu prestatzeko prozedura jarraian azalduko da. Aztertu beharreko zelulak petri plaketatik jaso ziren. Horretarako, plakan zegoen hazkuntza medioa deseuztatu zen, zelulak PBSarekin garbitu ziren, tripsinaren gehitu zen eta giro tenperaturan 5 minutuz inkubatu eta gero, zelulak desitsatsi ziren. Tripsinaren efektua gutxitzeko helburuarekin, tripsinaren bolumenaren medio bikoitza gehitu zen eta plakako zelula guztiak 15ml-tako falcon hodian jaso ziren. Nahasketako tripsina guztia eliminatzeko helburuarekin, zelulak 800 g-tara zentrifugatu ziren 3 minutuz. Zelulak hodiaren beheko aldean prezipitatzen direnez, ondoren gainjalkina deuseztatu zen eta zelulen pelleta bi aldiz garbitu zen PBS-aren laguntzaz, garbiketa bakoitzan laginak 800 g-tara zentrifugatu ziren 3 minutuz. Azken garbiketaren zentrifugazioa egin baino lehenago, zelulak 1.5ml-tako eppendorf hodi berrietara pasatu ziren, bertan zentrifugatu. Lorturiko zelulen pellet bakoitzari DNAREN lisirako indargetzailearen 500µl gehitu zitzaion (10^{6-7} zelula), Proteinasa K-ren 5µl-rekin (10mg/ml) batera eta zelulak guztiz homogeneizatu ziren pipetaren laguntzaz.

Saguen organoen lagin homogeneizatu prestatzeko, berriz, organo bakoitzaren 50mg hartu eta hau, 1.5 ml-ko eppendorf hodietan jarri ziren, DNAREN lisirako indargetzailearen 500µl gehitu zitzaion, Proteinasa K-ren 5µl-rekin (10mg/ml) batera eta homogeneizagailuaren edo *ultraturrax*-aren bitartez homogeneizatu ziren banan-banan. Behin zelulen nahasketa homogeneizatu izanik, bi laginentzat jarraituriko prozedura berdina izan zen. Lehenik, aurreko pausoaren bidez lorturiko zelulen nahasketa gau guztian zehar utzi zen *Shaker*-ean 55°C-tara 1100 r.p.m.-ko nahasketa abiadurarekin. Hurrengo egunean, lagin bakoitzari 5µl RNAse gehitu zitzaion (10mg/ml) eta lagin guztiak *Shaker*-ean mantendu ziren 37°C-tara eta 350 r.p.m.-ko nahasketarekin. Ondoren, 400µl fenol gehitu zitzaion eta 10 minututako inkubazioa gauzatu zen giro tenperaturan. Inkubazio denbora pasatu eta gero, Kloroformo/Isoamiliko nahasketaren (24:1 proportzian) 400µl gehitu ziren eta bortize nahasgailuaren laguntzaz biziki nahastu ziren. Ondoren, lagin guztiak zentrifugatzera eraman ziren, 1600 g-tara eta 5 minutuz. Zentrifugazio honen bidez sorturiko bi fasetako soluzioko goiko fase urtsua beste *eppendorf* hodi berri batera pasatu zen. Ondoren, bananduriko fase urtsu honi

Kloroformo/Isoamilikoaren nahasketaren beste 400µl gehitu zitzaizkien, berriro ondo nahastu eta zentrifugatzera eraman ziren kondizio berdinetan. Berriro, laginak bi fasetan bananduta geratu ziren eta goiko fase urtsuarekin geratu ginen, hau beste hodi berri batera pasaraziz. Jarraian, hodi berera izotzetan hozturiko %100eko etanolaren 800µl gehitu zitzaien laginei, 120µl Na Azetatoarekin batera. DNAdun nahasketa hau -20°Ctan gorde zen gau osoan zehar. Hurrengo egunean, lagin guztiak 14000 r.p.m.-tara zentrifugatu ziren 15 minutuz (4°C) eta honen bidez sortutako pelletarekin geratu ginen gainjalkina deseuztatuz. DNAREN pelleta bi aldiz garbitu zen izotzetan hozturiko %75eko purutasuna zuen etanolarekin, 5 minutuz buruturiko 14000 r.p.m.-tako zentrifugazioren bidez. Amaitzeko, etanolaren arrasto guztia deseuztatu eta DNA garbia lehortzen utzi zen 5 minutuz, ondoren pelleta TE indargetzailearekin disolbatuz.

3.3.3.2. DNAREN kontzentrazioa eta purutasuna

Erauzitako DNAREN kuantifikazioa eta purutasuna *NanoDrop* izeneko espektrofotometroaren bidez gauzatu zen. Gailu horrek, laginen purutasuna laginen absorbantzia neurtuz kalkulatu du, uhin-luzera jakinen absorbantziaren arteko ratioa kalkulatu. DNA laginen purutasuna egokia izateko, *NanoDrop*-ak kalkulaturiko A260/280 eta A260/230 ratioen balioak 2 zenbaki ingurura gerturatu behar dira eta absorbantziaren kurba garbia izan behar du.

3.3.3.3. DNAREN digestioa

DNAREN metilazio eta hidroximetilazioak aztertzeko garaian, zeluletatik eta saguen organo ezberdinetatik eratorritako laginetako DNA kateak 100bp inguruko nukleotidotako kateetan zatitzea beharrezkoa da, ondoren lagin hauek LC-MS/MS teknikaren bidez aztertu ahal izateko. Horregatik, lagin horietako DNA zatitzeko *DNA Degradase Plus* erreaktibo komertziala erabili zen.

3.3.3.4. Kromatografia likidora akoplaturiko masa espektrometria (LC-MS/MS) teknika

Kromatografia Likidora akoplaturiko Masa Espektrometria teknikak lagin bakoitzean dagoen DNAko zitosina kopurua neurtzeko aukera ematen du, eraldatu gabeko zitosinak,

zitosinak metilatuak eta zitosina hidroximetilatuak bereiztu eta identifikatu. Emaizta hauek aztertuz, zitosinak jasan ditzaketen eraldaketa hauen portzentaia zenbateko den jakin daiteke. Laginekin batera, eraldaketa bakoitzaren kopuruak detektatu ahal izateko, erreferentzia moduan erabiliko den lagin gehigarri batzuk beharrezkoak ditu gailu honek, kontzentrazio ezaguneko laginak. Honek, aztertuko ditugun laginetan topatuko ditugun eraldaketen kopurua zenbatekoa den jakitea ahalbidetuko du. Horretarako, *DNA standard set kit* komertziala erabili zen. Lagin horiek, UPV/EHUK ikerkuntzarako duen zerbitzu orokorra den Sgiker-en laguntzaz aztertu ziren, Gasteizko Lascaray Ikergunean (<https://www.ehu.eus/es/web/sgiker/arabako-analisirako-zerbitzu-zentrala-aurkezpena>). Aztertutako laginen alikuotak (10µl, 50ng DNA digeritu dutenak) alderantzizko faseko UPLC zutabe batean prozesatu ziren (Eclipse C18 2,1 × 50 mm, 1,8-ko partikula tamaina, Agilent), alde aurretik orekatua eta ur/metanol/azido formikoarekin (95/5/0,1-ko proportzioan) (100µl/min) garbitua. Zutabeko efluenta elektropulberizazio ioien iturri bati gehitu zitzaion (Agilent Jet Stream), laukote hirukoitzeko masa espektrometrora konektatua (Agilent 6460/6400 QQQ). Makinak ioien erreakzio positibo anizkoitza monitorizatzeko moduan jardun zuen alde aurretik optimizatutako baldintzak erabiliz, eta zati espezifikoen ioien trantsizioen intentsitatea neurtu eta erregistratu zen; MH + → (5mCm/z 242.1 → 126.1, 5hC 258.1 → 142.1 eta dC m/z 228.1 → 112,1). Lagin esperimental bakoitzean neurtutako 5mC eta 5hmC-ren ehunekoak kalkulatzeko, lorturiko emaitzen gailurrak edo tontorrak (MRM peak) hartu ziren oinarritzat eta hauek, zitosina guztien kopuru totalarekin zatitu ziren (5mC + 5hmC + C) (guztizko zitosinaren multzoa).

3.3.4. Zitosinaz zitosinako metilazioaren analisia (WGBS)

Zeluletan morfinaren bidez DNAREN gaineko metilazio mailetan emandako aldaketak neurtzeko *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS) teknika erabili zen. Metodo horrek genoma osoko zitosina guztiak aztertzen ditu, zitosina bakoitzaren kokapena eta metilazio egoera aztertuz (metilatua dagoen ala ez), hau da, metilomaren azterketa baimentzen du. WGBSren abantaila nagusia, genomako ia CpG dinukleotido guztiek duten metilazio-egoera hautemateko duen gaitasuna da, CpG dinukleotidoen dentsitate baxuko eskualdeak barne (Yong et al., 2016).

3.3.4.1. DNAREN ERAUZKETA ETA LAGINEN KONTZENTRAZIO, PURUTASUN ETA INTEGRITATEAREN NEURKETA

Helburu horretarako, genomako DNA *fenol-kloroformo/isoamiliko* teknikaren bidez erauzi zen, eta eskuratutako DNAREN kuantifikazioa eta purutasuna *NanoDrop* izeneko espektrofotometroaren bidez gauzatu zen. Gailu horrek, laginen purutasuna laginen absorbantzia neurtuz kalkulatu du, uhin-luzera jakinen absorbantziaren arteko ratioa kalkulatu. DNA laginen purutasuna egokia izateko, *NanoDrop*-ak kalkulaturiko A260/280 eta A260/230 ratioen balioak 2 zenbaki ingurura gerturatu behar dira, eta absorbantziaren kurbak garbia izan behar du.

3.3.4.2. Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) SEKUENTZIAZIO METODOA

Nukleotido kateen sekuentziazio prozesu guztiak hartzen edo biltzen dituen azterketa metodologikoei bigarren belaunaldiko sekuentziazio edo NGS (ingelesezko Next-Generation Sequencing) moduan ezagutzen ditugu. Hitz horrek, azido nukleikoen sekuentziazio masiboa burutzeko erabiltzen diren teknologia guztiak biltzen ditu.

Sekuentziazio prozesuarekin hasi baino lehen lagin guztiak prestatu behar dira, eta horretarako erauzitako DNAREN zatikatzea burutu behar da. Zatiketa hori sonikatzailearen laguntzaz burutu zen, eta horren bidez 150-300 bp bitarteko DNA zatiak lortu genituen (Covaris LE220 ultrasonikatzailea). Jarraian, laginen amplifikazioa burutu behar da, eta hori laginen liburutegiak sortzeko helburuarekin gauzatzen da. Liburutegien prestaketa, eta ondorengo sekuentziazio prozesua, kanpo zerbitzuek eskaintzen dituzten sekuentziazio plataformen bidez burutu genuen, Bartzelonako CRG zentroan zehazki (Centre of Genomic Regulation) (<http://www.crg.eu/en/core/programmesgroups/genomics-unit>). Liburutegien prestatzeko, *KAPA Library Preparation Kit*-a erabili zen produktuaren ekoizleek gomendatutako pausuak jarraituz, eta bi muturretako (ingelesezko *paired end*) sekuentziazioa gauzatu. Egokitzailak *xGen™ Methyl UDI-UMI Adapters*-en (*Integrated DNA Technologies*) protokoloak jarraituz gehitu ziren. Liburutegien kalitatea behatzeko, *Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 7500 assay* bidezko kalitate-kontrola burutu zen. Sekuentziazio prozesua, aldiz, *Illumina NovaSeq 6000 S4* plataformaren bidez burutu zen.

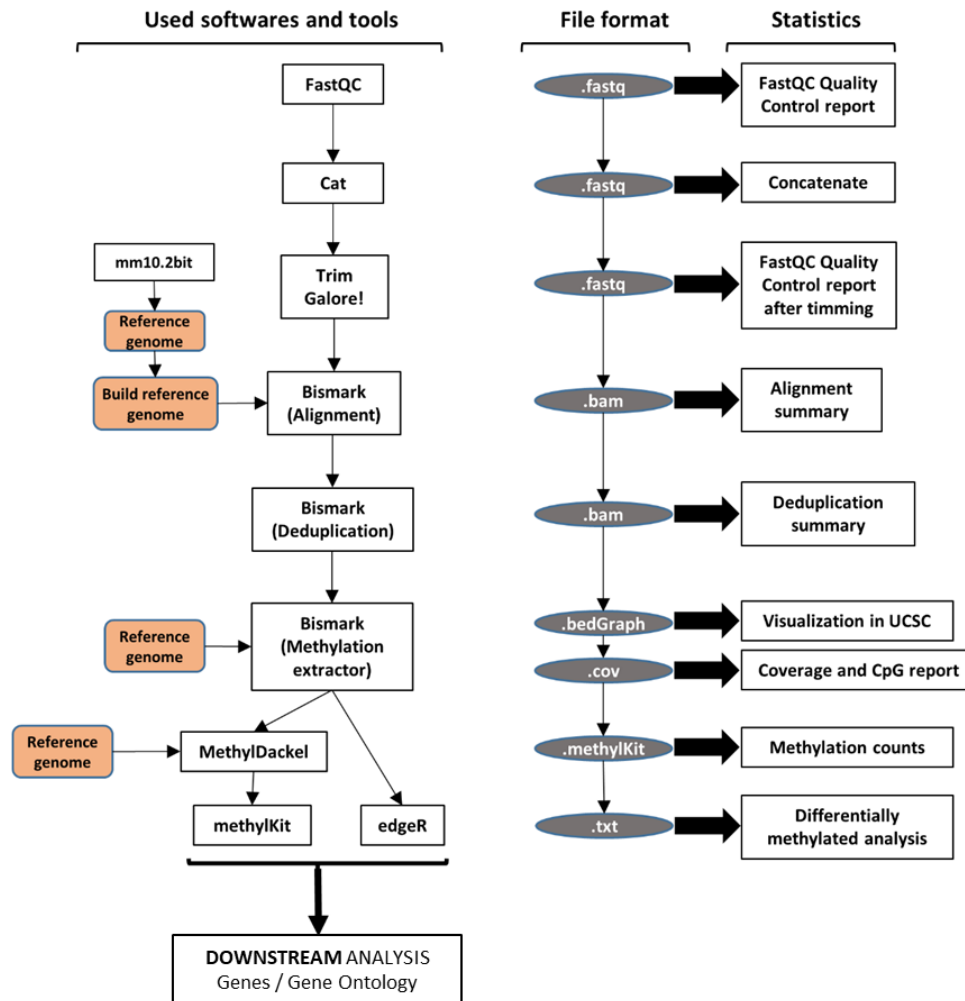
30x estaldurarekin lagin bakoitzeko, guztira 4 lagin izanik (kontrola eta morfina, eta bakoitzeko bi erreplika).

WGBS teknikak bisulfito konbertsioa du oinarri moduan (Feil et al., 1994; Zhou et al., 2019). DNA desnaturalizatua (hau da, hari bakarreko DNA) sodio bisulfitoarekin tratatuz, metilatu gabeko zitosina-hondakinak desaminatu egiten dira, eta ondorioz, uraziloak izatera iragaten dira. Metilatuta dauden zitosinak, aldiz, bai 5mC eta bai 5hmC, bere horretan geratzen dira inongo aldaketarik jasan gabe. Sorturiko urazilo hondar horiek PCR erreakzio bidez amplifikatzen direnean timina izatera pasatzen dira, eta 5mC edo 5hmC hondarrak, berriz, zitosina moduan mantentzen dira; erreferentziako genoma eta bisulfitoarekin tratatutako DNAREN arteko sekuentzia-informazioak konparatuz gero, zitosinen metilazio-patroiari buruzko informazioa lortzeko aukera eskaintzen du.

3.3.4.3. WGBSaren analisi bioinformatikoa

Sekuentziazio prozesuaren ondoren, lorturiko emaitzak aztertzeko, laginetako sekuentzietatik lortutako datuen analisi bioinformatikoa burutu zen. WGBS sekuentziazio metodoetatik lortutako datu gordinen analisi bioinformatikoa behetik gorako prozesua da, eta bi pausu orokorretan banatzen da. Lehenengo pausua, sekuentziaturiko DNA zati motzak (ingelesezko *read*-ak) genoma osoko sekuentziara mapatzea da, puzzle antzeko bat osatuz. Hau da, *read* guztiak dagokien genomako puntu zehatzetan kokatzen dira. Bigarren pausua, berriz, sekuentziaturiko laginen informazio biologikoaren erauzketa da. Pausu hori asko aldatu daiteke esperimentu batetik bestera, eta horretarako programa ugari existitzen dira, eta bakoitzak bere berezitasunak ditu. Analisi bioinformatikoa gauzatzeko jarraitzen diren argibideak laburbiltzen dituen protokoloari *pipeline* deritzogu, eta bertan prozesu horretan burutuko diren pausu guztiak zehazten dira, pausu bakoitzean erabiliko diren programak zehaztuz. Prozesu hori gauzatzeko software libre asko daude erabiltzaileen eskuragarri (R, C++, Python, Perl, Java, etab.). Hala ere, programa bakoitzak erabiltzen duen programazio hizkuntza ezberdina izaten da. Prozesu horretan jarraitu behar diren pausuak, eta horretarako erabili daitezkeen programak zeintzuk diren azaltzen dituzten blog, foro eta web orrialdeak asko daude, eta bertan programa horien erabilpena ere azaltzen da.

BS-Seq Pipeline



3.1. irudia. WGBS teknikaren bidez lorturiko datu gordinen analisi bioinformatikoa jarraitu den *pipeline* edo protokoloa. Ezkerretik eskuinera, pausu ezberdin bakoitzerako erabilitako software edo tresna guztien izenak, programa horiei dagozkien fitxategien formatuak, eta azkenik, pausu bakoitzean erabili diren analisi estatistikoak.

Gure laginen analisi bioinformatikoa burutzeko, Euskal Herriko Unibertsitateak eskaintzen duen ARINA plataformaren Katramila zerbitzaria eta bertako kalkulu noduluak erabili genituen. Bestalde, laginen WGBS azterketa saguen enbrioietako zelula ametan gauzatu zirenez, analisisan zehar erabili zen erreferentziazko genoma saguarena izan zen (GRCm38/mm10). Analisisan jarraitutako *pipeline*-a 3.1. irudian laburbiltzen da. Bertan, erabili ditugun software edo tresnen izenak ageri dira, baita horiei dagozkien fitxategien formatuak, eta pausu bakoitzean gauzatutako analisi estatistikoak ere.

Horrez gain, *Pipeline*-ean zehaztu ditugun tresna informatiko bakoitzean erabili behar den programazio hizkuntza, tresnari eman diogun erabilera praktikoarekin batera, ondoren aurkezten dugun taulan zerrendatu ditugu (3.7. taula).

3.7. taula. Anlisi bioinformatikoa burutzeko erabili diren tresna bioinformatikoen zerrenda. Prozesu guztian zehar erabili diren programa edo software ezberdinak aipatzen ditugu banan-banan, bakoitzari dagokion programazio hizkuntzarekin eta bere helburu espezifikoarekin.

Tresna informatikoa	Bertsioa eta Programazio hizkuntza	Erabilera
cat	V.8.22 – GNU	Sekuentzien kateatzea
FastQC	v.0.11.6 – Java	Sekuentzien kalitate kontrola
Trim Galore!	v.0.6.2 – Perl	Sekuentzien egokitzailen mozketak
Bismark	v.0.22.1 – Perl	BS sekuentzien lerrokatzea eta metilazio mailen neurketa
twoBitToFa	v.382 – C++	Lerrokatzeen erreferentziako genoma indexatzea
multiqc	v.1.9 – Python	Pausu guztien datu estatistikoak biltzeko programa
SAMtools	v.14.0 – C++	BAM fitxategien manipulazioa
MethylDackel	v.0.5.1 – GNU	Metilazio ehunekoen zenbaketa
Methylkit	v.1.16.1 – R	Metilazio sekuentzian metilazio bereizgarridun zitosen antzematea
EdgeR	v.3.32.1 – R	Metilazio sekuentzian metilazio bereizgarridun zitosen antzematea
Venny	v.2.1.0	Emaitzen integrazioa
Gene Ontology Consortium	v.16.1.0	Gene taldeen funtzio biologikoen azterketa

3.3.4.3.1. Kalitate kontrola

Laginen sekuentziazioaren datu gordinak jaso genituenean burutu genuen lehenengo pausua, informazio guztia zuten *.fastq* fitxategien kalitatezko kontrol orokor bat gauzatzea izan zen, artxiboen kalitatea ebaluatzeko eta horien bidez eskuratu genuen informazioaren fidagarritasun maila ezagutzeko. Horretarako, “*FastQC*” programa erabili zen, *Babraham Institutuak* garatutako eta datu bioinformatikoen kalitate-kontrolak burutzeko zabalki onartua dagoen software bat (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Andrews, 2010). *FastQC* erremintak, datu guztien azpimultzo bat aztertzen du, eta bertan eskuraturiko emaitzak datu multzo osora estrapolatzen dira. Erremintak sortutako txosten horiek, sekuentziazio prozesuan zehar arazo teknikorik gertatu den ala ez jakiteko balio izaten du. Komando lerroan *FastQC* erabiltzeko era honako hau da: *seqfile 1... seqfileN*, azterturiko fitxategiak.

```
> fastqc seqfile1 seqfile2 ... seqfileN
```

FastQC analisia hainbat modulutan banatzen da, eta atal bakoitzaren azalpenak link honetan aurkezten dira: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/Help/>

3.3.4.3.2. Sekuentzien kateatzea

Bigarren pausua, lagin bakoitzari dagokion *.fastq* fitxategi guztiak kateatzea da. Sekuentziazio prozesuetan, sekuentzia bera behin baino gehiagotan sekuentziazioan da emaitza fidagarriagoak lortzeko asmoz, eta ondoren, sekuentzia guztiak kateatu behar dira bata bestearen atzean erreferentziazko genoma baten laguntzaz, sekuentzia guztiekin genoma osoa eraikiz. Fitxategiak kateatzeko “*cat*” programa erabili genuen, Torbjörn Granlund eta Richard M. Stallman-ek sortutako erreminta, GNU sistema eragilearen barnean (<https://www.gnu.org/manual/manual.html>). Tresna hori erabiltzeko komando lerroa, honako hau da: *seqfile 1... seqfileN*, azterturiko fitxategi guztiak; *output.seqfile*, emaitza fitxategia.

```
> cat seqfile1 seqfile 2 ... seqfileN > output.seqfile
```

Behin lagin bakoitzari zegokion *.fastq* fitxategi guztiak kateatuta, sortutako fitxategi berriei *FastQC* analisia egin zitzaien, aurreko pausuan azaldutako komando lerro berbera erabiliz.

3.3.4.3.3. Egokitzaileen mozketak

Hirugarren pausua, sekuentziazio prozesurako erabili ziren egokitzaileen mozketak izan zen. Sekuentziaturiko zatien fitxategiei *FastQC* tresnarekin burutu genituen kalitate analisiak agerian utzi zuten egokitzaileak ezabatze beharra, eta hori ezinbestekoa izaten da sekuentziazio prozesuarekin modu egoki batean jarraitzeko. Egokitzaileak DNAzko oligonukleotido artifizialak dira, DNA zatietara itsasten dira sekuentziatuak izan daitezten, eta ezberdinak erabiltzen dira euren artean ezberdintzeko. Egokitzaile horiek 30 base inguruko zati laburrak izaten dira nagusiki, *read*-en 5' eta 3' muturretan kokatzen dira, eta horrek *QScore* balioa txikitzea ekartzen du. Hortaz, arazo hori saihesteko garrantzitsua izaten da analisi bioinformatikoa burutu aurretik egokitzaileak ezabatzea; arazorik ez izateko hurrengo urratsetan, eta, bereziki, sekuentzien lerrokatzea hobetzeko.

Egokitzaileak mozteko "*Trim Galore!*" tresna erabili genuen. *Babraham* institutuak garatutako erreminta hori, kalitatea automatizatzeko, egokitzaileak mozteko eta kalitatezko kontrolak berregiteko erabiltzen da (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore) (Krueger F., 2015). Beraz, tresna horren laguntzaz liburutegia sortzeko erabili ziren "*xGen™ Methyl UDI-UMI Adapters*" (Integrated DNA Technologies) egokitzaileak hauteman, eta horien ezabaketa gauzatu genuen, ondoren sekuentzia horien analisisa (*FastQC*) berreginez.

Trim_Galore! Tresna erabiltzeko komando lerroa honako hau da: `--clip_r1/r2`, fitxategi bakoitzaren 5' ertzean zenbait bp mozteko aukera bi muturreko sekuentziazioa burutzean; `--fastqc`, *FastQC* analisisa berregiteko aukera egokitzaileen mozketak burutu ondoren; `--gzip`, sortu ziren fitxategi berriak konprimatzeko aukera; `--paired` prozesatutako sekuentziak bi muturrekoak direla zehazteko aukera; `filename(s)`, aztertutako fitxategiak.

```
> trim_galore [options] <filename(s)>
```

3.3.4.3.4. WGBS sekuentzien lerrokatzea eta irudikapena

Behin egokitzaileen mozketak burutu eta gero, hurrengo pausua lagin bakoitzeko sekuentzia guztiak erreferentziako genomari lerrokatzea izan zen. Hori, ezinbesteko urratsa da, eta bertan *read* guztiak genomaren posizio espezifiko jakin batera esleitzen dira, saguaren GRCm38/mm10 erreferentziako genoma oinarri moduan erabiliz. Bada, pausu horrek “*puzzle*” baten antzera funtzionatzen du, pieza guztiak beraien artean elkartuz.

Lerrokatzea gauzatzeko lanabes ezberdinak erabili daitezke. Horrelako erremintak sekuentziazio plataformetako elkarrekin, edo software libreetako erabiltzaileek sortuak izaten dira. BS-Seq laginetarako erabiliena, “*Bismark*” (Krueger & Andrews, 2011) erraminta da (https://rawgit.com/FelixKrueger/Bismark/master/Docs/Bismark_User_Guide.htm), eta horrek bi funtzio nagusi ditu: alde batetik, sekuentzien lerrokatzea, eta bestetik, laginetan metilatuta dauden zitosinen antzematea. *Bismark* tresnaren barnean, lerrokatze prozesua burutzeko erabiltzen den softwaretako bat *Bowtie2* da (Langmead & Salzberg, 2012; Langmead et al., 2019) (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>). Software horrek, lerrokatze prozesua era sentikor eta bizkorrago batean gauzatzen du memoria gutxiago erabiliz.

Lerrokatze-prozesuak burutzeko aukeratu zen erreferentziako genoma, jada aipatu dugun moduan, sagu-genomaren azkenetariko bertsio egonkorra izan zen (*GRCm38/mm10*): 2011ko abenduko sagu-genomaren muntaia (*mm10, Genome Reference Consortium Mouse Build 38 (GCA_000001635.2)*). Muntai hori, *Mouse Genome Sequencing Consortium* eta *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* erakundeen arteko elkarlanaren bidez gauzatu zen.

Lerrokatze prozesua hasi aurretik, aukeratutako erreferentziako genoma bisulfito modura itzultzea ezinbesteko pausua da, baita genoma indexatzea ere. Horrek, *Bowtie2* erremintak burutuko duen lana errazten du, *read* guztiak bizkorrago bilduz eta lerrokatuz. Erreferentziako sagu-genoma *UCSC Genome Browser* nabigatzailetik deskargatu genuen (Kent et al., 2002) (<http://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/mm10/bigZips/>), *.2bit* formatuan dagoen informazioa (*mm10.2bit*). Hori dela eta, datu horiek erabili ahal izateko *.2bit* fitxategi horiek *.fasta* formatura pasatu genituen “*twoBitToFa*” tresnaren bidez (http://hgdownload.cse.ucsc.edu/admin/exe/linux.x86_64/), eta horretarako erabili zen komando lerroa honako hau da: `input.2bit, sagu-genomaren fitxategia; output.fa, emaitza fitxategia:`

> *twoBitToFa input.2bit output.fa*

Erreferentziako genoma indexatzeko, berriz, *Bismark* softwareko “*Bismark_genome_preparation*” aukera espezifikoa erabili genuen, aurreko pausuan erauzitako genomaren *.fa* fitxategiarekin, eta erabilitako komandoa honako hau da: --bowtie2, sortzen den fitxategia bowtie2 programak erabiltzeko erreferentziako genoma formatuan sortzeko aukera; --genomic_composition, sekuentzia genomikoaren mono eta di nukleotidoen konposizioa sortzeko aukera; mm10/, bisulfito motako itzulpena egiteko erreferentziako genoma kokatzen den karpetaren zehaztasunak.

> *bismark_genome_preparation [options] <arguments>*

Horrekin, erreferentziako genomaren aurkibide antzeko bat sortu genuen, C→T itzulpena eginda zuten eta *.bt2* formatuan zeuden 6 fitxategiz osatua, eta G→A itzulpena eginda zuten eta *.bt2* formatuan zeuden beste 6 fitxategiz osatua. Horiek guztiak beharrezkoak izan ziren lagin bakoitzaren *read*-ak erreferentziako genomarekin lerrokatzeko.

Ondoren, laginen lerrokatzea burutu genuen, metilazioen antzematearekin batera. Erabilitako komando lerroa honako hau da, ondorengo aukerekin: --genome, erreferentziako genomaren fitxategia; --bowtie2, lerrokatzea bowtie2 programaren bidez egiteko aukera; --un, lerrokatu ez diren *read*-ak biltzen dituen fitxategia sortzeko aukera; --ambig_bam, lerrokatze bat baino gehiago egiten duten *read*-ak biltzen dituen fitxategia sortzeko aukera; -nucleotide_coverage, lerrokatzean lortutako datuekin mono eta di nukleotidoen konposizioaren estimazioa egiteko; --pbat, lerrokatzea era ez zuzenean egiteko aukera (CTOT eta CTOB); -q, lerrokatu nahi diren fitxategiak *.fasta* edo *.fq* formatuan daudela adierazteko; -1 <mates1>/-2 <mates2>, lerrokatu nahi diren *.fq* fitxategi guztiak.

> *bismark [options] <genome_folder> {-1 <mates1> -2 <mates2> | <singles>}*

Behin prozesu hori guztia amaituta, *Bismark* softwareak lerrokatze mailaren kalitate maila adierazten duen txosten bat sortzen du. Bertan, lerrokatzeko erabili diren *read* kopuruak, 0 aldiz, behin, eta behin baino gehiagotan lerrokatu ziren adierazten da. Horren bidez, lerrokatze prozesuaren efizientzia orokorra zenbateko den zehaztu daiteke. Lerrokatze maila orokorra begiratzuz gero, WGBS analisiaren bidez aztertu genituen laginen lerrokatze efizientzia egokia izan zela esan daiteke (3.8. taula).

3.8 taula. *Bismarck* bidez gauzatutako lerrokatze edo mapatze prozesuaren inguruko kalitate datuak.

4-Bismark > Alignment karpetan					
Sample	Read kopurua	1 lerrokatutako read-ak	1 < lerrokatutako read-ak	0 aldiz lerrokatutako read-ak	Mapping efficiency
R1C1	442116105	318515887	29345173	94255045	72,0%
R2C1	396662329	287393634	24690817	84577878	72,5%
R1T1	368762239	274756683	22608047	71397509	74,5%
R2T1	430872653	305845826	28737601	96289226	71.0%

Lerrokatzearen ostean, sekuentzien lerrokatzean ematen diren bikoizketak ekiditeko pausu bat egiten da sekuentziak aztertzerako garaian. Pausu horren bidez genomako posizio berean behin baino gehiagotan ematen diren lerrokatzeak ezabatzen dira. Bikoizketa horiek oso ohikoak izaten dira gehiegizko PCR amplifikazioa ematen denean. Bikoizketak ekiditeko, *Bismark* softwareko “*deduplicat_bismark*” aukera espezifikoa erabili genuen, eta erabilitako komando lerro honako hau da: --bam, bikoizketarik gabe sortzen den fitxategia *.bam* formatuan sortzeko aukera; filename(s), bikoizketak ezabatu nahi diren *.bam* fitxategia.

> *deduplicate_bismark [options] filename(s)*

3.9. taula. *Bismarck* bidez eta bikoizketa kasuak ezabatuz lorturiko lerrokatze edo mapatze prozesuko kalitate datuak.

4-Bismark > Deduplication karpetan			
Sample	Lerrokatze kopurua	Ezabatutako bikoizketa kopurua	Bikoizketa gabeko lerrokatze kopurua
R1C1	318515724	41720769 (13.10%)	276794955 (86.90%)
R2C1	287393462	35155896 (12.23%)	252237566 (87.77%)
R1T1	274756550	50113237 (18.24%)	224643313 (81.76%)
R2T1	305845640	39525304 (12.92%)	266320336 (87.08%)

Bikoizketak ezabatzeko pausuak, bikoizketa kopuruak laburbiltzen dituen txosten bat sortzen du, eta bertan lerrokatze kopurua, ezabatutako bikoizketa kopurua eta bikoizketa gabeko lerrokatze kopurua zehazten dira lagin bakoitzeko (3.9. taula).

Bismark tresnak ahalbidetzen dituen azpi-tresnekin analisi bioinformatikoak burutzen jarraitu aurretik, bikoizketak ezabatu ostean lortutako *.bam* fitxategiak barne hartzen zituen metilatutako zitosinen posizio-datuak antolatu genituen, kromosomaren arabera lehenengo, eta posizio koordinatuen arabera bigarrenik. Horretarako, “Samtools” programa erabili genuen (<http://samtools.sourceforge.net/>) (Li et al., 2009), *.bam* fitxategiak manipulatzeko dituen erreminta. Tresna horrek *.bam* fitxategiak manipulatu eta *.sorted.bam* fitxategieak sortu zituen, eta horretarako erabili zen komando lerroa honako hau da: -o, emaitza fitxategia; in.bam, hasiera fitxategia *.bam* formatuan.

```
> samtools sort [options...] [in.bam]
```

WGBS teknikaren bidez eskuratu genituen datuen analisi estatistikoarekin jarraitzeko, *Bismark* softwarearen barnean erabili genuen azken tresna “*bismark_methylation_extractor*” izan zen. Tresna horren bitartez lerrokatzean lortutako metilazioaren informazioa erauzi genuen, DNA zatiekin sortutako kate bakoitzaren metilazio maila espezifikokoak identifikatuz. Horrez gain, genomaz zehar identifikatutako metilazio puntu guztien irudikapena sortzeko helburuarekin, *.bedGraph* fitxategiak sortu genituen. Horrek, UCSC genomaz nabigatzailea erabiliz (Kent et al., 2002) metilatutako zitosinak genomako gene ezberdinetan nola banatzen diren irudikatzeko aukera ematen du. Metilazioaren informazioa erauzteko, erabili genuen komando lerroa honako hau da: --gzip, metilazioaren informazioarekin sortuko diren fitxategiak *.gzip* formatuan sortzeko aukera; --bedGraph, metilazioaren informazioa irudikatzeko fitxategia sortzeko aukera; --cytosine_report, genomaz osoko metilazioen laburpen txostena sortzeko aukera; --genome_folder, erreferentziako genomaren fitxategia; <filenames>, metilazioaren informazioa erauziko den fitxategiak *.bam* formatuan

```
> bismark_methylation_extractor [options] <filenames>
```

Bismark-ek, metilazioaren informazioaren erauzketaren ostean lortzen dituen metilazio-ehunekoen kopuruak laburbiltzen dituen txosten bat sortzen du. Bertan, lagin bakoitzean aztertutako zitosina kopurua, eta CpG dinukleotido guztietatik metilatuta dauden zitosinen ehuneko balioak zehazten dira (3.10. taula).

3.10.taula. *Bismarck* bidez lagineko aztertu diren zitostina guztietatik metilatuta dauden zitostinen ehuneko balioak biltzen dituen taula.

4-Bismark > Methylation extractor karpetan		
Sample	Aztertutako C kopurua	Metilatutako C kopurua CpG-etan
R1C1	9271799982	41.4%
R2C1	8788722432	41.7%
R1T1	7430257497	39.4%
R2T1	8956654402	39.6%

3.3.4.3.5. WGBS adierazpen bereizgarriaren zitostinen antzematea

WGBS esperimentuen helburu orokorra DNAko zitostina metilatuak genomako zein gune jakinetan topatzen diren ezagutzea da, eta hori lagin ezberdinak alboratuz bien artean dauden metilazio ezberdintasunak identifikatzeko erabili daiteke. Gure kasuan, tratamendu jakin baten efektua ikusi nahi izan dugunez, lagin tratatuak eta kontrolak konparatu ditugu. Horretarako, ezinbestekoa da zitostina bakoitzaren metilazioen ehunekoak ondo kuantifikatzea, ondoren metilazio mailak laginen artean konparatzeko inolako akatsik gabe. Norabide horretan burutu diren lan ugari badaude ere, ikerketa horiek erabili dituzten metodo eta algoritmoak ezberdinak izan dira, eta hori aztertu behar diren lagin moten arabera izaten da; ez da existitzen prozesu hori burutzeko protokolo zehatzik, ezta prozesu horretarako egokiena izango den prozedura edo *pipeline* zehatzik (Liu et al., 2020; Yu et al., 2016; Klein et al., 2015). Pausu hori gauzatzeko, oro har, erreminta ezberdinen konbinazioa gomendatzen da, lorturiko emaitzak beraien artean konparatuz eta metilazio bereizgarriaren zitostinak ahalik eta zehaztasun handienarekin identifikatuz. Hori horrela izanik, bibliografian deskribatzen diren tresna guztien artean sentikortasun handia erakutsi duten edota faltsu positibo tasa baxuak izan dituzten bi tresna aukeratu genituen. Horiek, R plataformako *Bioconductor* softwareak eskaintzen dituen pakete estatistikoaren barnean erabilgarri daude:

- Lehenengoa, *methylKit* tresna (Akalin et al., 2012) izan zen (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/methylKit/inst/doc/methylKit.html>), *Fisher*-en test zehatzarekin ebatzitako beta banaketa binomialean oinarritzen den tresna. Lanabes hori oso erabilia da erreplika biologiko gutxi dituzten sekuentziazio esperimenduetan zitosinen metilazio bereizgarrien portzentaiak aztertzeko. *methylKit*-arekin hasi aurretik, *Bismark*-ekin egindakoa lerrokatzeko *.sorted.bam* fitxategietako metilazio zitosinen ugaritasuna zenbatu genuen *MethylDackel* “*extract*” erremintaren laguntzarekin (<https://github.com/dpryan79/MethylDackel>). Horretarako erabili genuen komando lerroa honako hau da: *ref.fa*, erreferentziazko genomak; *sorted_alignments.bam*, *.sorted.bam* fitxategiaren izena.

> *MethylDackel extract [OPTIONS] <ref.fa> <sorted_alignments.bam>*

Modu bereizgarrian metilatutako zitosinak identifikatzeko eta genomak zehar duten kokapena zehazteko, *MethylDackel* tresnarekin lortutako metilazioaren ehuneko balioak *methylKit* tresnaren bidez aztertu genituen, pakete estatistiko horretarako zehaztuta dagoen gida jarraituz. Horrenbestez, normalizazioa egiteko laginen arteko *read*-en estaldura distribuzioaren metodoa erabili zen. Gainera, egun ezberdinetan batutako erreplikaren arteko lotura kontuan izan genuen (kasu honetan “*batch*” eran agertzen dena). Ondoren PCA grafikoaren konparaketa guztietan kontrol eta morfina laginen bereizketa garbia zela baieztatu genuen. Bukatzeko metilazio bereizgarridun CpG-ak identifikatu eta zegozkien geneetan izendatu ziren.

- Bigarrenengo tresna, berriz, *edge* (Robinson et al., 2010) izan zen (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>), eredu lineal batean oinarrituz metilatutako eta metilatu gabeko *read*-etatik datozen balioen egokitzea egiten duen lanabesa, eremu genomiko bakoitza banan-banan aztertuz. Bertan, erreplika biologikoen metilazio ehunekoaren bariazioa dispersio binomial negatiboaren parametroarekin moldatzen da, zitosinen metilazio bereizgarria kalkulatzeko zehazki. Horrenbestez, *bismark_methylation_extractor* tresnarekin lortutako metilatutako zitosina kopuruen balioa biltzen duten fitxategian oinarrituta, *edgeR* pakete estatistikoaren bisulfito sekuentziaziorako erabilera gida jarraitu genuen (Chen et al., 2018) eta sekuentzien liburutegien tamainan oinarritutako normalizazioa burutu genuen. Horren ostean, PCA grafikoaren konparaketa egin genuen kontrol eta morfina laginen bereizketa garbia zela

baieztatzeko eta bukatzeko, metilazio bereizgarriak CpGak identifikatu eta zegozkien geneetan izendatu ziren.

Bi tresna horien bitartez identifikatu ziren metilazio-bereizgarriak geneen integrazioa egiteko, hau da, bi tresnekin aztertutako gene amankomunak identifikatzeko, *Venny* tresna erabili genuen (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) (Oliveros, 2007).

3.3.4.3.6. Ezaugarri genomikoen izendatzea

WGBS analisiko metilazio bereizgarria duten geneen zerrenda amankomuna identifikatu ostean, gene taldeen funtzio biologikoak aztertu genituen. Egun funtzio biologikoak aztertzeko tresna ugari daude eskuragarri, eta gure kasuan “*Gene Ontology Consortium*” (*GO*, <http://geneontology.org/>) lanabesa aukeratu genuen gure datuak aztertzeko. Horren bidez, gene zerrenda bakoitzari zegokion funtzio biologikoen informazioa eskuratu genuen (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Ontologia analisiaren bidez eskuraturiko aberastasun balioak *Fisher*-ren test zehatzarekin ebatzi ziren, eta FDR-ari dagokionez 0,05 baino P-balio txikiagoak zituzten emaitzak hartu ziren kontuan.

3.3.5. DATUEN ANALISI ESTADISTIKOA

Teknika ezberdinen bidez lortu ziren datuak aztertzeko erabili genuen analisi estatistikoa *Student T Proba* izan zen, eta emaitzak estatistikoki esanguratsuak izan zirela onartu ahal izateko p balioa hartu genuen kontuan, esanguratsutasun maila hiru mailatan banatuz: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) eta $p < 0.001$ (**).

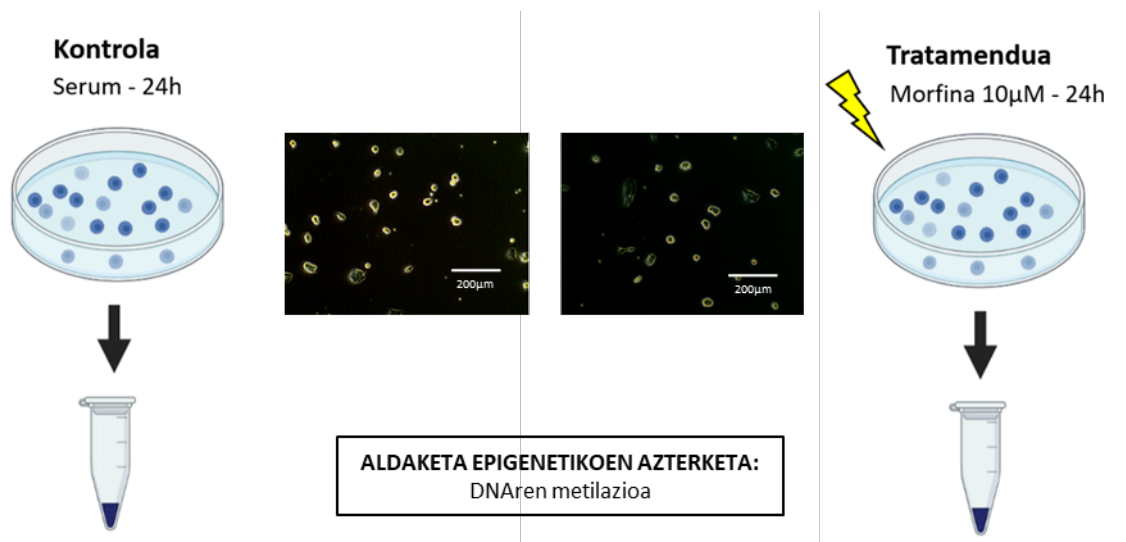
4. EMAITZAK

4.1. Morfinak DNAREN metilazioan eragindako aldaketa epigenetikoak

Egungo literatura aztertuz gero, DNAREN metilazioaren inguruan ikerketa ugari burutu direla ikus dezakegu. Ikerketa horietan frogatu denez, DNAREN metilazio-patroia aldatu egin daiteke zenbait kanpo faktoreen ondorioz. Opioideak, kanpo faktore horien artean daude, eta esanguratsuenetariko bat morfina da. Morfinaren esposizioak ekartzen dituen aldaketa epigenetikoak aztertzeko helburuarekin burutu diren ikerketak egon badaude ere, oso eremu zabala da eta asko dago horren inguruan ikertzeko. Morfinak sortzen dituen eraldaketa epigenetikoak mota askotakoak dira, eta gainera, zelula motaren arabera eraldaketa bakoitzak duen funtzioa edota sortzen duen eragin zelular eta fisiologikoa erabat ezberdina da. Horrez gain, DNAREN metilazioaren presentziarekin lotuta dagoen DNAREN hidroximetilazioaren inguruan existitzen den informazioa oso urria da. Horrenbestez, DNAREN metilazioarekin batera hidroximetilazioak aztertzek garrantzia handia izan dezake eraldaketa epigenetiko horrek dituen gora-behera nagusiak ulertzeko garaian.

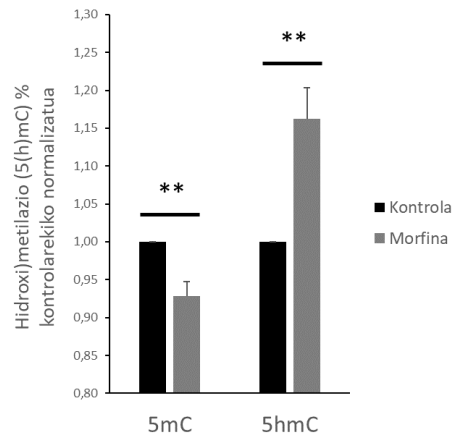
4.1.1. Morfinaren tratamendu kronikoak mESC zeluletan eragindako aldaketa globalak DNAREN metilazioan (eta hidroximetilazioan) *in vitro*.

Morfinaren presentziaren aurrean zelulek duten erantzun zelular eta transkripzionala gidatzen duen kandidatu nagusienetariko bat, metilazio patroia aldaketa da. Hori dela eta, gure lehenengo helburu nagusia mESC zeluletan gauzaturiko morfinaren tratamendu kroniko batek, DNAREN metilazio eta hidroximetilazio maila globalean aldaketak sortzen dituen ala ez behatzea izan zen. Helburu horretarako, *Oct4* genearen bidez GFP proteina adierazten duten mESC zelulak kronikoki tratatu genituen morfinaren bidez (24 orduko tratamendua, 10 μ Mko kontzentrazioan)(Yang et al., 2019). 4.1. irudian beha dezakegun moduan, morfina bidez tratatu ziren zelulek ez zuten inongo aldaketa morfologiko esanguratsurik jasan tratamendu kronikoaren ostean.



4.1. irudia. mESC zeluletan *in vitro* buruturiko morfina-re tratamendu kronikoaren irudi eskematikoa, DNAREN metilazio-mailan (aldaketa epigenetikoak) ematen diren aldaketak neurtzeko helburuarekin, euren argazkiekin. Eskala barra = 100μm.

Hortaz, lehendabizi burutu genuen esperimendua tratamendu horrek mESC zeluletan DNA metilatuari eta hidroximetilatuari dagokionez sortu zituen aldaketa globalak aztertzean zentratu zen. Bai DNAREN metilazio mailak, eta bai hidroximetilazio mailak ere, LC-MS/MS teknikaren bidez neurtu genituen. Horretarako jarraitu genuen prozedura guztia *Material eta Metodologia* atalean (3.3.3. atalean) zehaztu dugu, eta horren emaitzak 4.2. irudian azter ditzakegu. Behatu genuen gertaerarik esanguratsuena, zalantzarik gabe, metilazio-maila globalean eman zen jaitsiera izan zen; metilazioaren ehuneko balioak kontrolarekiko normalizatu eta gero, %5a baino gehiago jaitsi ziren. Aldaketa hori, oro har, oso handia iruditu ez arren, jaitsiera horrek errealitatean izan ditzakeen inplikazio zelular eta transkripzionalak handiak izan daitezke. Horretaz gain, hidroximetilazio-maila globalak ere igoera adierazgarria jasan zuen. 5hmC mailen ehunekoak kontrolarekiko normalizatu eta gero, hidroximetilazio-mailak %15 igo zirela behatu genuen. Emaitza horietatik ondorioztatu daitekeenez, mESCtan buruturiko morfina-re tratamendu kronikoak zelulen metilazio mailen jaitsiera ekartzen du, genomaren egoera hipometilatu orokor bat sortuz. Gainera, egoera hori bultzatzen duen mekanismo nagusienetariko bat behintzat TET entzimek gidaturiko demetilazio prozesu aktiboa da, prozesu horretako bitartekaria den 5hmC hondarraren presentzia nabarmenki handitua topatzen delako.



4.2. irudia. Morfinaren 24 ordutako tratamendu kronikoak DNAREN metilazio- eta hidroximetilazio- mailetan eragindako aldaketa globalak mESCtan (LC-MS/MS teknikaren bidez). Emaitzak ehunekotan adierazi ziren, eta ondoren kontrolarekiko normalizatu ziren (N=5). Emaitzen analisi estatistikoa *Student-en T* proba (ingelesezko Student's t-test) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereiziz: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ eta *** $p < 0.001$.

4.2.1. Morfinak sagu ar eta emeetan maila sistemikoan eragindako aldaketa globalak DNAREN metilazioa (eta hidroximetilazioa) *in vivo*.

mESC zelulak edozein zelula motara diferentziatu daitezkeen zelula pluripotenteak direnez (Brook & Gardner, 1997), gure hurrengo helburu nagusia, saguak bezalako organismo heldu eta konplexu bateko organo ezberdinetan morfinaren tratamendu kronikoak maila sistemikoan izan dezakeen inpaktua zenbatekoa den aztertzea izan zen.

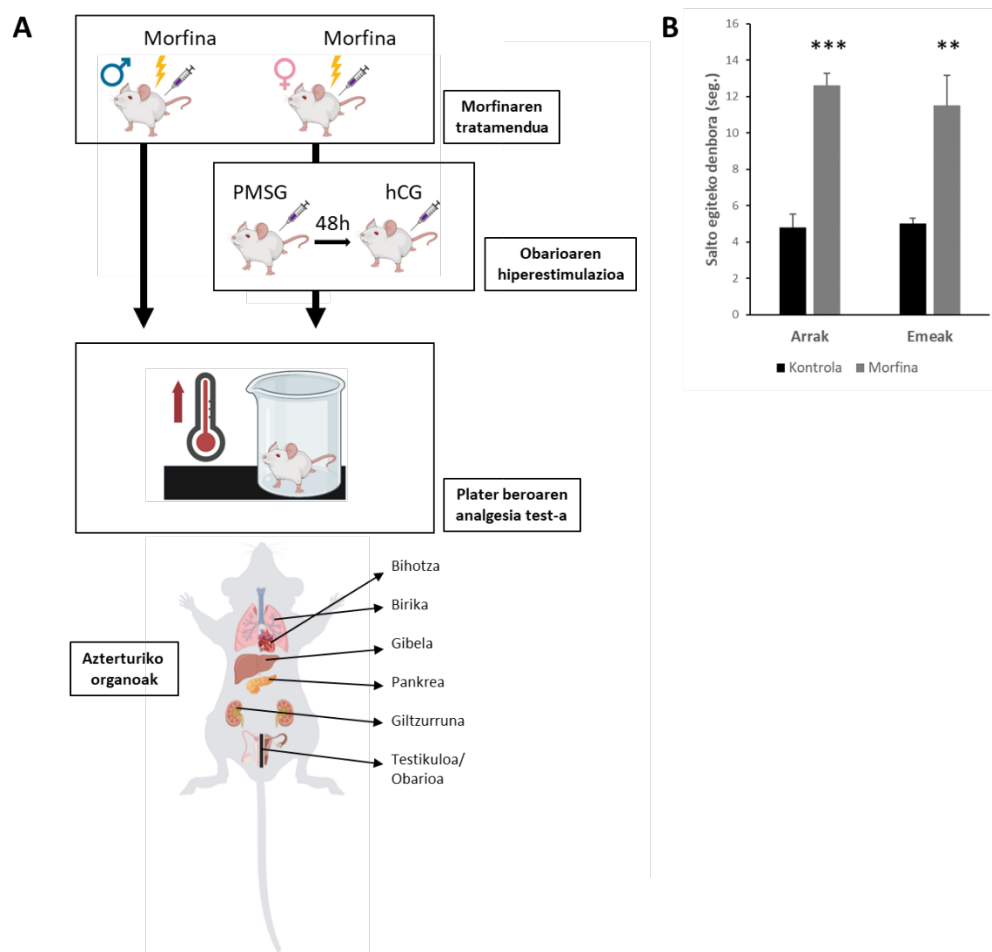
Horretarako, 8-10 astetako adina zuten *Swiss* saguak kronikoki tratatu genituen morfinaren bidez, aurretik jada adierazi dugun moduan (3.2.2. atala). Jarraituriko prozedura osoa 4.3.A. irudiko irudi eskematikoan laburbildu genuen. Aipaturiko esperimentuan, independenteki azertu genituen indibiduo ar eta emeak, 5-4eko N-a erabiliz; 5 sagu arrek eta 4 sagu emeek jaso zuten morfinaren tratamendua, eta horrenbeste sagu erabili genituen kontrol moduan, guztira 10 sagu ar eta 8 eme erabiliz. Morfinaren tratamendu kronikoa gauzatzeko, saguei morfina hidrokloruroaren larruazalpeko injekzioa burutu zitzaien egunean bi aldiz 12 orduko tartearekin (8:00tan eta 20:00tan) eta lau egunetan zehar, egun batetik bestera dosiaren emendioa gauzaturik (20, 30, 40 eta 50 mg/kg). Bosgarren egunean, sagu guztiek morfinaren azken injekzio bat jaso zuten (10mg/kg), 8:00tan zehazki (Crain & Shen, 1995). Kontrol moduan erabili zen

sagu taldeak, seruma jaso zuen morfinaren ordean. Sexuen arabera independenteki aztertzearen arrazoia, bien artean existitzen den ezberdintasun hormonalak izan zen. Horrek, oinarrizko kondizio ezberdinak sortzen ditu talde bakoitzean, eta, ondorioz, morfina izan dezakeen eragina ere erabat ezberdina izan daiteke. Sagu emeen kasuan, modu gehigarri batean, morfinaren tratamendua obarioaren hiperestimulaziorako tratamendurekin bateratu zen, obulazioaldiak ekartzen dituen hormonaren gorabeherak sinkronizatzeko helburuarekin. Horren bidez, emeetan emaitzak baldintzatu ditzaketen faktore gehigarriak murriztu nahi izan genituen. Horretarako, sagu emeek hormona bidezko tratamendu gehigarri bat jaso zuten, 5IU-ko PMSG-aren larruzalpeko injekzioarekin eta 48 orduko tarteararekin gauzaturiko 5IU-tako hCG-aren larruzalpeko injekzioarekin.

Morfina-tratamenduaren eraginkortasuna baieztatzeko, *Plater beroaren analgesia testa* burutu zen, eta bertan saguek beroarekin erlazio naturiko min-erreflexurako duten tolerantzia maila neurtu nahi izan genuen. Horretarako, animaliak beroaren eroalea den plaka baten gainean (60 °C inguru) ezarri, eta beroa detektatzeko aurkeztu zuten erreflexu denbora neurtu genuen (4.3.B. irudia). Sagu taldeen artean diferentzia nabarmenak topatu genituen: bai arren eta bai emeen kasuan, beroaren aurrean izan zuten erreflexu-erantzunak atzerapen bat izan zuen animalia tratatuetan, eta hori morfina sortzen duen analgesia egoeraren adierazlea da. Amaitzeko, saguak dislokazio zerbikalaren bidez sakrifikatu ziren eta ondoren, intereseko organo ezberdinen erazketa burutu genuen. Gure aztergai izan ziren organoen artean hauek zeuden: organo sexualak (testikuluak eta obarioak), gibela, pankrea, giltzurrunak, bihotza eta birrikak, besteak beste.

Erauzi genituen organo horietan aztertu genuen lehendabiziko gauza, aurreko atalean mESC zelulekin burutu genuen antzera (4.1.1. atala), morfinaren presentziak organismo bizietako organo ezberdinetan modu orokor batean metilazio eta hidroximetilazio aldaketak sortu ditzakeen ala ez aztertzea izan zen. Helburu horretarako berriro ere LC-MS/MS teknika erabili genuen, eta esperimentu horietatik lorturiko emaitzak 4.4. irudian jaso genituen. Metilazioei eta hidroximetilazioei dagokionez, emaitza oso ezberdinak eskuratu ziren aztertutako bi sexuetan. Sagu arretan (4.4.A. irudia), lehen eraldaketa epigenetikoari dagokionez, testikulu-tako eta biriketako zelulek metilazio-mailen jaitsiera adierazgarriak jasan zituzten tratamenduaren ostean, eta gibelak eta bihotzak, berriz, metilazio-maila globalen igoera. Gainerako organoetan (pankrea eta giltzurruna) goranzko joerak behatu bagenituen ere, lorturiko emaitzak ez ziren esanguratsuak izan. Hidroximetilazioaren kasuan, aldiz, indibiduo arretan topatu ziren aldaketa esanguratsu bakarrak giltzurrun-tako eta biriketako metilazio-mailen igoerak izan ziren. Bihotzaren kasuan ere, hidroximetilazioek goranzko joera bat izan zuten, eta pankrearen kasuan

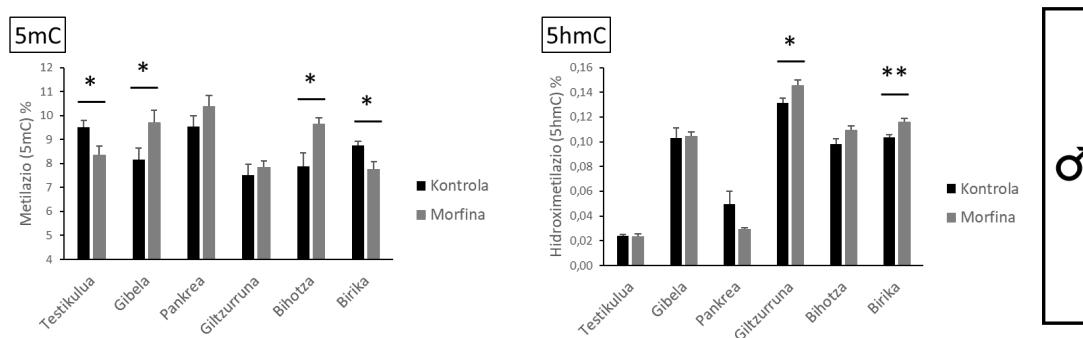
alderantziz, beheranzkoa. Edozein kasutan, azken horiek ez ziren aldaketa adierazgarriak izan. Testikuluak eta gibelean, berriz, ez genuen inongo aldaketa joerarik sumatu. Indibiduo emeetan berriz, metilazio-mailei dagokionez (4.4.B. irudia), obarioek eraldaketa horren presentziaren jaisiera esanguratsu bat jasan zuten morfinaaren tratamenduaren ondorioz, eta giltzurrunetan, aldiz, igoera esanguratsu bat. Kuriosoki, gainerako organo guztiek metilazio mailen igoera ez adierazgarriak jasan zituzten. Hidroximetilazio-mailei dagokionez, aldiz, ez zen inongo aldaketa esanguratsurik topatu. Giltzurrunean eta bihotzean hidroximetilazio mailen igoera ez adierazgarriak behatu ahal izan genituen, eta obarioan jaisiera ez adierazgarri bat.



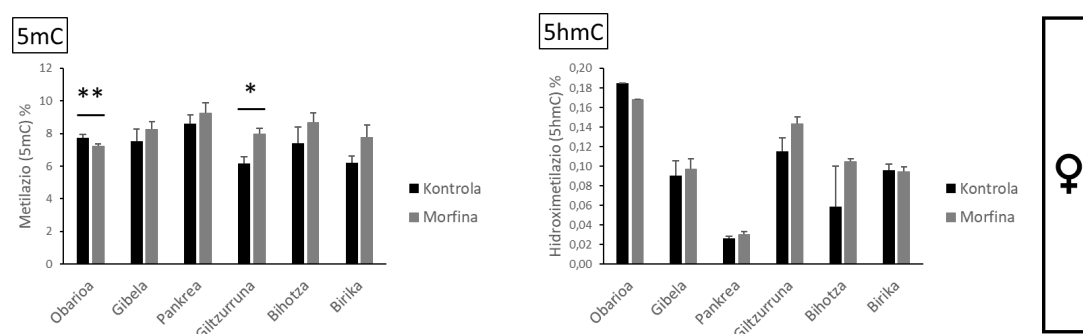
4.3. irudia. Morfinaaren tratamendu kronikoak maila sistemikoan, *in vivo*, duen eragina neurtzeko erabilitako prozeduraren irudi eskematikoa. **(A)** Saguetan *in vivo* gauzatutako morfinaaren tratamendu kronikoaren eragina aztertzeko jarraitutako prozeduraren irudi eskematikoa. Esperimentua indibiduo ar eta emeak bereiziz gauzatu zen. Erauzi ziren organoak bihotza, birikak, gibela, pankrea, giltzurrunak eta sexu-organok (testikuluak eta obarioak) izan ziren; **(B)** Trataturiko saguetan buruturiko morfinaaren tratamenduaren eraginkortasuna baieztatzen duen *Plater beroaren analgesia test* analisiaren emaitzak: n=5 arretan; n=4 emeetan. Emaitzen analisi estatistikoa Student-en T proba (ingelesezko Student's t-test) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereiziz: *p<0.05, **p<0,01 eta ***p<0,001.

Horrenbestez, eskuetan ditugun emaitza horiek morfina *in vivo* tratamendu kronikoak organo eta sistema biologiko ezberdinetan metilazio/hidroximetilazio aldaketa ezberdinak eragiten dituela baieztatzen dute. Edonola ere, saguen organoetan lorturiko datu horiek ez datoz bat mESC zeluletan behatu genituen emaitzekin. Aipatu berri dugun moduan, emaitza horiek ezberdinak dira sexuaren arabera, eta erabat ezberdinak dira sexu bereko indibiduen organo ezberdinetan. Ondorioz, morfina saguetan *in vivo* duen eragina sexu-menpekoa eta sistemikoa da, argi eta garbi.

A



B



4.4. irudia. Morfinaren tratamendu kronikoak saguen organoetan, DNAREN metilazio eta hidroximetilazio maila globalei dagokionez, eragindako aldaketa orokorrak. Saguetako organo ezberdinetan LC-MS/MS teknika bidez neurturiko DNAREN metilazio eta hidroximetilazio -maila globaletan topaturiko aldaketa globalak (n=5 arretan; n=4 emeetan). Emaitzak ehunekotan adierazi ziren. **(A)** Lehendabizi sagu arretan behatu zen; **(B)** ondoren, sagu emeetan. Emaitzen analisi estatistikoa Student-en T proba (ingelesezko Student's t-test) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereziz: *p<0.05, **p<0,01 eta ***p<0,001.

4.2. Morfinaren tratamendu kronioak mESCtan eragindako zitosinaz zitosinako metilazio aldaketak WGBS teknikaren bidz

DNAREN metilazioan emandako aldaketek geneen adierazpenean eragin dezaketenez, gure hurrengo helburu nagusia morfinarekiko DNAREN metilazio bidez sentikorrek diren itu geneak identifikatzea izan zen. Bide horretan, DNAREN metilazioak genoma osoan zehar duen banaketa modu zorrotzago batean aztertu genuen WGBS (*Whole Genome Bisulfite Sequencing*) teknikaren bidez, eta ondoren lorturiko datu-gordinen errendimendu altuko sekuentziazio analisia burutu genuen.

Teknika horrek genoma osoko zitosina guztiak aztertzen ditu, zitosina bakoitzaren kokapena eta metilazio egoera aztertuz (metilatua dagoen ala ez), hau da, metilomaren azterketa baimentzen du. WGBSren abantaila nagusia, genomako ia CpG dinukleotido guztiek duten metilazio-egoera hautemateko duen gaitasuna da, CpG dinukleotidoen dentsitate baxuko eskualdeak barne: geneen arteko “basamortu genikoak”, partzialki metilatutako domeinuak eta elementu erregulatzaile distalak, besteak beste (Yong et al., 2016).

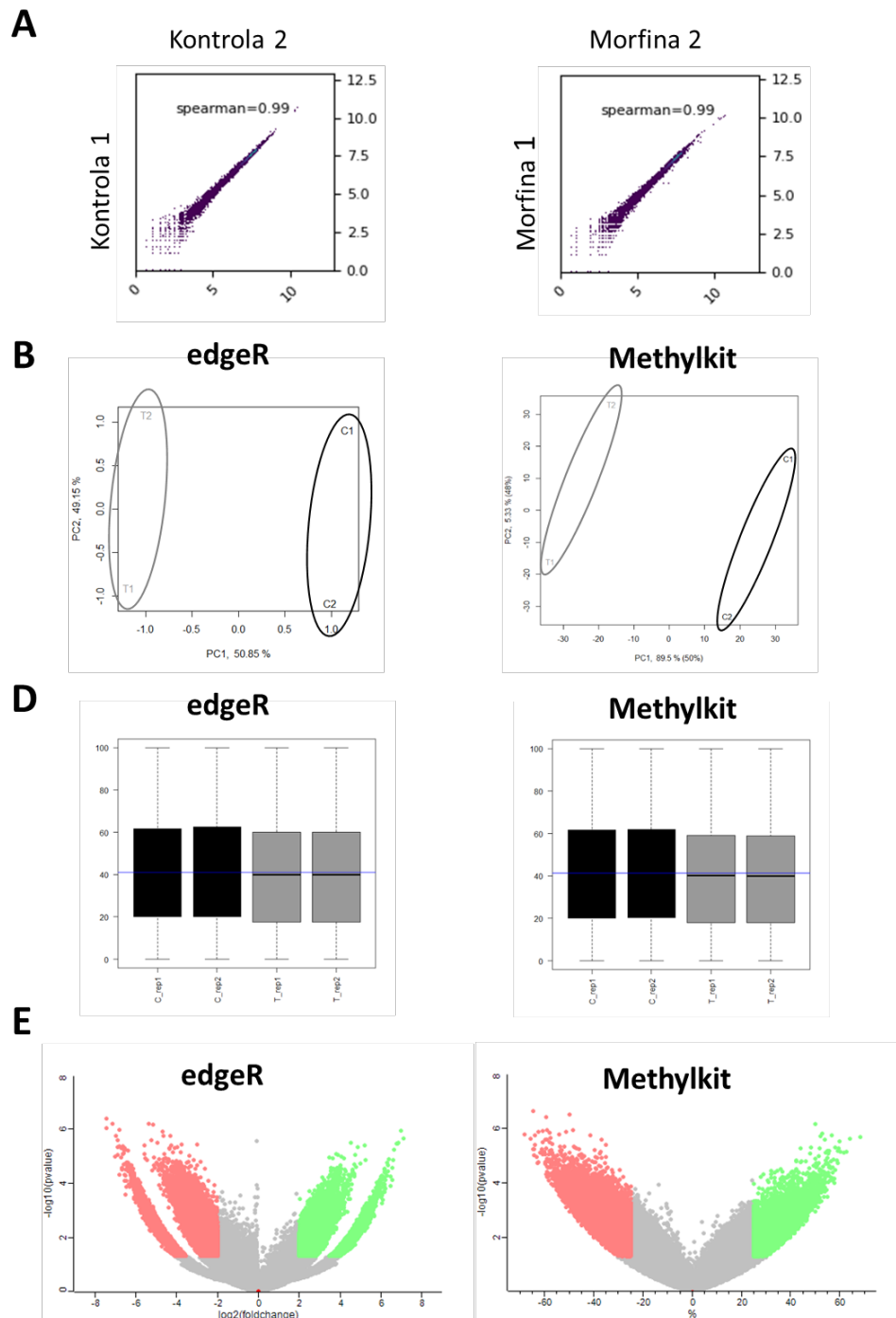
Helburu horretarako, genomako DNA *fenol-kloroformo/isoamiliko* teknikaren bidez erauzi zen, eta segidan, material genetiko horren zatiketa burutu zen sonikatzaile baten laguntzaz (Covaris LE220 ultrasonikatzailea). Horren bidez, 150-300 bp bitarteko DNA zatiak lortu ziren. liburutegien prestaketa eta sekuentziazio prozesua, kanpo zerbitzuek eskaintzen dituzten sekuentziazio plataformen bidez burutu zen, Bartzelonako CRG-en zehazki (Centre of Genomic Regulation) (<http://www.crg.eu/en/core/programmesgroups/genomics-unit>). Liburutegien prestaketarako, *KAPA Library Preparation Kit*-a erabili zen, produktuak gomendatutako pausuak jarraituz, eta bi muturretako (ingelesezko *paired end*) sekuentziazioa gauzatu. Egokitzaileak *xGen™ Methyl UDI-UMI Adapters*-en (*Integrated DNA Technologies*) protokoloak jarraituz gehitu ziren. Liburutegien kalitatea behatzeko, *Agilent 2100 Bioanalyzer DNA 7500 assay* bidezko kalitate-kontrola burutu zen. Sekuentziazio prozesua, aldiz, *Illumina NovaSeq 6000 S4* plataformaren bidez burutu zen 30x estaldurarekin lagin bakoitzeko, guztira 4 lagin izanik (kontrola eta morfina, eta

bakoitzeko bi erreplika). Sekuentzien kalitatea ebaluatzeko (eranskinak), errendimendu altuko sekuentziatorako *FastQC* analisiak burutu ziren, eta bertan lagin guztiek 30 baino kalitate handiagoko puntuazioa eskuratu zuten, sekuentziazio prozesuaren efizientzia %99,9 baino handiagoa izanik.

Diferentzialki Metilatutako Zitosinen (DMZ) identifikazioa

Lehenik eta behin morfinaren tratamendua jaso zuten mESC zelulek DNAREN metilazioari dagokionez pairatutako aldaketen karakterizazio orokorra gauzatu genuen, lagin-kontrola eta lagin-tratatuaren artean metilazioari dagokionez zeuden aldaketa guztiak aztertzeko helburuarekin. Horretarako, eskuetan genituen datu-gordinen kalitate analisia gauzatu genuen. *Spearman*-en korrelazio analisiaren bidez lagin mota bakoitzaren erreproduzigarritasuna egiaztatu genuen (4.5.A. irudia).

Hurrengo pausu nagusia *diferentzialki metilaturiko zitosina*-k (DMZ) identifikatzea izan zen. Hori burutzeko erreminta ugari badaude ere, zenbait kasutan ez da garbi egoten lagin mota bakoitzerako zein den egokiena, izan ere, bakoitzak formula matematiko eta estatistiko ezberdinak erabiltzen ditu. Horregatik, prozesu hori burutzeko onartuta dauden bi erreminta estatistiko ezberdin aukeratu genituen, lorturiko emaitzak konparatu eta bien artean amankomunak ziren datuak aztertu ahal izateko. Konparazio horrek, identifikaturiko aldaketen fidagarritasun maila askoz altuagoa izatea ekartzen du (Liu et al., 2020). Oinarritu ginen bi erreminta bioinformatikoak, *edgeR* (Chen, Visvader & Smyth, 2017) (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>) eta *methyKit* pakete estatistikoak (Akalin, Korkmasson, Li et al., 2012) (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/methylKit.html>) izan ziren. Tresna horietako bakoitzean *osagai nagusien analisia*-ren grafikoak (PCA; ingelesezko *principal component analysis*), laginen antzekotasuna aztertu zuen eta bi kasuetan erreplikaren arteko antzekotasuna eta laginen arteko (morfin vs. kontrola) desberdintasunak berretsi genituen (4.5.B irudia). Bestalde datu horiek normalizazio egokia erakutsi zuten (TMM normalizazioa, liburutegiaren tamaina kontabilizatuz) (4.5.D. irudia). Aipagarria da, bi lanabes horiek metilazio aldaketak modu ezberdinean aurkezten dituztela: lehenengoak *fold change* (FC) baliotan, eta bigarrenagoak, berriz, ehuneko baliotan. *Volcano plot* analisisiek bi erreminten bidez aztertutako DMZ horien ezberdintasunak berretsi zituen.

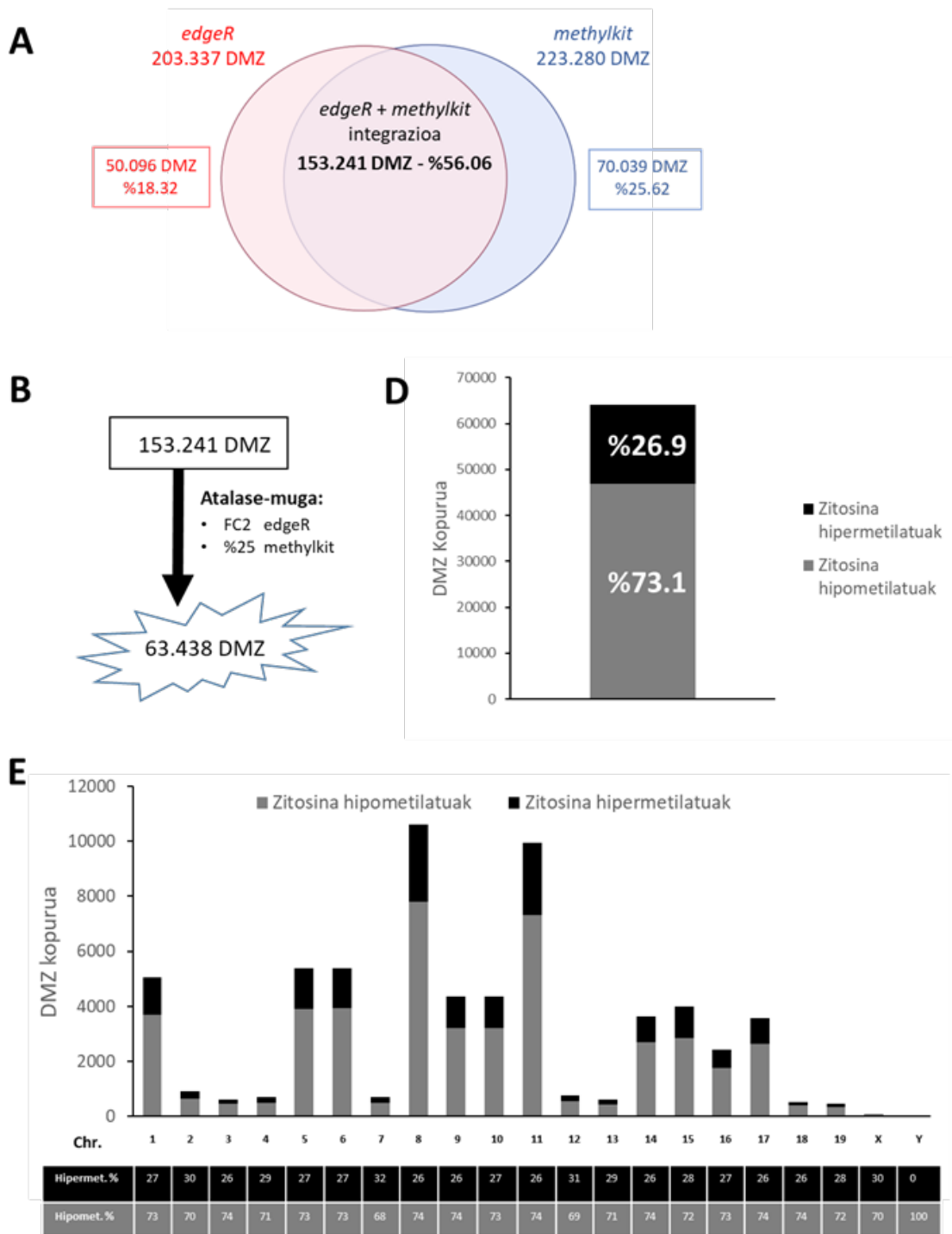


4.5. irudia. WGBS teknikaren bidez buruturiko metilomaren azterketa morfinaen tratamendua jasotako mESCTan. **(A)** Spearman-en korrelazioanalisisa lagin moten (kontrola eta morfina) erreproduzagarritasuna aztertzeko. **(B)** Osagai nagusien analisia (PCA) laginen arteko antzekotasunak eta desberdintasunak aztertzeko. **(D)** PCA analisisan erabilitako datuen normalizazioa. **(E)** *edgeR* eta *Methylkit* bidez lortutako DMZen *Volcano plot* analisi independenteak: puntu gorriak DMZ hipometilazioak eta puntu berdeak hipermetilazioak ($p < 0.05$), eta grisean baztertutako DMZ guztiak.

Hortaz, bi erreminta horiekin independenteki eskuratu genuen informazioa 4.6. irudian azter dezakegu. *edgeR* bidez identifikatu genituen DMZen kopurua 203.337 zitosenetakoa izan zen, eta *methylkit* erremintaren bidez, berriz, 223.280 zitosenetakoa ($0.05 > p$ -balioa eta $0.9 > q$ -balioa, bi kasuetan). Aipatu dugun moduan, datuen ziurtasun-maila handiagoa izateko, *edgeR* eta *methylkit* erreminten bidez lorturiko datu amankomunak ere identifikatu genituen, *bedtools* lanabesaren (<https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/>) eta *Arina* plataformen laguntzaz. Horrela, 4.6.A. irudian azter ditzakegun moduan, *edgeR* erremintaren bidez identifikaturiko 203.337 zitosenetik, eta *methylkit*-aren bidez identifikaturiko 223.280 zitosenetik, bi lanabesek amankomunak zituzten zitosenen kopurua 153.241 zitosenetakoa izan zen (datu guztien %56,06a). Bestetik, ondorengo pausuetarako baztertu genituen datuak, *edgeR* erreminta bidez identifikaturiko 50.096 DMZ izan ziren (datu guztien %18,32), eta *methylkit* erreminta bidez identifikatutako 70.039 DMZ (datu guztien %25,62).

Bestalde, lortutako DMZ horietan metilazio aldaketa nabariak identifikatzeko helburuarekin, bi atalase-muga (ingelesezko *threshold*) ezartzea erabaki genuen independenteki lanabes mota bakoitzean eskuraturiko emaitzei: bai zitosina hipometilatuetan eta bai hipermetilatuetan, 2ko *fold change* balioa ezarri genuen *edgeR*-etik lorturiko datuetan, eta %25eko portzentai balioa *methylkit*-etik lorturiko datuetan. Lorturiko datuen kopurua 4.6.B. irudian azter dezakegu: hasierako 153.241 DMZetik, 63.438 DMZ izatera pasatu ginen.

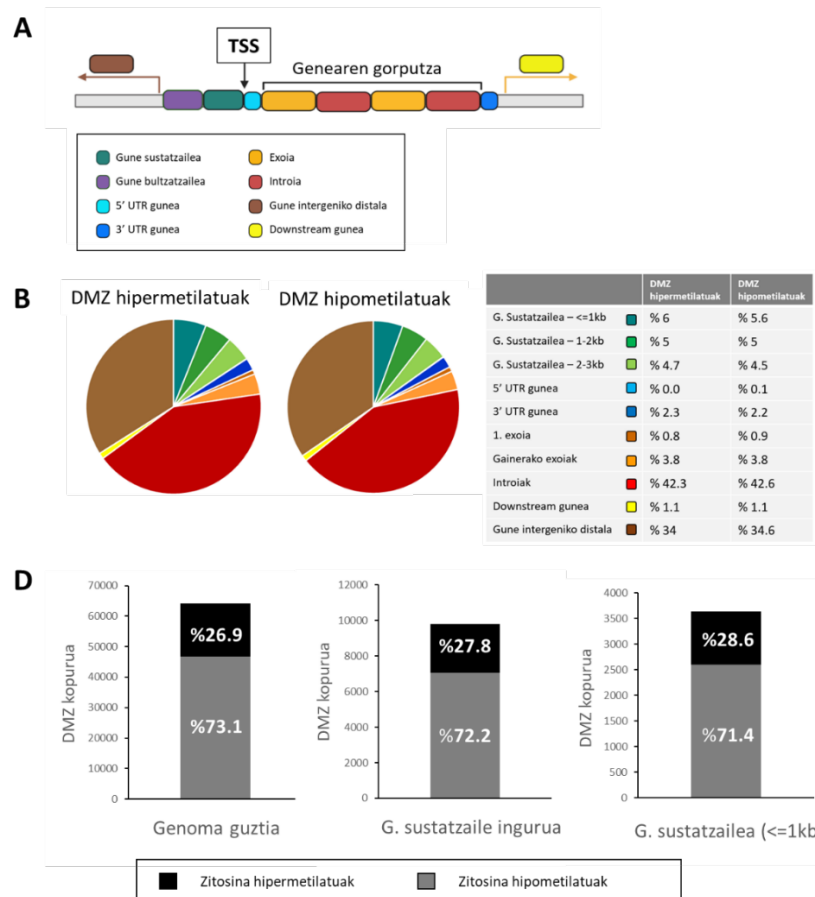
Ondoren, emaitza horiek modu sakonago batean aztertzen jarraitzeko helburuarekin, DMZen aldaketa joerak identifikatu genituen, DMZ hipermetilatuak eta hipometilatuak bereiziz (4.6.D. irudia). DMZ hipometilatuak hipermetilatuekin konparatzen baditugu, ia 3 aldiz zitosina hipometilatu gehiago topatu genituen genoma osoan zehar (2,71 aldiz gehiago zehazki; 46.822 zitosina hipometilatu (%73,1), 17.255 zitosina hipermetilaturen alboan (%26,9)). Horretaz gain, DMZ horien balioak kromosoma bakoitzeko ere aztertu genituen eta 4.6.E. irudian ikusi dezakegun moduan kromosoma bakoitzean topatu genituen DMZen kopurua oso ezberdina izan zen. DMZ gehienak, 8. eta 11. kromosometan topatu genituen nabarmenki. Alderantziz, 2., 3., 4., 7., 12., 13., 18., 19. kromosometan eta sexu-kromosometan (X eta Y) topaturiko DMZen kopuruak oso baxuak izan ziren, baina beti ere zitosina hipometilatuen kopurua hipermetilatuena baino handiagoa izan zen. Emaitza horiek guztiz bat datoz LC-MS/MS teknikarekin behatu genituen emaitzekin. Hortaz, morfinaren tratamendu kronikoak metilazio hondarraren jaitsiera sortzen duela esan dezakegu, egoera hipometilatu orokor bat sortuz.



4.6. irudia. Diferentzialki metilatutako zitosenen (DMZ) informazio orokorra mESCen genomari. **(A)** *edgeR* eta *methylkit* bidez identifikatutako DMZekin burututako integrazioa prozesua *Venn diagram* analisiaren laguntzaz; **(B)** Emaitzen esangarritasun-maila handitzeko ezarritako atalase-mugaren aplikazioa: 2ko *fold change*-a *edgeR* lanabesean, eta %25eko metilazio portzentaia *methylkit* lanabesean; **(D)** Atalase-mugadun DMZ hipermetilatuen eta hipometilatuen kopuru globalak; **(E)** DMZen banaketa mESCen genomako kromosometan.

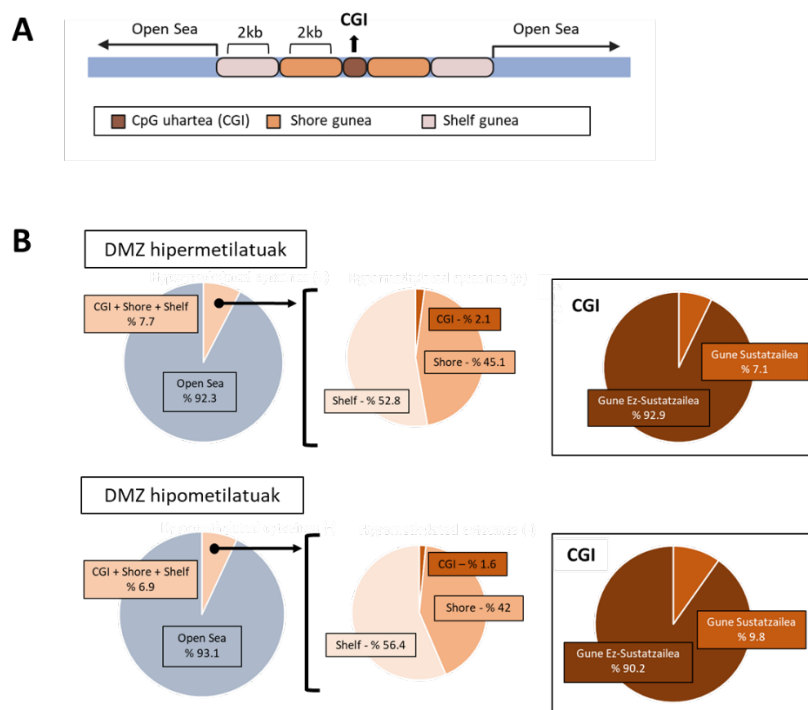
Hurrengo pausua DMZ horiek geneen zein gune zehatzetan topatzen diren identifikatzea izan zen, horiek izan dezaketen eragin zelular edo transkripzionala aztertzeko. Izan ere, gune sustatzaileak geneen adierazpenaren arautzaile nagusiak diren heinetik (Yang et al., 2016), gune horietan erortzen diren DMZk aztertzea oso interesgarria da. Kontuan hartu genituen geneen atalak hauexek izan ziren (4.7.A. irudia): gune sustatzailea, 5'UTR gunea, 3'UTR gunea, 1. exoia, gainerako exoiak, introiak, *downstream* gunea eta azkenik, gune intergeniko distala. 4.7.B. irudian ikusi daitekeen bezala, DMZ gehienak introietan eta gune intergeniko distalean topatu genituen (DMZ guztietatik %70 baino gehiago). Gainerakoan, DMZen %15a geneen gune sustatzailean eta bere inguruetan topatu genituen, hau da, gene horien adierazpenean eragin handia duten guneetan. Edozein kasutan, ehuneko horiek ezberdintasun leunak erakutsi zituzten DMZ hipometilatu eta hipermetilatuen artean, lehenengoen kopurua altuagoa izanez. Azkenik, aipatzekoa da geneen gune sustatzaileetara gerturatzen garen heinean, DMZ hipometilatuen portzentaia txikitzen doala, hipermetilazioen portzentai handiago bat kontzentratzen delarik (4.7.D. irudia).

Sarreran aipatu dugun moduan, geneen adierazpena erregulatzeko garaian CGI eremuek oso garrantzi handia dute. Horregatik, 4.8.B. irudian gune horietan eta inguruko eremuetan metilazioari dagokionez eman ziren aldaketak aztertu genituen, hipermetilazio eta hipometilazioak bereiziz. Bi kasuetan, DMZ gehienak (%90 baino gehiago) open sea bezala ezagutzen den gunean topatu genituen, hau da, aldaketa gehienak CGI guneetatik kanpo ematen direla behatu genuen. Hain zuzen ere, ez ziren %1era iritsi aldi berean gune sustatzaileekin eta CGI eremuekin kointziditu zuten DMZen kasuak. Hipermetilazio eta hipometilazioak bereiziz gero, bi eremu horiek kointziditzean DMZ hipometilatuek zuten presentzia altuagoa zela ikusi zen (DMZ hipometilatuen %9.8a, DMZ hipermetilatuen %7.1en alboan). Horrek, gune sustatzaileek CGI eremuekin kointziditzen dutenean DMZ hipermetilatuak topatzeko dagoen probabilitatea txikiagoa dela esan nahi du.



4.7. irudia. Ezaugarri genikoei dagozkionez DMZek aurkeztu zuten banaketaren azterketa. **(A)** Gene-egituraren irudi eskematikoa; **(B)** DMZek geneei dagokionez aurkeztu zuten banaketa, zitosina hipermetilatuak eta hipometilatuak bereiziz; **(D)** DMZen ehuneko balioak sustatzailerara gerturatu ahala: genoma guztiko DMZak; sustatzailetik 3kb-tara topatzen diren DMZak; sustatzailetik 1kb-tara topatzen diren DMZak.

Horrenbestez, DNAREN metilazio patroian ematen diren aldaketa gehienak, geneetatik at topatzen dira, eragin transkripzional berezirik gabe. Edonola ere, geneen gune sustatzailearen inguruan ere aldaketa ugari topatu genituen (%15), eta horiek funtzio gakoak bete ditzaketen morfina presentzian ematen diren erantzun zelularren modulazioan. Orokorrean, genoma osoan zehar metilazio mailen jaitsiera globala ikusi baguen ere, gune gako horietan topatu genituen metilazio mailak altuagoak izan ziren; gune horiek izan dezaketen garrantziaren adierazgarri, segur aski.



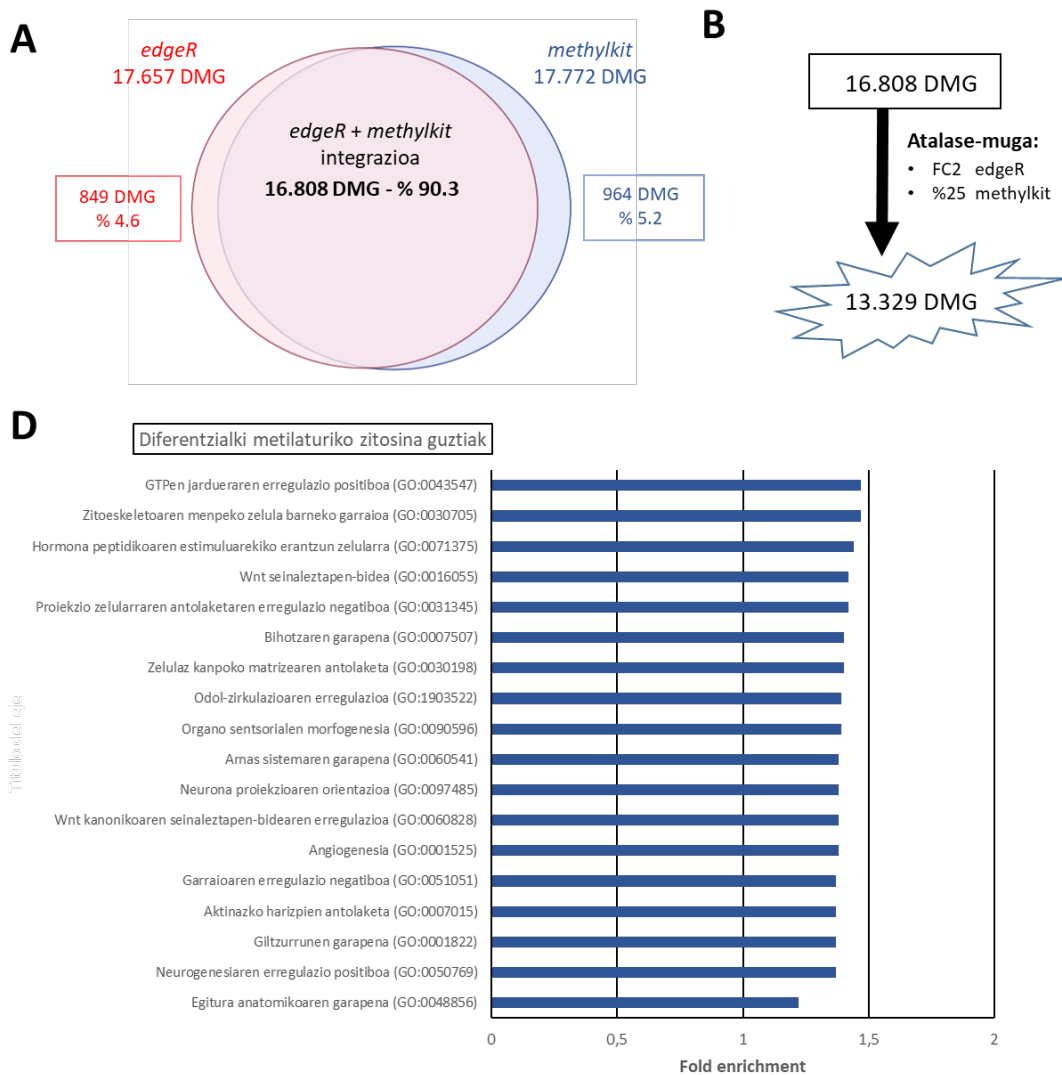
4.8. irudia. DMZek CpG uharteei (CGI) dagokionez aurkeztu zuten banaketaren azterketa. **(A)** CGI eta inguruko zonaldeak (*shore*, *shelf* eta *open sea*) aurkezten dituen irudi eskematikoa; **(B)** DMZak CGI eremuie dagokionez zein gunetan erori ziren adierazten duten grafikoak, CGI gune horie gune sustatzailean aurkitzen diren ala ez bereiziz.

Diferentzialki Metilatutako Geneen (DMG) identifikazioa

Diferentzialki metilaturiko zitosenak zeintzuk ziren identifikatu eta gero, hurrengo pausu nagusia zitosina horiek zein gene jakinetan topatzen ziren aztertzea izan zen, morfina sorturiko metilazio eraldaketak, transkripzio mailan duen eragina behatzeko. Identifikatutako gene horiei erreferentzia egiteko, hemendik aurrera *diferentzialki metilatutako gene*-en (DMG) inguruan hitz egingo dugu.

Aztertutako datuen arabera, DMGen kopuruak antzekoak izan ziren bi erreminten artean. *EdgeR* erremintaren kasuan, 17.657 gene zeuden eraginda morfina tratamendu kronikoaren ondorioz, eta *methylkit* erremintaren kasuan, berriz, 17.772 gene. Bien arteko datu amankomunen zifra *venn* diagramaren bidez lortu ziren, eta guztira 16.808 gene identifikatu ziren, gene guztien %90.3a (4.9.A. irudia). Horretaz gain *edgeR* erremintak %4.6 gene ezberdin gehiago hauteman zituen (849), eta *methylkit* erremintak, aldiz, %5.2 gene ezberdin gehiago (964). Datuen aldaketa maila esanguratsuenak identifikatzeko, DMGetan ere atalase-muga zorrotzagoak gehitu genituen: 2ko *fold*

change balioa *edgeR*-etik lorturiko datuetan, eta %25eko ehuneko balioa bigarren atalase moduan *methylkit*-etik lorturiko datuetan. Hori dela eta, aurretik genituen 16.808 geneetatik, 13.329 gene izatera pasatu ginen (4.9.B. irudia).



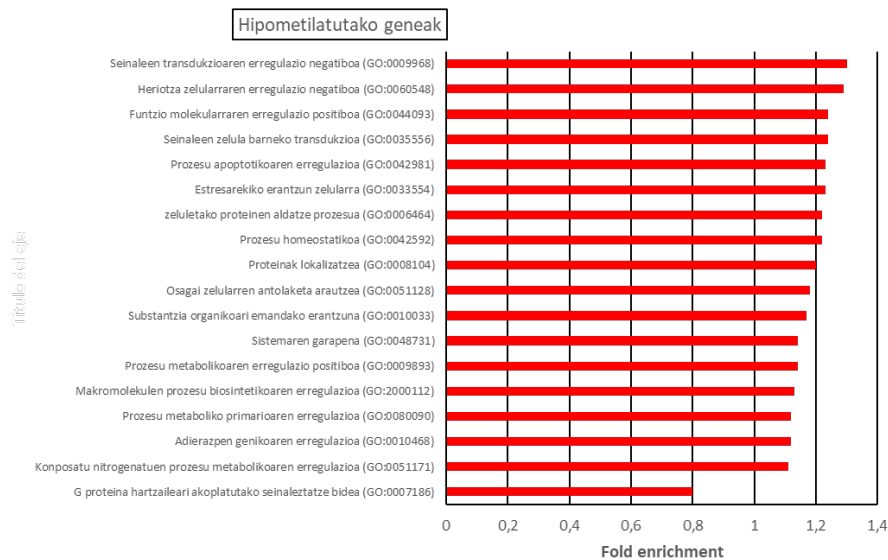
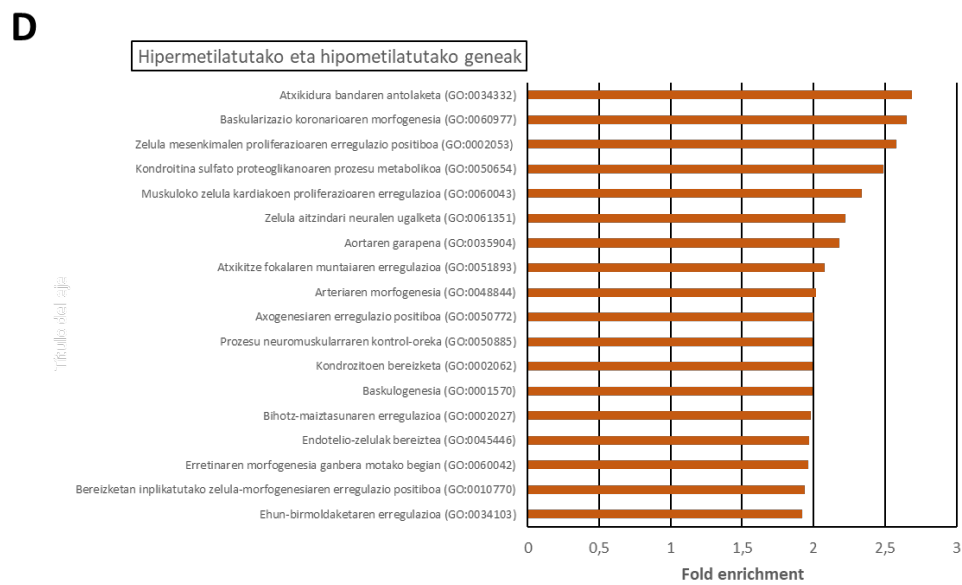
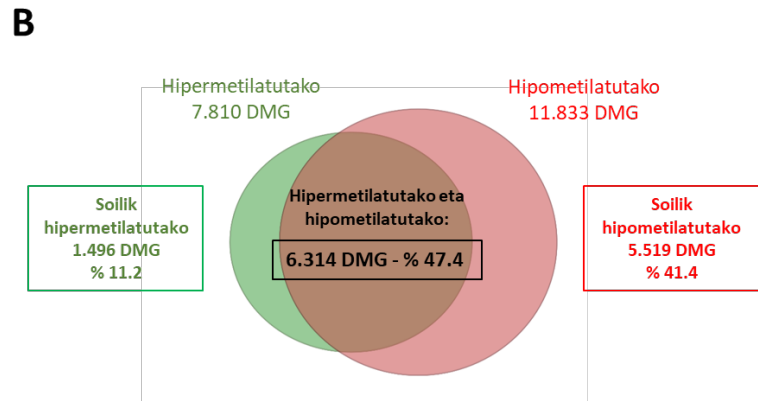
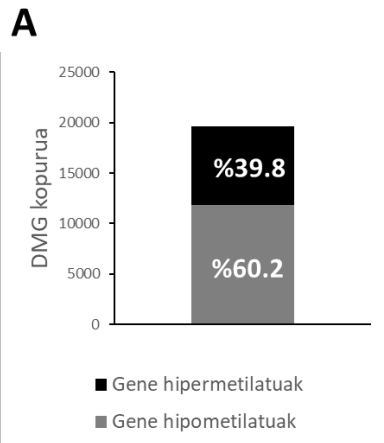
4.9. irudia. Diferentzialki metilatutako geneen (DMG) informazio orokorra. **(A)** *edgeR* eta *methylkit* bidez identifikatutako DMGekin burututako integrazioa prozesua *Venn diagram* analisiaren laguntzaz; **(B)** Emaitzen esangarratasun-maila handitzeko ezarritako atalase-mugaren aplikazioa: 2ko *fold change*-a *edgeR* lanabesean, eta %25eko metilazio portzentaia *methylkit* lanabesean; **(D)** Atalase-mugadun DMG datuekin burututako *gene ontology* azterketa (*Fisher's Exact* motako testa; $0,05 > p$ -balioa).

Ondoren, identifikatutako geneen ontologia analisia burutu genuen *gene ontology* (GO) lanabesaren laguntzaz. Emaitzetan ikusi genuen moduan (4.9.D. irudia), morfinaren tratamenduaren bidez DNAREN metilazio aldaketak aurkezten dituzten geneen funtzio

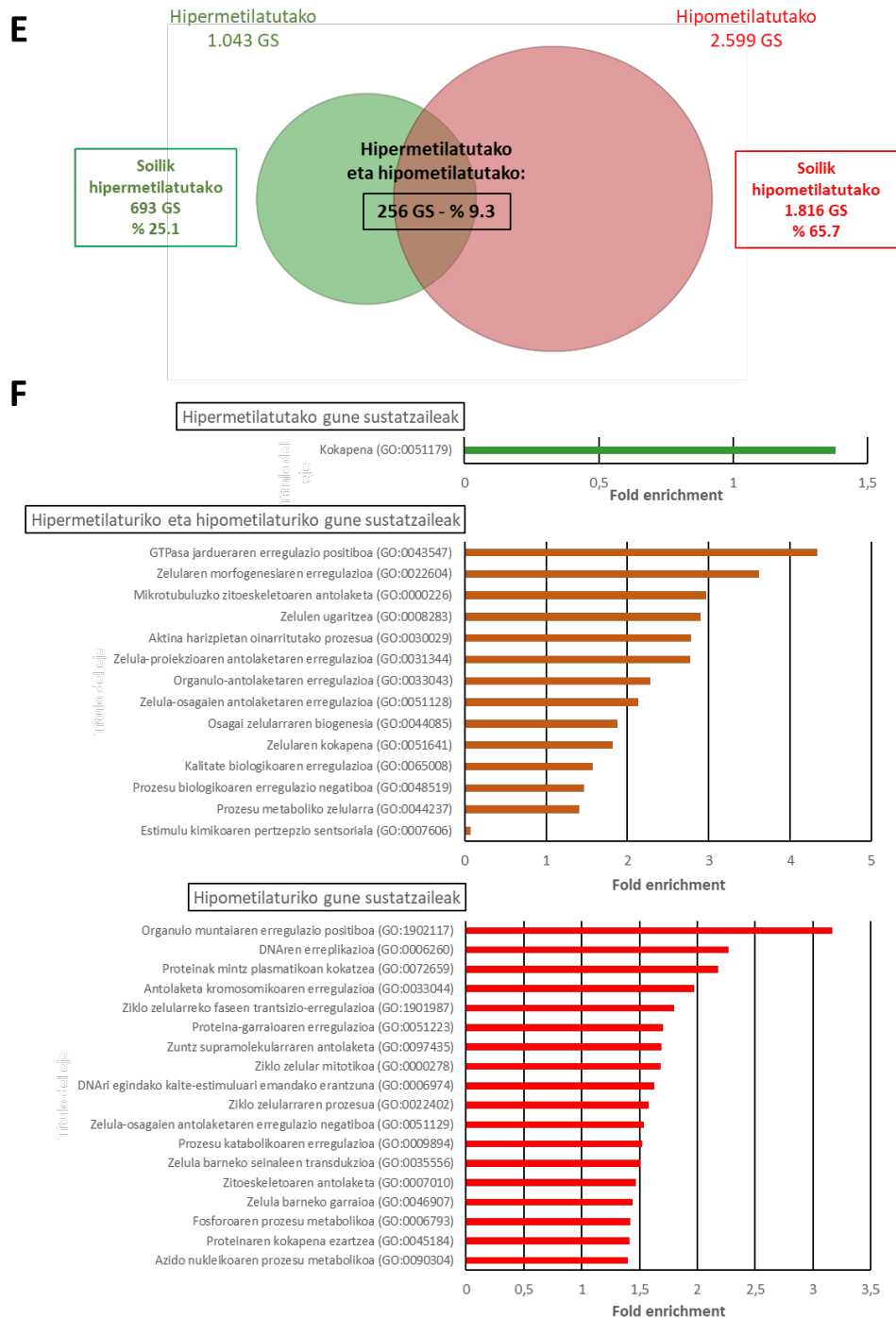
biologiko nagusiak asko dira, hala nola, GTPasa jardueraren erregulazio positiboa, zitoeskeleto bidezko garraio intrazelularra eta hormona peptidikoen estimuluarekiko erantzun zelularra. Edonola ere, aztertutako gene kopurua oso altua izan zenez, emaitzetan lortutako *fold enrichment* balioa baxua izan zen oro har.

Ondoren, gene hipermetilatuak eta hipometilatuak bereizi genituen (4.9.E. irudia), hauek inplikazio zeharo ezberdinak dituzte eta zelularen fisiologian. Orokorrean, morfinaren tratamendu kronikoak geneetan DMZ hipometilatu gehiago egotea eragin zuela ikus dezakegu (%60,2a). Hala ere, gene berbera hipermetilatuta edo hipometilatuta egon zitekeela kontuan hartuz, azterketa sakonago bat burutu genuen *venny* erreminta informatikoaren bidez, horrela, soilik hipermetilatuta zeuden DMGak, hipermetilatuta eta hipometilatuta zeuden DMGak, eta soilik hipometilatuta zeuden DMGak bereiziz. Emaitza horiek 4.10.A. irudian azter ditzakegu: gene guztien artean %11.2 soilik hipermetilatuta topatu ziren (1.496), geneen %47.4 hipermetilatuta eta hipometilatuta (6.314), eta geneen %41.4 soilik hipometilatuta (5.519). Hortaz, morfinaren tratamenduak egoera hipometilatua eragiten du mESC zeluletan, eta horrek, berriro ere, aurretik lorturiko emaitzak berresten ditu.

Jarraian, DMGen metilazio joeraren 3 patroiz ezberdinekin, talde bakoitza osatzen zuen geneen funtzio biologiko garrantzitsuenak zeintzuk ziren ikusteko ontologia analisia burutu genuen GO lanabesarekin. Hain zuzen, DNAREN metilazioa zelulak egoera jakin bati erantzun bat emateko pizten den mekanismo gidatua bada, horrek sortutako aldaketak zein funtzio biologiko bultzatu edo oztopatzen dituen jakin dezakegu. Soilik hipermetilatuta agertu ziren 1.496 geneetan analisi hori burutu genuenean, ez genuen inongo funtzio biologiko esanguratsurik topatu, geneen arteko erlazioa oso baxuagatik edota erabateko funtzio biologiko ezberdinak izateagatik, segur aski. Gainerakoan, beste bi DMG taldeen funtzio biologiko nagusiak 4.10.B. irudian azter ditzakegu. DMG hipermetilatu eta hipometilatuak biltzen zituen geneen funtzio biologikoak nagusiak atxikidura bandaren (ingelesezko *adherens junction*) antolaketa, baskularizazio koronarioaren morfogenesia eta zelula mesenkimalen proliferazioaren erregulazio positiboa izan ziren. Alderantziz, soilik hipometilatuta topatu genituen geneak aztertzean, horien artean nagusi ziren funtzio biologikoak seinaleen transdukzioaren erregulazio negatiboa, heriotza zelularraren erregulazio negatiboa eta funtzio molekularren erregulazio positiboa izan ziren.



(Irudiak hurrengo orrialdean jarraitzen du)



4.10. irudia. *Diferentzialki metilatutako geneen* (DMG) azterketa, aldaketa joerak bereiziz. **(A)** Atalase-mugadun DMG hipermetilatuen eta hipometilatuen kopuru globalak; **(B)** hipermetilatutako eta hipometilatutako DMGen datuekin gauzatutako integrazioa prozesua *venn diagram* analisiaren laguntzat; **(D)** Aurreko integrazio prozesuan lortutako gene taldeekin burututako *Gene Ontology* analisiak: Soilik hipermetilatutako DMGak (estadistikoki ez adierazgarria), hipermetilatutako eta hipometilatutako DMGak, eta soilik hipometilatutako DMGak; **(E)** hipermetilatutako eta hipometilatutako gene sustatzailea (GS) duten DMGen datuekin gauzatutako integrazioa prozesua *venn diagram* analisiaren laguntzat; **(F)** Aurreko integrazio prozesuan lortutako gene taldeekin burututako *Gene Ontology* analisiak: Soilik hipermetilatutako GSdun DMGak, hipermetilatutako eta hipometilatutako GSdun DMGak, eta soilik hipometilatutako GSdun DMGak; *Gene ontology* analisi guztiak *Fisher's Exact* motako testarekin burutu ziren ($0,05 > p$ -balioa).

DMGak aztertzeke garaietan, jada aipatu dugun moduan, gune sustatzailearen (GS) inguruan aurkitzen diren metilazioek garrantzi berezia izaten dute. Izan ere, horiek izan ohi dira, geneen adierazpena erregulatzeko hautagai nagusiak. Aurretik azaldutako emaitzetan, metilazioan ematen diren aldaketan %15 inguru (4.7.B. irudiko gune sustatzaileko DMZen datuen batura) gune horien inguruan topatzen direla behatu genuenez, hurrengo pausua, gune sustatzaile horietan zentratzea izan zen, soilik DMZ hipermetilatuak, DMZ hipermetilatuak eta hipometilatuak, eta soilik DMZ hipometilatuak dituzten gune sustatzaileak bereiziz. Horretarako, aurretik aipatu bezala *venny* erreminta informatikoa erabili genuen, eta horren emaitzak 4.10.D. irudian beha ditzakegu. Gune sustatzailea diferentzialki metilaturik zuten DMGen artean, %25.1 soilik hipermetilatuta aurkitu zen (693), %9.3 hipermetilatuta eta hipometilatuta aldi berean (256), eta azkenik, %65.7 soilik hipometilatuta (1.816). Hori dela eta, gene horien artean soilik hipometilatutako %25,1ak adierazpenaren beharakada jasango luke morfinaren tratamendu kronikoaren ondorioz, eta soilik hipermetilatutako %65,7ak, berriz, adierazpenaren gorakada. Informazio hori, orokorrean gene guztian zehar topatzen diren DMZekin konparatzen badugu, gune sustatzaileetan ematen den metilazio aldaketa-joera (gora edo behera) modu selektiboago batean ematen da. Izan ere, aldi berean DMZ hipermetilatuak eta hipometilatuak izateko maiztasuna, %47.4tik (4.10.A irudia) %9.3ra (4.10.D. irudia) iragaten da gene osoko datuetatik gune sustatzaileetako datuetara pasatzean.

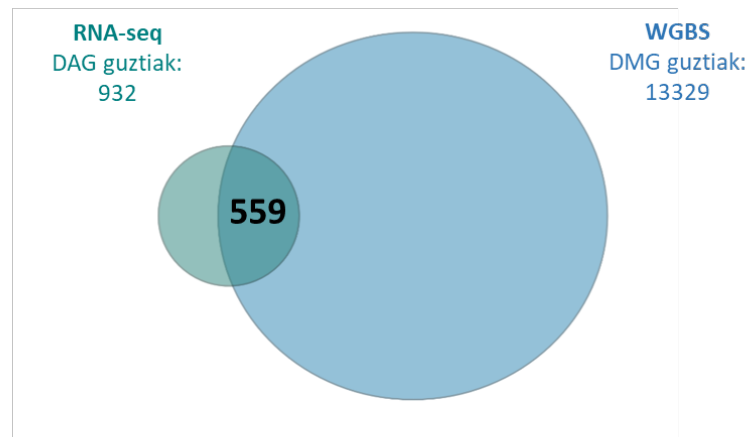
Hurrengo pausua, adierazpen aldaketa hori jasan zuten geneen funtzio biologiko printzipalak zeintzuk ziren aztertzea izan zen, eta horretarako, ontologia analisisa gauzatu genuen (4.10.E. irudia). Gune sustatzailea hipermetilatuta zuten DMGak lokalizazio funtzioarekin erlazionatu genituen, zeina metilazio joeragatik oztopatua aurkitzeko probabilitate handia dagoen. Berriz, gune sustatzailea hipometilatuta duten DMGen funtzioen artean *fold enrichment* altuena aurkezten duen funtzioa organulu-muntaiaren erregulazio positiboa da. Horrez gain, DNAREN erreplikazioa, kromosomen organizazioaren erregulazioa, ziklo zelularreko fase trantsizioaren erregulazioa, ziklo zelular mitotikoa eta DNAREN kalte estimuluaren erantzun zelularra ere identifikatu ziren, zeintzuek metilazio joeragatik areagotuak egongo liritekeen. Azkenik, gune sustatzailea, aldi berean hipermetilatuta eta hipometilatuta aurkeztu zuten DMGetan morfogenesi zelularren erregulazioa, mikrotubuluez eraturiko zitoeskeletoaren organizazioa eta populazio zelularren handipena bezalako funtzio biologikoak identifikatu ziren, horien gaineko eragin zelularra ezezaguna badugu ere.

4.2.1. mESC zeluletan WGBS teknikaren bidez eskuraturiko datuen integrazio RNAseq-eko datuekin.

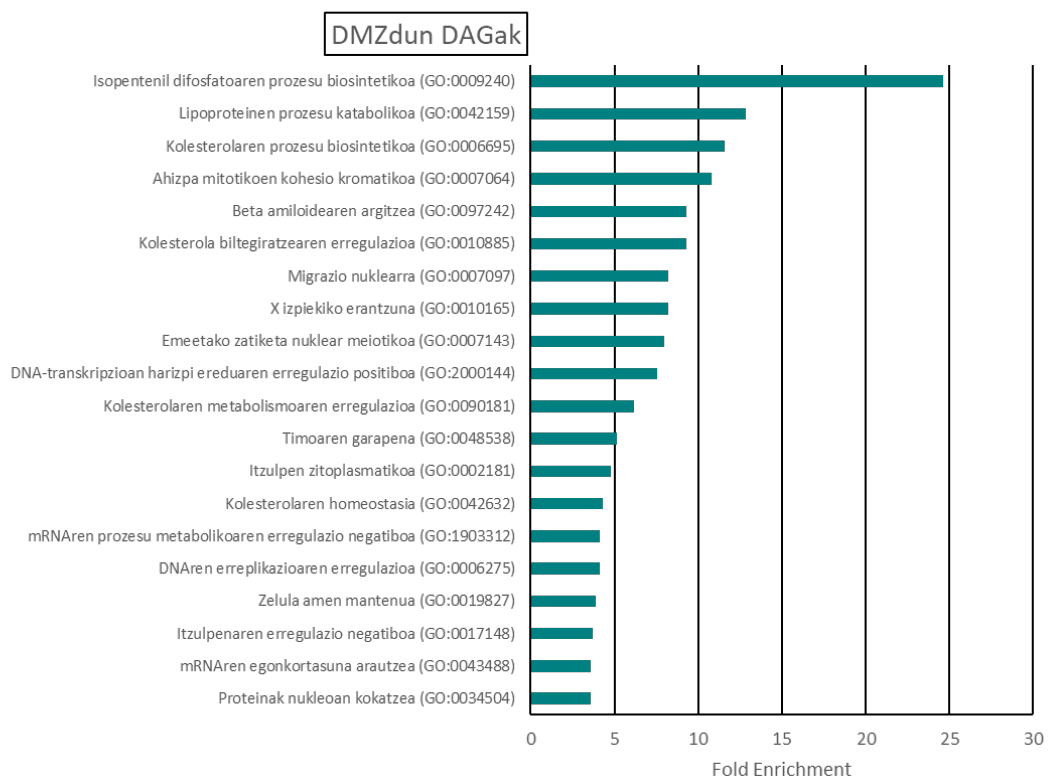
mESCtan *in vitro* tekniken bidez buruturiko morfinaren tratamendu kronikoak zelula horietan DNAREN metilazioari dagokionez eragiten dituzten aldaketak modu sakonago batean aztertzeko, orain arte aipatutako datuak, transkriptomaren analisiarekin bateratu genituen. Izan ere, gure ikertaldeak morfinaren tratamenduak mESCen genomako adierazpen globalean duen eragina aztertzeko RNAseq teknika gauzatu zuen aurreko proiektu batean. Analisi horretatik lortutako datuak, gure ikertaldeko tesi lan batean aztertu ziren (Muñoa-Hoyos, et al., 2020), eta datu horiek edonorentzat eskuragarri daude. Horrenbestez, gure hurrengo helburua morfinak eragindako DNAREN metilazio aldaketek geneen adierazpena aldatzeko gaitasuna zuten aztertzea izan zen, eta horretarako aipatutako bi tekniken integrazioa burutu genuen.

RNAseq analisi bidez aztertutako laginek, WGBS analisia gauzatzeko garaian burutu genuen esperimentazio fase bera izan zuten: *in vitro* tekniken bidez mESC zelulek morfinaren tratamendu kroniko bat jasan zuten 24 orduetan zehar (Yang et al., 2019), ondoren laginak bildu eta RNAseq analisia gauzatzeko prozedurari hasiera eman zitzaion. Bertan jarraitu zen prozedura osoa *Muñoa-Hoyos, I.-ren* tesi lanean dago zehaztuta. Bertatik lortutako *Diferentzialki Adierazitako Gene*-ak (DAG), aztertu berri genuen DMGen informazioarekin elkartu genituen, eta ondorioz, bi datu baseetan amankomunak ziren geneak hauteman genituen. Prozesu hori, *Venny* erremintaren laguntzaz burutu genuen. 4.11.A. irudian ikus dezakegun moduan, azpiadierazita eta gainadierazita zeuden geneak elkartuz, guztira 932 DAG genituen, eta, aitzitik, WGBS teknikaren bidez eraginda topatu genituen DMG guztiak, 13.329 gene izan ziren. Bi zerrenda horiek bateratzean, 559 gene komun topatu genituen, hau da, morfinaren ondorioz adierazpena asaldatua eta DNAREN metilazioan aldaketaren bat zuten 559 gene. Segidan, gure interesekoak ziren gene horien funtzio biologikoak aztertu nahi izan genituen, eta horretarako ontologia azterketa bat burutu genuen (4.11.B. irudia). Oso *fold enrichment* altuko funtzio biologikoak (Isopentenil difosfatoaren biosintesi prozesura, lipoproteinen prozesu katabolikora eta kolesterolaren prozesu biosintetikora bideratutako funtzioak) topatu bagenituen ere, funtzio interesgarri ugarian parte hartzen dituzten proteinak ere identifikatzea lortu genuen: kromatida ahizpa mitotikoen kohesioa, emeen zatiketa nuklear meiotikoa, DNAREN transkripzioaren erregulazio positiboa, DNAREN erreplikazioaren erregulazioa eta ama zelulen mantenua, besteak beste.

A



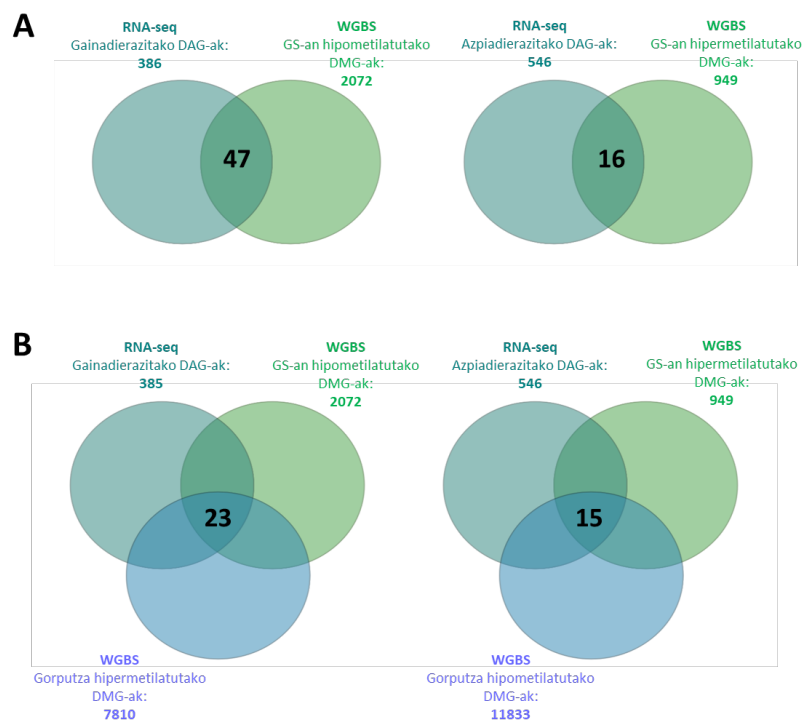
B



4.11. irudia. RNAseq eta WGBS analisietatik eskuraturiko datuekin buruturiko integrazio prozesua. **(A)** RNAseq analisitik lorturiko DAG guztien eta WGBS analisitik lorturiko DMG guztien artean amankomunak ziren geneak hauteman zituen integrazio prozesua *Venn diagram* analisiaren laguntzaz. **(B)** Aurreko analisisian lortutako geneen zerrenda amankomunarekin buruturiko ontologia analisia (*Fisher's Exact* motako testa; $0,05 > p$ -balioa).

Hurrengo pausua, DNAREN metilazioaren eta geneen adierazpenaren artean korrelaziorik bazegoen aztertzea izan zen. Orain arte buruturiko ikerketa gehienek aipatzen dutenez, gune sustatzaileetan topatzen diren metilazio aldaketek eragin handia dute gene horren adierazpen mailan (Walsch & Bestor, 1999; Shen et al., 2007; Hsieh, 1994; Jones & Takai,

2001; Wolffe & Matzke, 1999; Riggs, 1975; Holliday & Pugh, 1975). Gune sustatzailea hipometilatua dagoenean genearen adierazpenak gora egiten du, eta alderantziz, hipermetilatua dagoenean, behera. Hortaz, azpiadierazita eta gainadierazita zeuden geneak banandu eta eremu sustatzailean hipometilatutako edo hipermetilatutako DMGak integratu genituen *Venny* erreminta informatikoaren bidez (4.12.A. irudia). Integrazio prozesu horren ondoren, gainadierazita zeuden geneen artean 47 hautagai identifikatu genituen, eta azpiadierazita zeudenen kasuan, aldiz, 16 hautagai.



4.12. irudia. RNAseq eta WGBS tekniketako datuekin burututako integrazio prozesua *Venn diagram* analisiaren laguntzaz, aldaketa joerak bereiziz. **(A)** Lehendabizi, soilik sustatzaileko metilazio joerak dagozkien DAGekin burututako integrazio prozesua. **(B)** Bigarrenik, aurreko integrazio prozesuari gorputzetako metilazio joerak gehituta burututako integrazio prozesua.

Horrez gain, morfina onduz DNAREN metilazio aldaketa gehienak, geneen gorputz osoan zehar identifikatu genituen. Genearen gorputzean zehar topatzen diren metilazio aldaketa horiek ez dira gune sustatzailean ematen diren aldaketak bezain erabakigarriak geneen adierazpenean. Zenbait kasutan, esaterako, kontrako efektuarekin erlazionatu dira (Yang et al., 2015; Wolf et al., 1984), hau da, geneen gorputzak metilatuak topatzen direnean geneen adierazpena handituta ikusi izan da. Beraz, gune sustatzailean gertatzen dena aztertzeaz gain, geneen gorputzeko aldaketak ere kontuan hartuz geneen baheketa

berri bat burutu genuen hurrengo baieztapenak kontuan izanez: gune sustatzailea hipometilatua eta gorputza hipermetilatua dagoenean genearen adierazpenak gora egiten du; eta alderantziz, gune sustatzailea hipermetilatua eta gorputza hipometilatua dagoenean, behera. Horretarako ere, *Venny* bidez integrazio prozesu bat burutu genuen hiru baldintzak betetzen dituzten kasu guztiak hautemateko, eta DNAREN metilazioaren bidez adierazpena aldatua izan dezaketen gene kandidatu nagusiak identifikatzeko helburu nagusiarekin. 4.12.B. irudian ikusi daitekeen bezala, gainadierazita zeuden 23 gene, eta azpiadierazita zeuden 15 gene identifikatu genituen, eta horiek jarraian zehaztu genituen 4.1. taulan. Gune sustatzailea hipometilatuta eta gorputza hipermetilatuta zuten geneetatik, adierazpena emendatuta ikusi zuten kasuak, honako hauek izan ziren: *Abhd16a*, *Acly*, *Agfg2*, *Aldoc*, *Aspscr1*, *C77080*, *Dnmt3l*, *Ggt1*, *Hmces*, *Ltbr*, *Myom2*, *Nr4a1*, *Ppard*, *Rab11fip3*, *Rapgef3*, *Rnf145*, *Stard3*, *Tecr*, *Tmc6*, *Tmub1*, *Trmt1* eta *Vill*. Alderantziz, gune sustatzailea hipermetilatuta eta gorputza hipometilatuta zuten geneetatik, adierazpena gutxitua ikusi zuten kasuak, honako hauek izan ziren: *Akap9*, *Brca2*, *Cpeb4*, *Eri1*, *Glmn*, *Kdm5a*, *Kmt2c*, *Nbeal1*, *Ppp1cb*, *Tacc1*, *Ubn2*, *Zfp326*, *Zfp445* eta *Zfp638*.

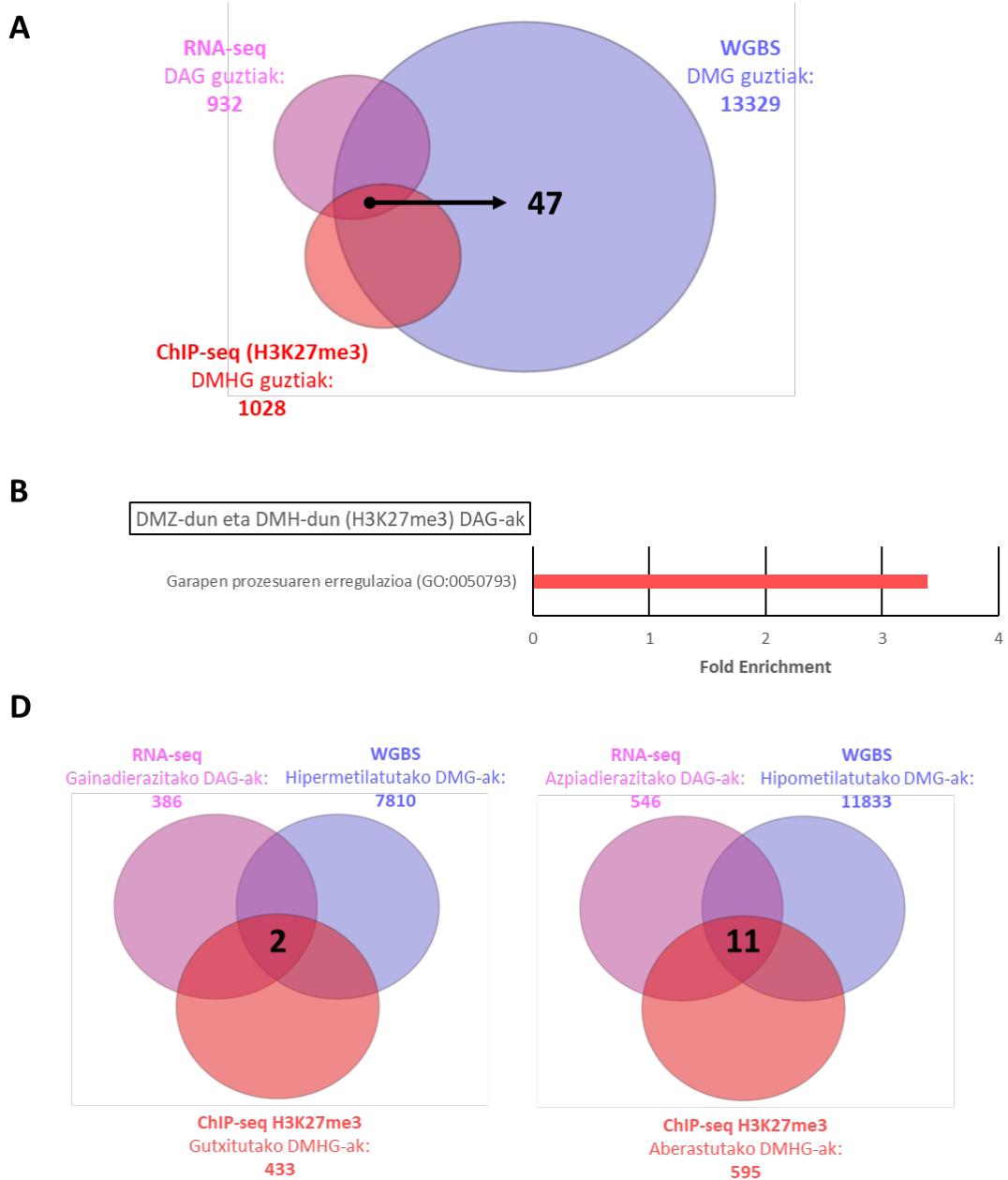
4.1. taula. mESC zeluletan morfinaeren tratamendu kronikoaren ondoren buruturiko RNAseq eta WGBS analisietan lorturiko datuen integrazio prozesutik lortutako geneen zerrenda.

Gainadierazitako geneak		Azpiadierazitako geneak	
Abhd16a	Abhydrolase Domain Containing 16A, Phospholipase	Akap9	A-Kinase Anchoring Protein 9
Acly	ATP Citrate Lyase	Brca2	BRCA2 DNA Repair Associated
Agfg2	ArfGAP With FG Repeats 2	Cpeb4	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 4
Aldoc	Aldolase, Fructose-Bisphosphate C	Eri1	Exoribonuclease 1
Aspscr1	ASPSR1 Tether For SLC2A4, UBX Domain Containing	Glmn	Glomulin, FKBP Associated Protein
C77080	KIAA1522	Kdm5a	Lysine Demethylase 5A
Dnmt3l	DNA Methyltransferase 3 Like	Kmt2c	Lysine Methyltransferase 2C
Ggt1	Gamma-Glutamyltransferase 1	Lnpep	Leucyl And Cystinyl Aminopeptidase
Grb7	Growth Factor Receptor Bound Protein 7	Nbeal1	Neurobeachin Like 1
Hmces	5-Hydroxymethylcytosine Binding, ES Cell Specific	Ppp1cb	Protein Phosphatase 1 Beta
Ltbr	Lymphotoxin Beta Receptor	Tacc1	Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein 1
Myom2	Myomesin 2	Ubn2	Ubinuclein 2
Nr4a1	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1	Zfp326	Zinc Finger Protein 326
Ppard	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta	Zfp445	Zinc Finger Protein 445
Rab11fip3	RAB11 Family Interacting Protein 3	Zfp638	Zinc Finger Protein 638
Rapgef3	Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 3		
Rnf145	Ring Finger Protein 145		
Stard3	StAR Related Lipid Transfer Domain Containing 3		
Tecr	Trans-2,3-Enoyl-CoA Reductase		
Tmc6	Transmembrane Channel Like 6		
Tmub1	Transmembrane And Ubiquitin Like Domain Containing 1		
Trmt1	TRNA Methyltransferase 1		
Vill	Villin Like		

4.2.2. mESC zeluletan WGBS teknikaren bidez eskuraturiko datuen integrazio prozesua, RNAseq eta ChIPseq analisisekin.

RNAseq eta WGBS analisisietatik lortutako datuen integrazio prozesua burutu ondoren, gaian are gehiago sakondu ahal izateko, gure esku ditugun bestelako datu baseekin ere konparatzea erabaki genuen. Kasu horretan, H3K27me3 eraldaketa (H3 histonaren 27. lisina hondarreko trimetilazioa) epigenetikoarekin buruturiko ChIPseq sekuentziazio-teknikaren bidez lortutako datuekin konparatu genituen aurretik lortutako emaitzak. Bertan erabilitako laginek esperimentazio fase bera izan zuten; *in vitro* tekniken bidez mESC zelulek morfinaren tratamendu kroniko bat jasan zuten 24 orduetan zehar (Yang et al., 2019). Morfinaren tratamendua eta gero, laginak analisi mota hori egitera bidali ziren, eta bertan lorturiko emaitzak edo datuak eskuragarri ditugu (Muñoa-Hoyos et al. 2020). Teknika horren bidez, H3K27me3 eraldaketa epigenetikoak genomatik izandako banaketaren aldaketa aztertzeke aukera eskaini zigun. Ugaztunotan, H3K27me3 eraldaketa, geneen errepresioarekin erlazionatzen da, eta hein handi batean, horren banaketa geneen gune sustatzaileran murrizten da (Peterson & Laniel, 2004). Aipatu dugun moduan, funtzio errepresioegilea du, eta morfinaren ondorioz zelulak burutzen duen erantzun fisiologikoan parte hartzen du.

Horrenbestez, hurrengo atalean hiru teknika horien integrazioa gauzatu genuen, hiru tekniken bidez lortu genituen datuen artean korrelaziorik zegoen ala ez aztertzeke. Lehenengo, adierazpena eraldatua izan zuten DAG guztiak (RNAseq), DNAREN metilazioari dagokionez patroia eraldatua izan zuten gene guztiak (WGBS), eta H3K27me3 eraldaketari dagokionez aldaketa adierazgarriak zituzten gene guztiak integratu genituen gene amankomunak identifikatu ahal izateko helburuarekin, eta *Venny* erremintaren laguntzaz. 4.13.A. irudian ikus dezakegun moduan, azpiadierazita eta gainadierazita zeuden geneak elkartzuz, guztira 932 DAG identifikatu genituen, WGBS teknikaren bidez eraginda topatu genituen DMG guztiak 13.329 izan ziren, eta azkenik, genoma osoan zehar H3K27me3 eraldaketaren presentzia aldaketa adierazgarriak jasan zituzten geneak, 1.028 izan ziren. Zerrenda horiek bateratu eta gero, hiru kasuetan aldaketak izan zituzten geneak 47 izan ziren guztira. Ondoren, gene talde horrek funtzio biologikoa jakinik bazuen aztertu nahi izan genuen, eta horretarako ontologia azterketa bat burutu genuen. 47 gene horietatik 17-k, garapen prozesuaren erregulazioan parte hartzen zutelako behatu genuen, ia 3,5ko *fold enrichment* balioarekin (4.13.B. irudia).



4.13. irudia. mESC zeluletan buruturiko RNAseq, WGBS eta ChIPseq (H3K27me3) analisietatik eskuraturiko datuekin buruturiko integrazio prozesua. **(A)** DAG (RNASeq), DMG (WGBS) eta ChIPseq (H3K27me3) analisitik lortutako DMHG (H3K27me3 ChIPseq) guztien artean amankomunak ziren kasuak hauteman zituen integrazio prozesua *Venn diagram* analisiaren laguntzaz ; **(B)** Aurreko analisisian lortutako geneen zerrenda amankomunarekin burututako ontologia analisia (*Fisher's Exact* motako testa; $0,05 > p$ -balioa); **(D)** Aurreko *-(A) ataleko-* integrazio prozesu bera, baina oraingoan aldaketa joerak bereiziz, eta korrelazio zuzena erakusten duten aldaketa joerak elkartuz burututako integrazio prozesu independenteak, *Venn diagram* analisiaren laguntzaz.

Aipatu berri dugun integrazio prozesu horretan ez genituen aldaketa joera motak kontuan hartu, ezta joera horien artean korrelaziorik bazegoen ala ez. Izan ere, gai horren inguruan dagoen bibliografia aztertzen badugu, gune sustatzailean zitosina metilatuaren eta H3K27me3 eraldaketaren presentziak eta genearen gorputzean zitosina metilatuaren absentsiak, gene horren adierazpenaren errepresioa dakarrela ikus dezakegu, eta alderantziz, aurkako egoera epigenetikoak adierazpenaren emendioa dakarrela (Li et al., 2020; Cai et al., 2021; Yang et al., 2015; Wolf et al., 1984). Horrenbestez, bigarrenengo integrazio analisi bat burutu genuen *Venny* erremintaren bidez, azpiadierazita eta gainadierazita zeuden geneak bereiziz (4.13.D. irudia). Azpiadierazita zeuden geneen artean 11 gene topatu genituen (1/gune sustatzailean H3K27me3 eraldaketaren presentzia nabarmenki emendatua, 2/ genearen gorputzak nagusiki hipometilatua, eta 3/ genearen adierazpena nabarmenki gutxitua). Alderantziz, gainadierazita zeuden geneen artean, 2 gene topatu genituen (1/ gune sustatzailean H3K27me3 eraldaketaren presentzia nabarmenki gutxitua, 2/ genearen gorputzak nagusiki hipermetilatua, eta 3/ genearen adierazpena nabarmenki handitua). Identifikaturiko gene horiek 4.2. taulan zerrendatu genituen. Gainadierazita topatu genituen geneak *Kif1a* eta *Nefm* izan ziren. Alderantziz, azpiadierazita topatu genituen geneak honako hauek izan ziren: *Atad5*, *Cnot6l*, *Lpgat1*, *Man2a1*, *Pgap1*, *Pikfyve*, *Platr10*, *Psme4*, *Smchd1*, *Suz12* eta *Tead1*. Hortaz, gene horiek izan zuten adierazpen diferentziala bi eraldaketa mota horien lan kooperatibo baten bidez eman zela pentsa dezakegu. Edonola ere, kasu bakoitza banaka aztertzea beharrezkoa da.

4.2. taula. mESC zeluletan morfinaren tratamendu kronikoaren ondoren buruturiko RNAseq, WGBS eta ChIPseq (H3K27me3) analisisetan lorturiko datuen integrazio prozesutik lortutako geneen zerrenda.

Gainadierazitako geneak		Azpiadierazitako geneak	
<i>Kif1a</i>	Kinesin Family Member 1A	<i>Atad5</i>	ATPase Family AAA Domain Containing 5
<i>Nefm</i>	Neurofilament Medium Chain	<i>Cnot6l</i>	CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 6 Like
		<i>Lpgat1</i>	Lysophosphatidylglycerol Acyltransferase 1
		<i>Man2a1</i>	Mannosidase Alpha Class 2A Member 1
		<i>Pgap1</i>	Post-GPI Attachment To Proteins Inositol Deacylase 1
		<i>Pikfyve</i>	Phosphoinositide Kinase, FYVE-Type Zinc Finger Containing
		<i>Platr10</i>	Pluripotency associated transcript 10
		<i>Psme4</i>	Proteasome Activator Subunit 4
		<i>Smchd1</i>	Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1
		<i>Suz12</i>	SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
		<i>Tead1</i>	TEA Domain Transcription Factor 1

4.3. Morfinak DNAREN metilazioaz arduratzen den konplexu proteikoan eragiten duen autoerregulazioa

DNAREN metilazioak genomak sorturiko aldaketa globalen deskribapen orokor bat burutu eta gero, jarraian eraldaketa epigenetiko horren presentzian eragiten duen makineria proteikoaren inguruan ikerketa sakonago bat burutzea erabaki genuen. Atal honen helburu nagusia, mESCtan buruturiko morfinaren tratamendu kronikoak DNAREN metilazio mailetan sorturiko aldaketak azalduko dituen makineria proteikoak autoerregulazio mekanismorik baduen ala ez aztertzea izan zen. Horretarako, metilasiak eta demetilasiak geneetan DNAREN metilazio mailak aztertu genituen *Whole genome bisulfite sequencing* bitartez (WGBS). Aldi berean, morfinak gene horietan eragindako adierazpen aldaketak, eta beste marka epigenetiko baten (H3K27me3) aldaketak ere aztertu genituen, RNAseq eta ChIPseq tekniken bidez, hurrenez hurren. Hiru datu-baseen irudikatzea *UCSC Genome Browser* erreminta informatikoaren bidez burutu genuen, eta horren bidez hiru informazio iturrietatik eskuraturiko geneen paisaiak (ingelesezko *landscape*) aztertu ahal izan genituen. DNAREN metilazioa gauzatzen duten DNMT proteina katalitiko nagusiak aztertzeaz gain (metilasiak), horien presentzia erabat baldintzatzen dituzten MBD (metilo taldearen mantentzea ahalbidetzen duten proteina familia) eta TET (demetilasiak) gene-familietako kideak ere aztertu genituen.

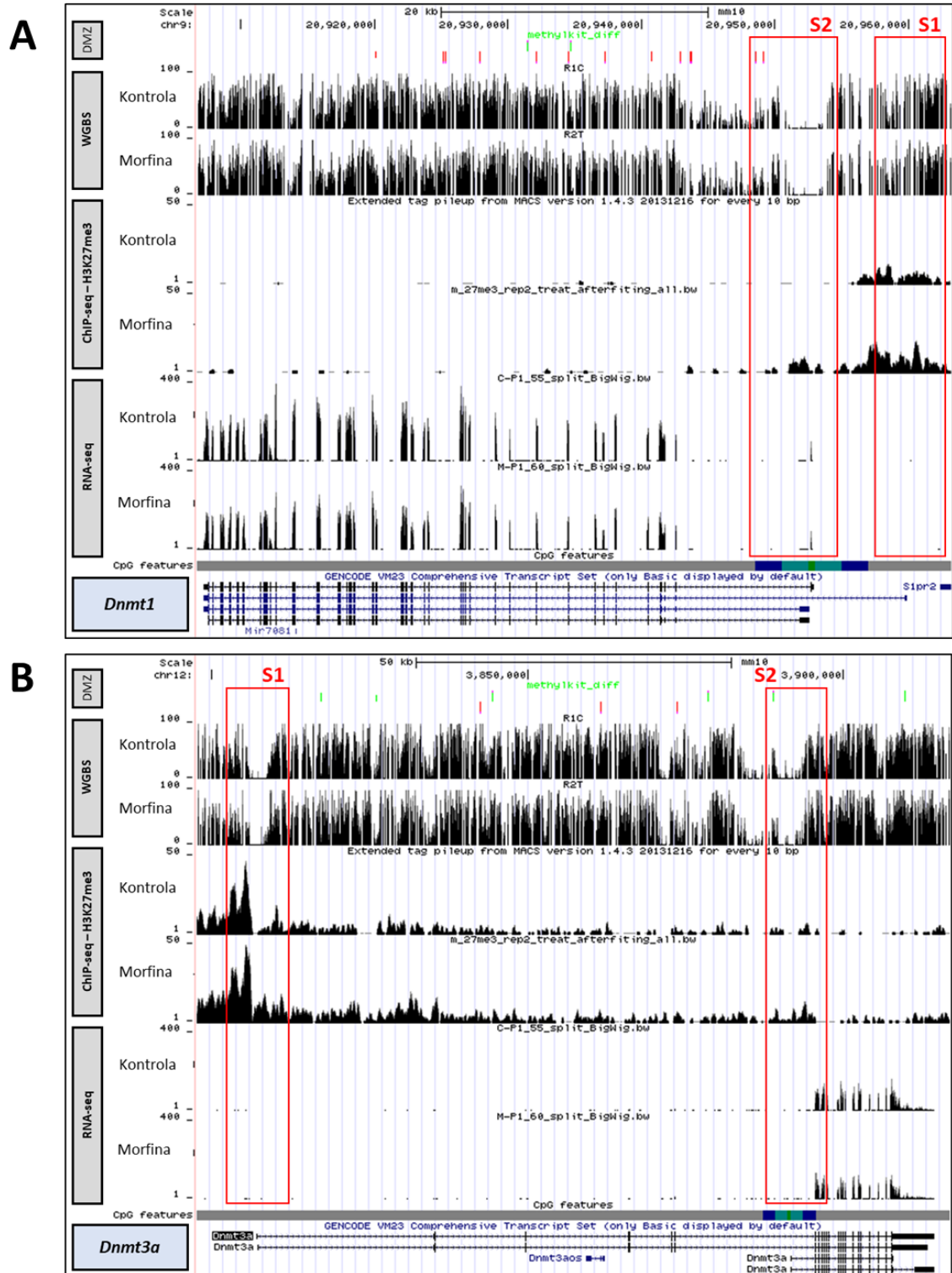
4.3.1. DNAREN metilasiak diren DNMT proteinek:

DNMT proteina familian aztertu genituen entzima katalitikoak nagusiak hauexek izan ziren: DNMT1, DNMT3A eta DNMT3B. Gene horiei dagokienez aztertutako informazioaren paisaiak biltzen dituzten irudikapenak 4.14.A, B eta D. irudian azter ditzakegu.

Lehenengo pausua, entzima katalitiko horien geneetan WGBS teknikaren bidez lorturiko metilazio mailak aztertzea izan zen. *Dnmt1* eta *Dnmt3a* geneetan metilazio-aldaketa adierazgarriak topatu genituen, eta *Dnmt3b* genean, aldiz ez (4.14 irudia). Morfinak, *Dnmt1* genean hipometilazio ugari sortu zituen genearen gorputz osoan zehar, oro har, baina baita gune sustatzaile nagusiaren inguruan ere (transkripto ezberdinen gune sustatzaileak kaxa gorrien bidez adierazi ditugu). Gene horrek dituen 4 transkriptoetatik

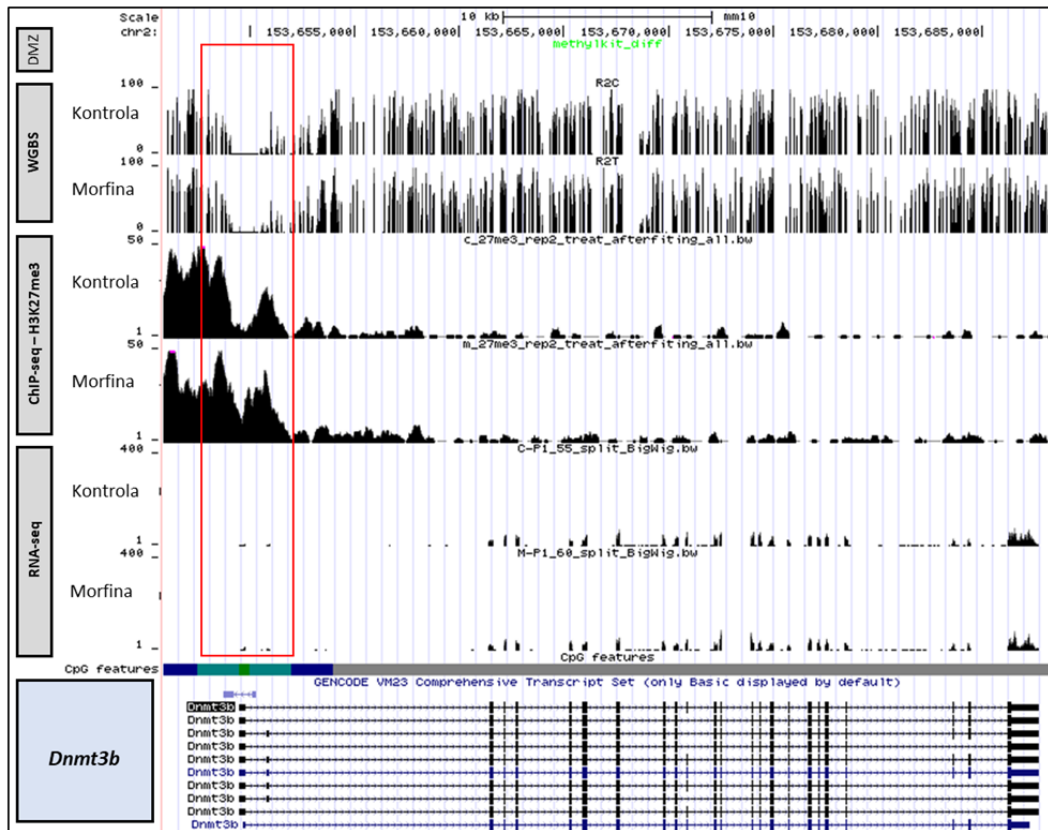
hiruk, CGI eremu batean dute gune sustatzailea (S2; GS nagusia), eta geratzen den transkriptoak, ordea, urgora (S1). S1 gune sustatzailea erabat metilatua topatu genuen, bai kontrolean eta bai morfinan, inongo aldaketarik gabe. S2 gune sustatzailea, aldiz, adierazgarriki hipometilatua topatu genuen. *Dnmt3a* genea, ostera, nagusiki hipermetilatua ikusi genuen morfinaren presentzian. *Dnmt3a* geneak lau transkripto desberdin ditu, bi luze eta bi motz. Bi transkripto luzeen gune sustatzailean ez genuen DMZrik topatu, eta transkripto motzen gune sustatzailean, berriz, hipermetilazio gako bat topatu genuen. Aldaketa horren kokapenak, gainera, bat egiten du *Dnmt3a* genearen CGI bakarraren shelf gunearekin. Amaitzeko, *Dnmt3b* genearen kasuan ez genuen DMZ esanguratsurik topatu haren gorputz osoan zehar, ezta gune sustatzailean ere. Kasu guztietan, gune sustatzaile inguruan ikusitako emaitzak kaxa diagrama bidez balioztatuak izan ziren (4.15.A irudia).

Jarraian, morfinak eragindako metilazio aldaketek adierazpen genikoan izan ditzaketen eraginak identifikatu nahian, gene bakoitzaren RNAseq-eko datuak aztertu genituen. Aipagarria da hiru gene horiek mESCtan duten berezko adierazpen-mailen diferentzia handiak: *Dnmt1* geneak erakutsi zituen berezko mailak (CPM balioak; ingelesezko *counts per million*) aintzat hartuz, *Dnmt3a* genearen mailak erdira murrizten dira, eta *Dnmt3b* genearen kasuan, berriz, are gehiago (4.14 irudia). *Dnmt1* geneak jaitziera adierazgarri bat jasan zuen morfinaren presentzian. *Dnmt3a* geneari dagokionez, transkripto luzeenek ez zuten inongo adierazpenik izan, ez kontrolean eta ez lagin tratatuetan. Bi transkripto motzek, ostera, adierazpen handiagoa erakutsi zuten morfinaren tratamendu ostean. Hala ere, RNAseq datuak aztertzean ez genuen inongo aldaketa adierazgarririk topatu bi laginen artean; hortaz, morfinak gune sustatzailean eragindako DMZ hipermetilatuak ez zuten transkripto horien adierazpena murrizteko behar besteko gaitasunik izan. Azkenik, *Dnmt3b* geneari dagokionez, ez genuen inongo aldaketarik sumatu RNAseq-eko datuak aztertzerako garaian. Adierazpen aldaketa horiek CPM balioak normalizatuz berretsi genituen (4.15.B irudia).



(Iru diak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

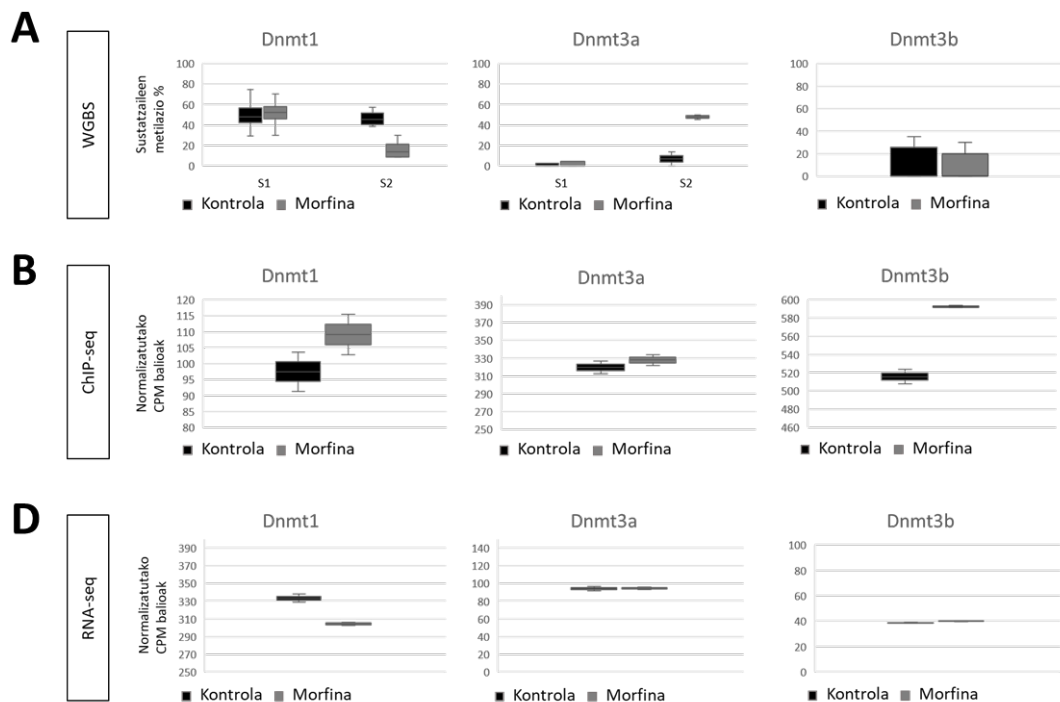
D



4.14. irudia. DNaren metilazioaz arduratzen diren *Dnmt* gene familiako kide katalitiko nagusien erregulazio epigenetikoa. Morfinak mESCtan eragindako erregulazio epigenetikoa (A) *Dnmt1*, (B) *Dnmt3a* eta (D) *Dnmt3b* geneetan. UCSC genome browser plataforma bidez irudikatuak. Goitik behera: WGBS, ChIPseq (H3K27me3) eta RNAseq. DMZ, WGBS datuen paisaiaren gainean agertzen da (berdeak hipermetilazioak, eta gorriak hipometilazioak). Kaxa gorriek, transkripto ezberdinen gune sustatzaileak zehazten dituzte. CpG feature lerroak CGI eremuak adierazten ditu berdez, jarraian shore guneak urdin turkesaz eta Shelf guneak urdin ilunez, bere bi alboetan.

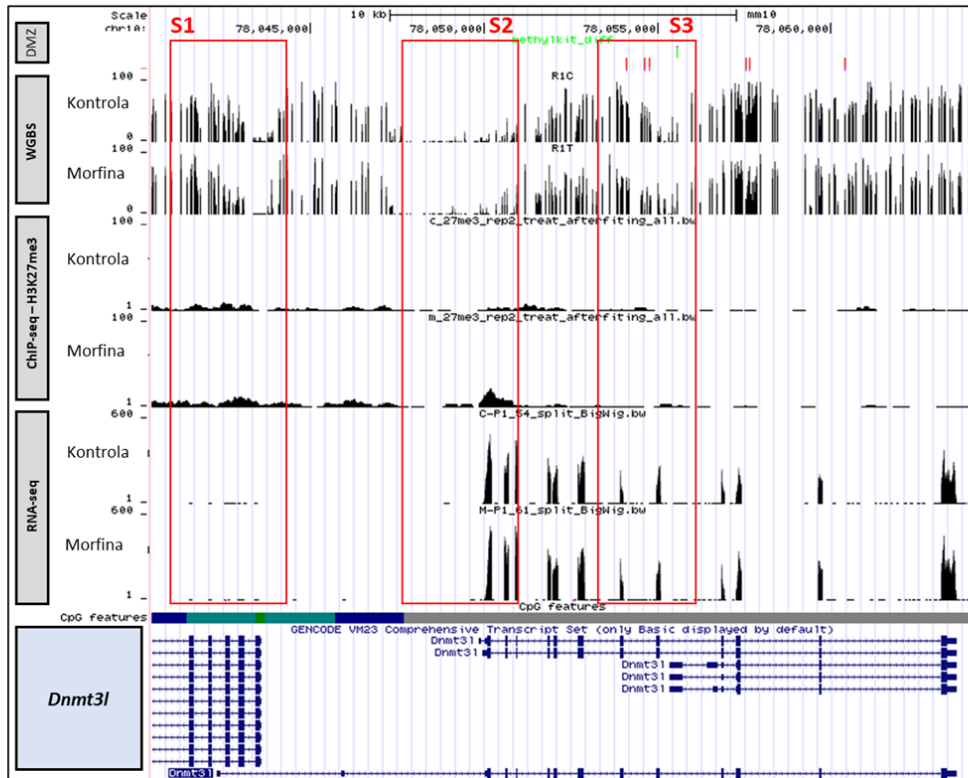
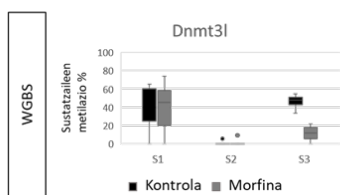
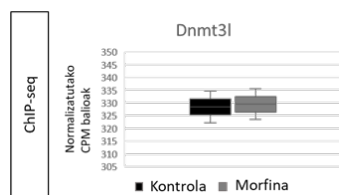
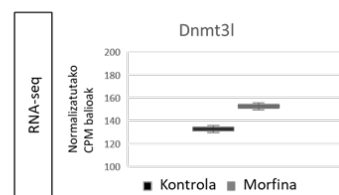
Amaitzeko, aztertutako geneek izandako adierazpen aldaketak DNaren metilazioarekin erlazionatu ezean, geneen adierazpena isilarazten duen marka epigenetiko batek morfinaren ondorioz jasan zituen aldaketak aztertu genituen ChIPseq bidez; H3K27me3 eraldaketarenak zehazki (4.14 irudia). *Dnmt1* genearen paisaian ikusten den moduan, genearen gune sustatzailean H3K27me3 eraldaketaren tontor bat behatu genuen morfinaren presentzian, oso igoera handia ez izan arren. Aitzitik, eraldaketa hori izan daiteke morfinaren presentzian gene horrek izandako adierazpen aldaketaren eragile nagusia. Bestalde, *Dnmt3a* genearen kasuan ez genuen inongo aldaketarik sumatu, eta *Dnmt3b* genean, ordea, H3K27me3 eraldaketaren tontor handiago bat behatu genuen, nahiz eta ez eduki inongo eraginik haren adierazpen mailan. Datu horiek balioztatuak izan ziren (4.15.D. irudia).

Horrenbestez, DNMT entzima familia horretako kide katalitikoak aztertzerakoan *Dnmt1* genea morfinarekiko sentikorra zela ikusi bagenuen ere, ez genuen autoerregulazio mekanismorik topatu. Morfinaren tratamendu kronikoak haren adierazpena murriztu zuen, H3K27me3 eraldaketak gune sustatzailean zuen estatus epigenetikoak modulatu, eta hori bat dator MS/MS bidez behatu genuen metilazio maila globalen jaitsierarekin.



4.15. irudia. DNAREN metilazioaz arduratzen diren *Dnmt* gene familiako kide katalitiko nagusien inguruan lortutako datuen balioztatzeak. **(A)** WGBS datuen balioztatzea metilazioen ehunekoen *boxplot*-en bidez. **(B)** ChIPseq (H3K27me3) eta **(D)** RNAseq datuen balioztatzea CPM balio normalizatuen *boxplot*-en bidez.

WGBS teknika bidez eskuraturiko datuak, eta RNAseq-eko datuak integratzean, familia proteiko horretako beste kidea bat ere identifikatu genuen, *Dnmt3l* genea hain zuzen ere. Sarreran aipatu dugun moduan, DNMT3L proteina DNMT3A eta DNMT3B entzimen *de novo* metilazio funtzioa bideratzen duen proteina laguntzailea da. Katalitikoki aktiboa ez den arren (ez du metiltransferasa aktibitate), funtsezkoa da bere familiako beste bi kide horien aktibitate katalitikoak emendatzeko eta bideratzeko (Hata et al., 2002).

A**B****D****E**

4.16. irudia. DNaren *de novo* metilazioa bideratzen duen *Dnmt3l* gene gakoaren erregulazio epigenetikoa.

Morfina mESCtan eragindako erregulazio epigenetikoa (A) *Dnmt3l* genean. UCSC genome browser plataforma bidez irudikatuak. Goitik behera: WGBS, ChIPseq (H3K27me3) eta RNAseq. DMZ, WGBS datuen paisaiaren gainean agertzen da (berdeak hipermetilazioak, eta gorriak hipometilazioak). Kaxa gorriek, transkripto ezberdinen gene sustatzaileak zehazten dituzte. CpG feature lerroak CGI eremuak adierazten ditu berdez, jarraian *shore* guneak urdin turkesaz eta *Shelf* guneak urdin ilunez, bere bi alboetan. (B) WGBS datuen balioztatzea metilazioen ehunekoen *boxplot*-en bidez. (D) ChIPseq (H3K27me3) eta (E) RNAseq datuen balioztatzea CPM balio normalizatuen *boxplot*-en bidez.

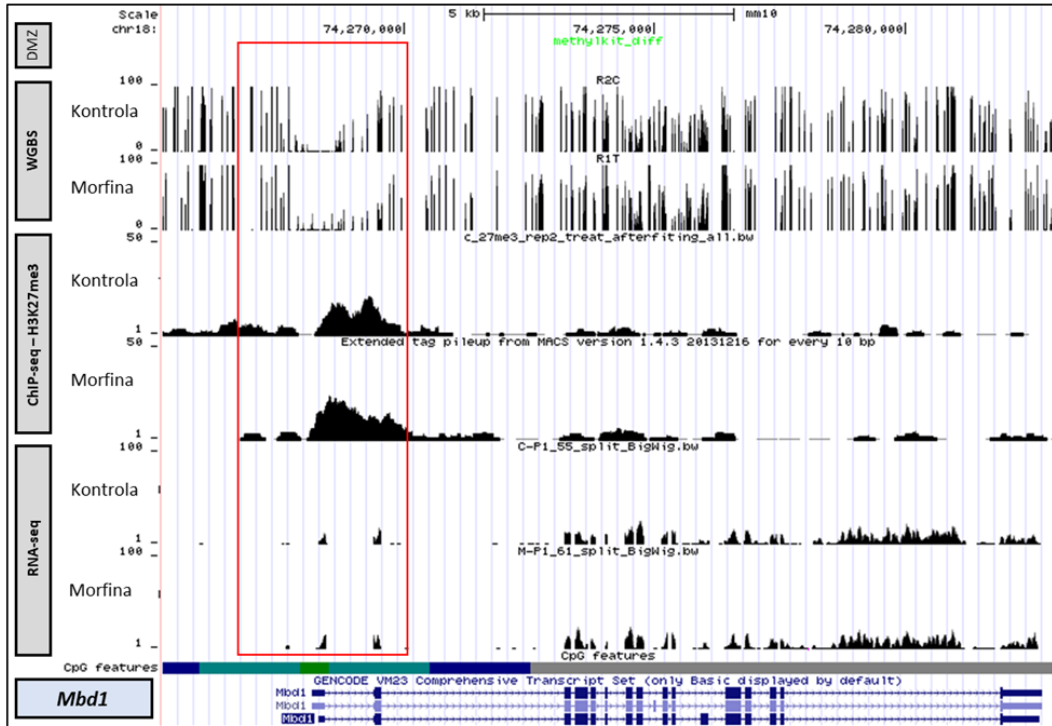
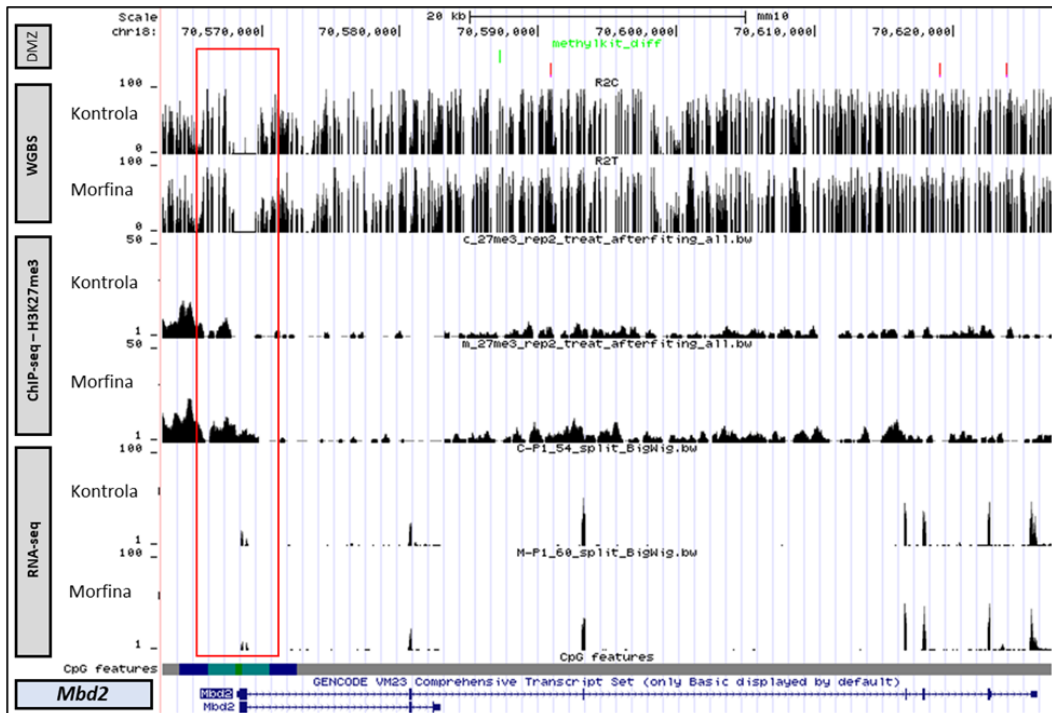
Dnmt3l geneak 6 transkripto ditu guztira (4.16.A irudia), eta bakoitzak duen gene sustatzailea ezberdina da (S1, S2, S3). DNaren metilazioari dagokionez, 3 gene sustatzaileetatik bakarrak izan zituen morfina eragindako aldaketa adierazgarriak, S3 guneak zehazki; bertan hipometilazioak aurkitu genituen batez ere, DMZ ataleko markek adierazten duten moduan. RNAseq datuak aztertzerako garaian, transkripto luzeenaren kasuan ez genuen inongo adierazpenik behatu mESCtan (S1ari dagokion transkripto).

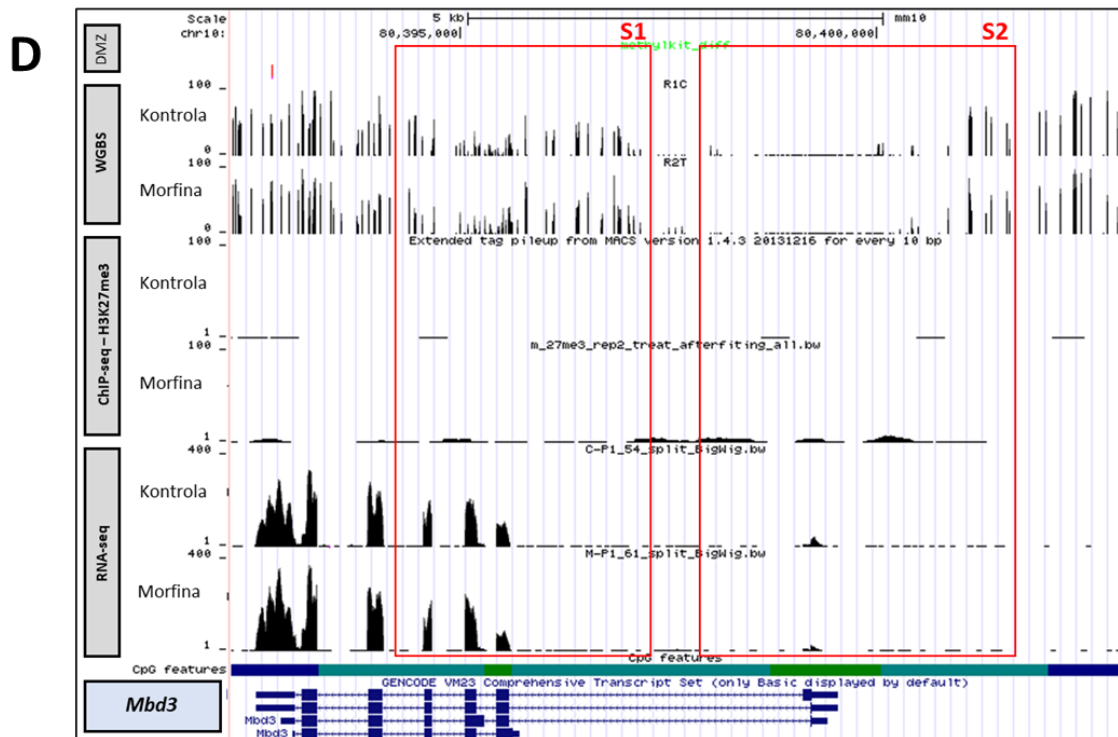
Tarteko transkripto kasuan, ordea, adierazpena erakutsi zuten baina inongo aldaketa adierazgarririk gabe (S2ari dagokion transkriptoak). Azkenik, transkripto laburren kasuan, RNAseq datuek morfinaren tratamendu kronikoak horien adierazpena handitzea ekarri zuela adierazi zuten, eta igoera hori erabat nabarmena izan zen azkeneko exoietan (S3ari dagokien transkriptoak), erabat bat datorrena S3 gunean emandako metilazio aldaketekin. H3K27me3 eraldaketaren ChIPseq datuek, ostera, identifikatu zuten aldaketa bakarra, S2 gunean morfinaren presentzian topaturiko eraldaketaren tontor bat izan zen, baina ez zen adierazgarria. Horrenbestez, transkripto ertainen adierazpena modulatzeko duen eraldaketa epigenetikoa histonako H3K27me3 eraldaketa dela esan dezakegu, eta transkripto laburrenena, ordea, DNAREN metilazioa. Morfinak eragindako aldaketa guzti horiek jarraian baliozkotuak izan ziren 4.16.B, D eta E irudietan beha dezakegun moduan.

Beraz, Dnmt3l genea, bere familia kide katalitikoaren modura, morfinarekiko sentikorra da, eta hori bere gune sustatzaile ezberdinetako patroia epigenetikoa, euren adierazpenarekin batera aldatzen delako dakigu. Eskuetan genituen datuek erakutsi zigitenez, bere adierazpena erregulatzeko dituen mekanismo epigenetikoak ezberdinak dira, transkripto gune sustatzailearen arabera. RNAseq datuetan gene horren adierazpen igoera bat hauteman genuenez, morfinarekiko erantzun transkripzionalean garrantzi gehien duten transkriptoak, transkripto laburrak dira, eta horrenbestez, erantzun hori bultzatzen duen mekanismo epigenetiko nagusia DNAREN metilazioa da.

4.3.2. Metilazioaren mantentzea gauzatzen duten MBD proteinak:

Zitosina metilatuen mantentzean funtzio gakoa betetzen duten MBD entzimak aztertzerako garaian aukeratu genituen hautagai nagusiak *Mbd1*, *Mbd2* eta *Mbd3* geneak izan ziren. Gene horiei dagokionez aztertutako informazioaren paisaiak biltzen dituzten irudikapenak 4.17.A, B, D. irudian azter ditzakegu.

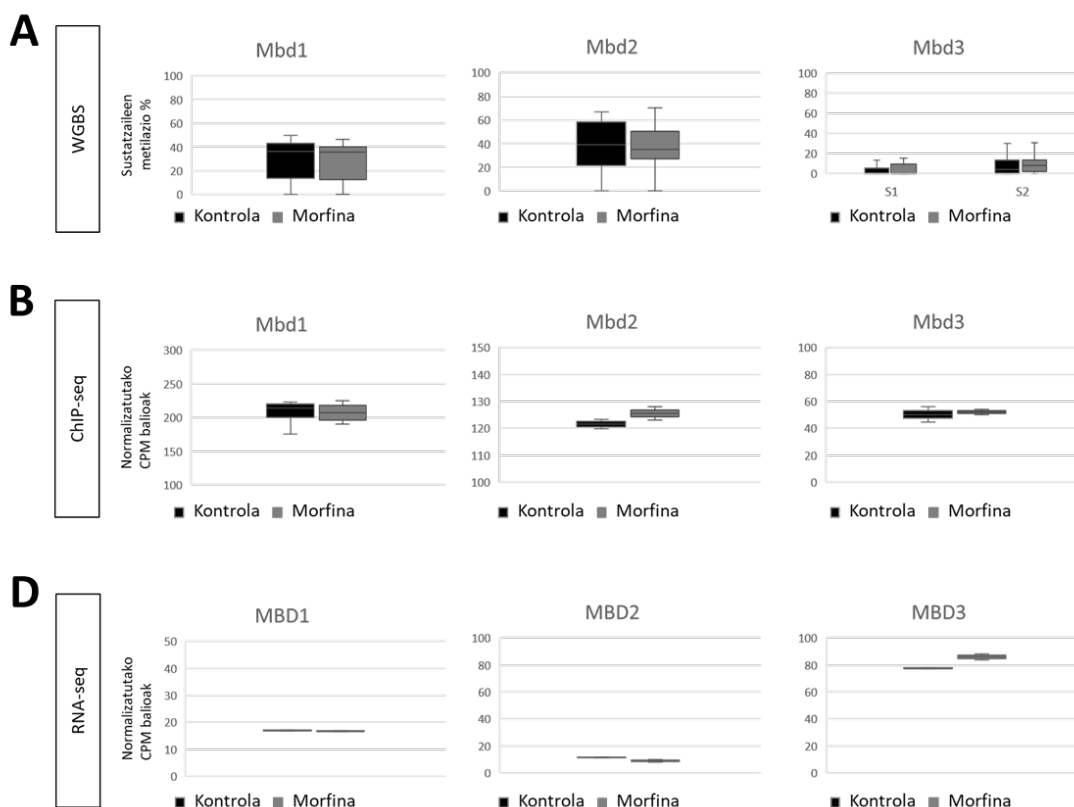
A**B***(Irudiak hurrengo orrialdean jarraitzen du)*



4.17. irudia. DNA metilatuaren mantentzeaz arduratzen diren *Mbd* gene familiako kide katalitiko nagusien erregulazio epigenetikoa. Morfinak mESCtan eragindako erregulazio epigenetikoa (A) *Mbd1*, (B) *Mbd2* eta (D) *Mbd3* geneetan. UCSC genome browser plataforma bidez irudikatuak. Goitik behera: WGBS, CHIPseq (H3K27me3) eta RNAseq. DMZ, WGBS datuen paisaiaren gainean agertzen da (berdeak hipermetilazioak, eta gorriak hipometilazioak). Kaxa gorriek, transkripto ezberdinen gune sustatzaileak zehazten dituzte. CpG feature lerroak CGI eremuak adierazten ditu berdez, jarraian shore guneak urdin turkesaz eta Shelf guneak urdin ilunez, bere bi alboetan.

DNAREN metilazioa aztertzerako garaian, *Mbd1* genearen kasuan, ez zen inongo DMZrik topatu haren transkripto guztien gorputz osoan zehar. *Mbd2* genean berriz, aldaketa adierazgarrienak, gorputzean sakabanaturik topatu ziren kasu bakan batzuk izan ziren, hipometilazioak nagusiki. Azkenik, *Mbd3* genea aztertzerakoan, morfinak eragindako DMZ hipometilatu bakarria ere, gorputzean topatu genuen. Bestalde, ez genuen morfinak sortutako aldaketa adierazgarririk sumatu gene familia horretako kideen sustatzaileetan, horien balioztapenek adierazten duten bezala (4.18.A irudia).

Ondoren, RNAseq datuak aztertzerako iragan ginen. *Mbd1* eta *Mbd2* geneei dagokionez, ez genuen inongo aldaketarik topatu. *Mbd3* genearen kasuan, aldiz, adierazpenaren igoera adierazgarri bat identifikatu genuen. Edozein kasutan, aurreko atalean jada aipatu dudan moduan, ez genuen azken gene horren adierazpen aldaketa eragin dezakeen metilazio-mailaren aldaketarik aurkitu haren gune sustatzailean. Gene horien adierazpenak CPM balioak normalizatuz berretsi genituen (4.18.B irudia).



4.18. irudia. DNAREN metilazioaz arduratzen diren *Mbd* gene familiako kide katalitiko nagusien inguruan lortutako datuen balioztatzeak. (A) WGBS datuen balioztatzea metilazioen ehunekoen *boxplot*-en bidez. (B) ChIPseq (H3K27me3) eta (D) RNAseq datuen balioztatzea CPM balio normalizatuen *boxplot*-en bidez.

Azkenik, geneen adierazpen aldaketa horiei azalpen bat aurkitzeko saiakeran, H3K27me3 eraldaketari dagokionez morfina eragindako aldaketak aztertzeraz igaro ginen. *Mbd1*, *Mbd2* eta *Mbd3* geneen kasuan ez genuen aldaketa esanguratsurik topatu. Hori bat dator lehenengo bi kasuetan aurreko emaitzekin, baina ez *Mbd3*ren kasuan. Hortaz, H3K27me3 eraldaketari dagokionez ez genuen inongo korrelaziorik aurkitu morfina sortutako adierazpen aldaketekin. Datu horiek, jarraian ikusi dezakegun moduan, balioztatuak izan ziren (4.18.D. irudia).

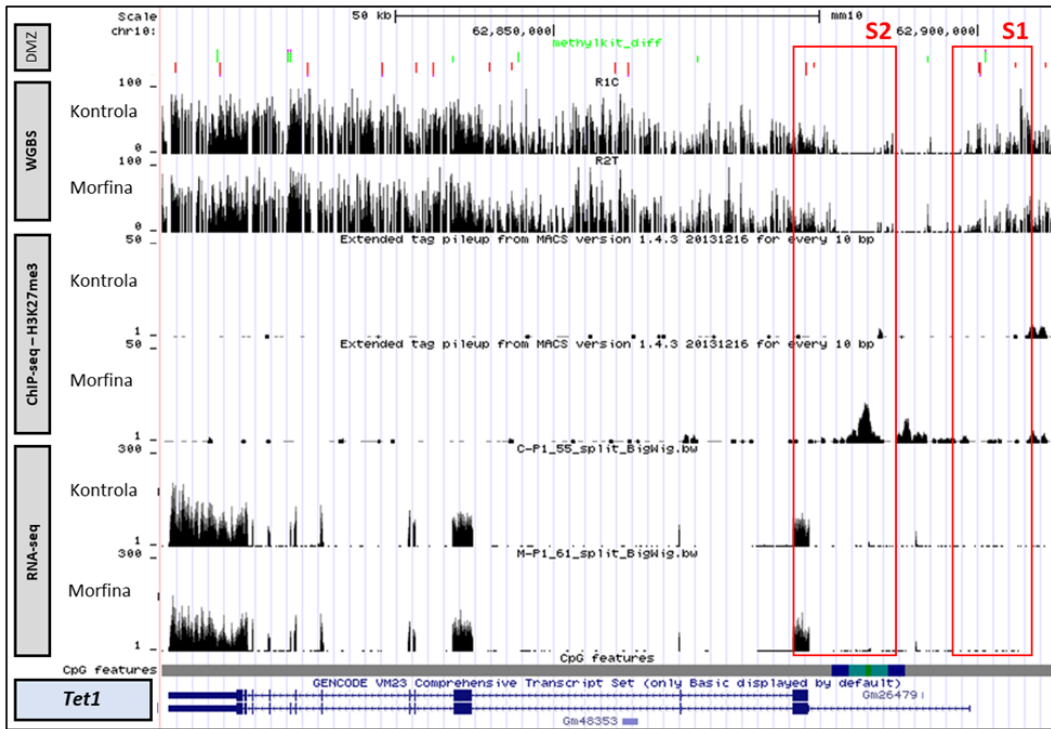
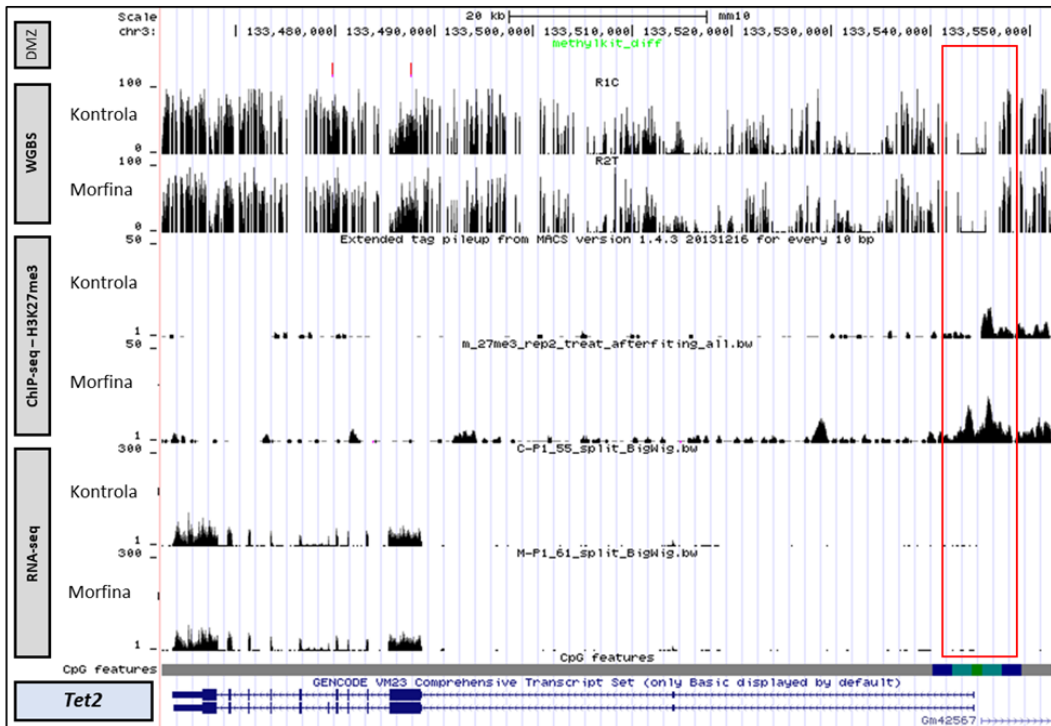
Hiru gene horien artean morfina eragindako sentikortasuna agertu zuen gene bakarra *Mbd3* genea izan zen, edonola ere, gure datuen arabera DNAREN metilazioak eta H3K27me3 eraldaketak ez dute aldaketa horrekin inongo zerikusirik, hiru kasuetan eraldaketa epigenetiko horiek izandako aldaketak minimoak izan zirelako.

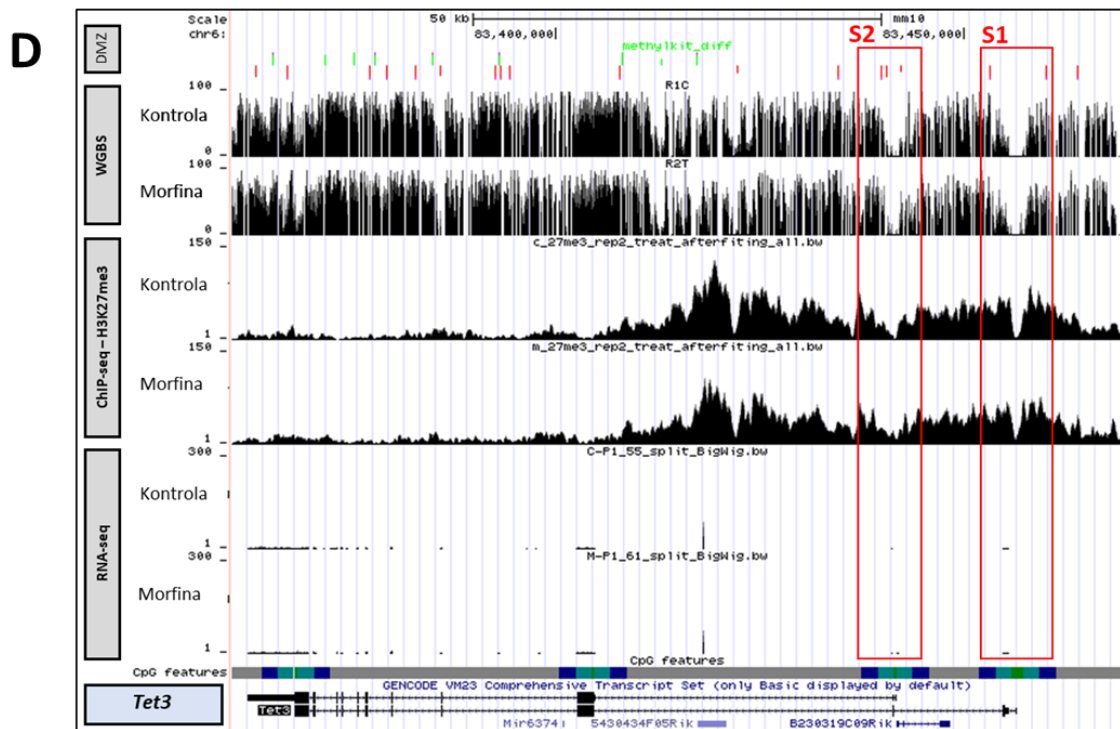
4.3.3. DNAREN demetilasa diren TET proteinak:

Proteina familia horretan aztertu nahi izan genituen entzimak TET1, TET2 eta TET3 entzima katalitikoak izan ziren, zitosina metilatuen demetilazio prozesu aktiboa gauzatzen duten entzimak. Gene horiei dagokionez aztertutako informazioaren pasaiak biltzen dituzten irudikapenak 4.19.A, B, D. irudian azter ditzakegu.

DNAREN metilazioari dagokionez, familia horretako geneak oso sentikorrek dira morfinarekiko, hori dela eta, aldaketa ugari pairatu zituzten tratamenduaren ondorioz. Aldaketa handienak, *Tet1* eta *Tet3* geneetan eman ziren. *Tet1* genearen kasuan, morfinak hipometilazio eta hipermetilazio ugari sortarazi zituen gorputz osoan zehar, baita gene sustatzailean ere. *Tet1* geneak bi transkripto ditu, eta bakoitzak bere gene sustatzailea du (S1 eta S2). Morfinak bi gene sustatzaile horietan hipometilazio gakoak induzitu zituen. *Tet2* genea aztertzerako garaian, aldiz, ia ez zen inongo metilazio aldaketarik sortu morfinaren tratamendu ostean, eta sortutako guztiak gorputzean zehar identifikatu genituen. Azkenik, *Tet3* genea guztiz metilatua aurkitu genuen, haren bi familia kideen metilazio mailekin konparatzen badugu, askoz metilazio maila altuagoa hauteman genuen, bai kontrolean eta bai morfinan. DMZei dagokionez, aldaketa asko identifikatu ziren batez ere gene sustatzaileetan, non hipometilazio gakoak topatu ziren eta bi kaxa gorrien barnean irudikatu diren. Gene sustatzaile horietako metilazio estatusen emandako aldaketak, bertako metilazio datuak normalizatuz baliozkotu genituen (4.20.A irudia).

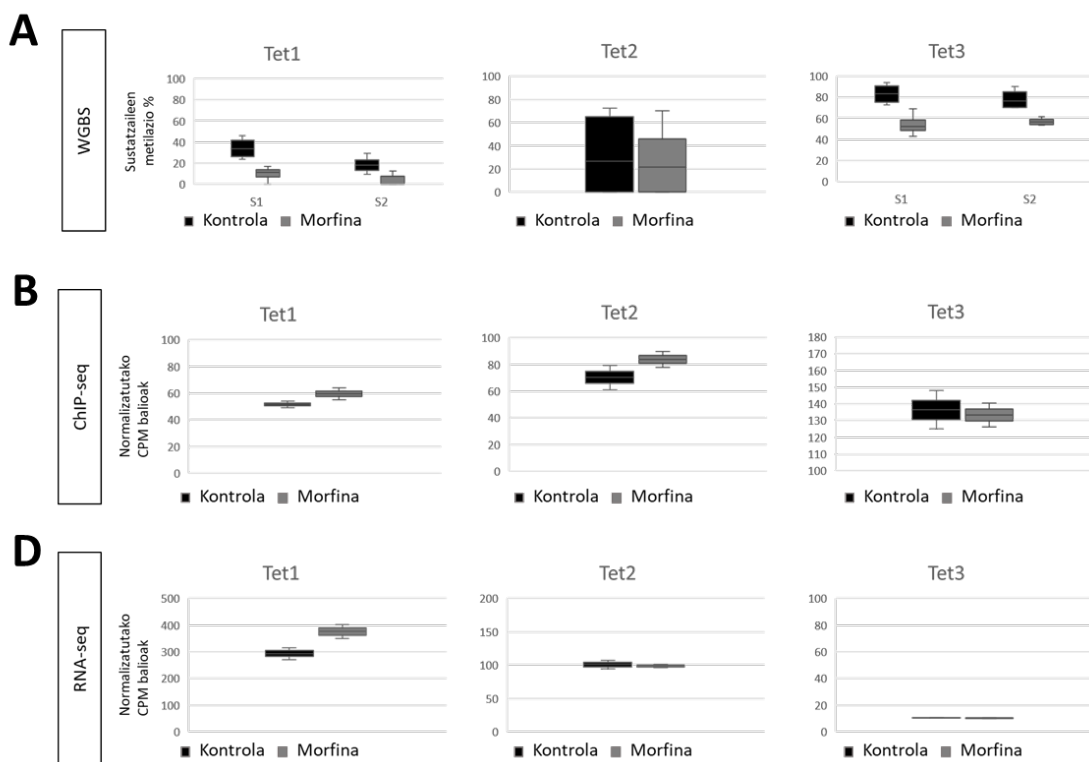
Aurreko geneekin bezala, jarraian demetilasa horien adierazpen mailak neurtzera iragan ginen, eta horretarako RNAseq-eko datuak aztertu genituen. *Tet1* genearen kasuan, gene horrek dituen luzera ezberdineko bi transkriptoak funtzionalak ziren, eta horien adierazpen handiago bat behatu ahal izan genuen morfinaren presentzian. Eraitza horrek, korrelazio zuzena erakusten du WGBS datuetan identifikatutako gene sustatzaileetako DMZ hipometilatuekin. *Tet2* genearen kasuan, aldiz, ez genuen aldaketa bereizgarri behatu kontrola eta morfinaren artean. Amaitzeko, *Tet3* genea ez zen ia adierazi bi lagin ezberdinetan. Adierazpen hori hain zen txikia, bertan aldaketak hautemateak ez duelarik inongo balio esanguratsurik, eta hori bat dator aurretik behaturiko metilazio-estatusarekin. *Tet1* genearen adierazpen jaitziera (beste bi geneen adierazpen neurketekin batera) CPM balioak normalizatuz balioztatu genuen (4.20.B irudia).

A**B***(Irudiak hurrengo orrialdean jarraitzen du)*



4.19. irudia. DNAREN demetilazioaz arduratzen diren *Tet* gene familiako kide katalitiko nagusien erregulazio epigenetikoa. Morfinak mESCtan eragindako erregulazio epigenetikoa (A) *Tet1*, (B) *Tet2* eta (D) *Tet3* geneetan. UCSC genome browser plataforma bidez irudikatuak. Goitik behera: WGBS, CHIPseq (H3K27me3) eta RNAseq. DMZ, WGBS datuen paisaiaren gainean agertzen da (berdeak hipermetilazioak, eta gorriak hipometilazioak). Kaxa gorriek, transkripto ezberdinen gene sustatzaileak zehazten dituzte. CpG feature lerroak CGI eremuak adierazten ditu berdez, jarraian shore guneak urdin turkesaz eta Shelf guneak urdin ilunez, bere bi alboetan.

Azkenik, H3K27me3 eraldaketak TET entzimen geneetan izan zuen eragina aztertu nahi izan genuen. Behatutakoaren arabera, *Tet3* genearen kasuan salbu, ez genuen erlaziorik topatu eraldaketa horrek zuen presentziaren eta geneen adierazpenaren artean. *Tet1* genearen transkripto motzenaren eta *Tet2* genearen gene sustatzailean morfinak eragindako eraldaketa horren agerpen handiago bat behatu genuen. *Tet3* genean, aldiz, histona errepresio-gileak genearen zabalera osoan zuen presentzia bereziki altua izan zen, bai kontrolean eta bai morfinan. Hori, harrigarriki, DNAREN metilazioarekin ikusi genuen gauza bera izan zen. Beraz, mESCtan topatu genuen H3K27me3 presentzia altua, gene horrek mESC zeluletan zuen berezko adierazpen baxuarekin erlazionatua egon daiteke. Datu guzti horiek CHIPseq bidez eskuraturiko CPM balioak normalizatuz balioztatu genituen (4.20.D. irudia).



4.20. irudia. DNAREN metilazioaz arduratzen diren *Tet* gene familiako kide katalitiko nagusien inguruan lortutako datuen balioztatzeak. (A) WGBS datuen balioztatzea metilazioen ehunekoen *boxplot*-en bidez. (B) ChIPseq (H3K27me3) eta (D) RNAseq datuen balioztatzea CPM balio normalizatuen *boxplot*-en bidez.

Horrenbestez, TET1 entzima katalitikoaren adierazpena emendatu egin zenez morfina-erregulazioaren sentikorra dela frogatu ahal izan genuen. Gainera, aipatzekoa da Tet1 geneak erakutsi zuen autoerregulazio mekanismoa, bere gune sustatzaileko metilazio patroia modulatuaz adierazpen igoera bideratzen duelako. Emaitza horiek MS/MS bidez ikusi genuen genomako metilazio maila globalen jaitzierarekin, eta hidroximetilazioen igoerarekin guztiz bat datoz.

Aurreko atal horietan behatu dugunez, mESCtan morfina-erregulazioaren tratamendu kroniko baten ondorioz sentikorrak diren kasuak, entzima katalitikoetara dagokionez, DNMT1 metilasa eta TET1 demetilasa dira. Gainera, horiek jasan zuten adierazpenaren erregulazioa erabat bat dator genomako metilazio maila-globalen jaitzierarekin, baita hidroximetilazioen igoerarekin ere. *Tet1* genearen adierazpen erregulazio modulatuaren duen mekanismo epigenetiko nagusia, *Dnmt1* genearen kasuan gertatzen ez den moduan, DNAREN metilazioa da; haren sustatzailean metilazio estatusaren modulazioaren bidez zehazki. *Dnmt1* genearen kasuan, ohera, horren adierazpena jaitzieratzen duen mekanismo epigenetikoa H3K27me3 eraldaketa izan daitekeela deritzogu. Beraz, entzima horrek

morfinaren presentzian bere transkripzioa arautzeko autoerregulazio mekanismo epigenetiko bat duela esan dezakegu, eta morfinaren tratamenduan mESCtan eragindako zitosina hidroximetilatuen igoera ikusita, opioide horren aurrean burutzen den erantzun zelularra bideratzen duen entzima gakoa dela deritzogu.

4.4. Morfinak DNAREN metilazioaren bidez eragindako pluripotentiaren emendioa mESCtan

mESCtan buruturiko morfinaren tratamendu kronikoak zelula horien pluripotenzia maila handitu egiten dela pentsaraztea eraman zigun. Izan ere, genoma osoan emandako metilazio mailen jaitiera globala izan zen horren inguruan ikusi genuen lehenengo zantzia. Burutu genituen integrazio prozesu horietan morfinaren bidez adierazpena aldatuak zituzten geneak, eta aldi berean DNAREN metilazioari dagokionez, eta H3K27me3 eraldaketari dagokionez, aldaketa adierazgarriren bat izan zuten gene guztiak identifikatu genituen. Behin gene horien zerrendak gure eskura genituela, lista horretan barrentzeko helburuarekin ontologia azterketak burutu genituen, eta hor pluripotentiarekin erlazionatuak dauden funtzio zelular garrantzitsu bana identifikatu genituen: zelula amena mantenua (GO:0019827)(4.11.B. irudia) eta garapen prozesuaren erregulazioa (GO:0050793)(4.13.B. irudia).

Bi funtzio horietan parte hartzen duten geneak 4.3. taulan jaso genituen. Gene horien artean mESC zelulen pluripotenzia maila mantentzeko funtzio gakoa betetzen duten gene edota transkripzio faktore ugari daude. Hori dela eta, jarraian gene zerrenda horretako hautagai gakoak aztertzeraz iragan ginen.

4.3. taula. mESC zeluletan morfinaren tratamendu kronikoaren ondoren WGBS, RNAseq eta ChIPseq (H3K27me3) analisiekin burututako integrazio prozesua. Ontologia analisisetan identifikaturiko, eta pluripotentiarekin erlazionaturiko bi funtzio biologiko jakinetan parte hartzen duten geneen zerrendak.

Funtzio Biologikoa	Genea	Genearen izen osoa
stem cell population maintenance (GO:0019827)	Tcf3	Transcription Factor 3
	Braf	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
	Pcm1	Pericentriolar Material 1
	Aspm	Assembly Factor For Spindle Microtubules
	Tet1	Tet Methylcytosine Dioxygenase 1
	Pou5f1	POU Class 5 Homeobox 1
	Rest	RE1 Silencing Transcription Factor
	Crebbp	CREB Binding Protein
	Nipbl	NIPBL Cohesin Loading Factor
	Ddx6	DEAD-Box Helicase 6
	Bmpr1a	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A
	Dicer1	Dicer 1, Ribonuclease III
Igf2bp1	Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1	
Regulation of developmental process (GO:0050793)	Bmp4	Bone Morphogenetic Protein 4
	Hspb1	Heat Shock Protein Family B (Small) Member 1
	Kif1a	Kinesin Family Member 1A
	Klf2	Kruppel Like Factor 2
	Myc	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
	Nefm	Neurofilament Medium Chain
	Pou5f1	POU Class 5 Homeobox 1
	Sptbn4	Spectrin Beta, Non-Erythrocytic 4
	Slc9a3r1	SLC9A3 Regulator 1
	Tnfrsf1b	TNF Receptor Superfamily Member 1B
	Akap11	A-Kinase Anchoring Protein 11
	Atad5	ATPase Family AAA Domain Containing 5
	EfnA5	Ephrin A5
	Man2a1	Mannosidase Alpha Class 2A Member 1
	Pcm1	Pericentriolar Material 1
Suz12	SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit	
Tead1	TEA Domain Transcription Factor 1	

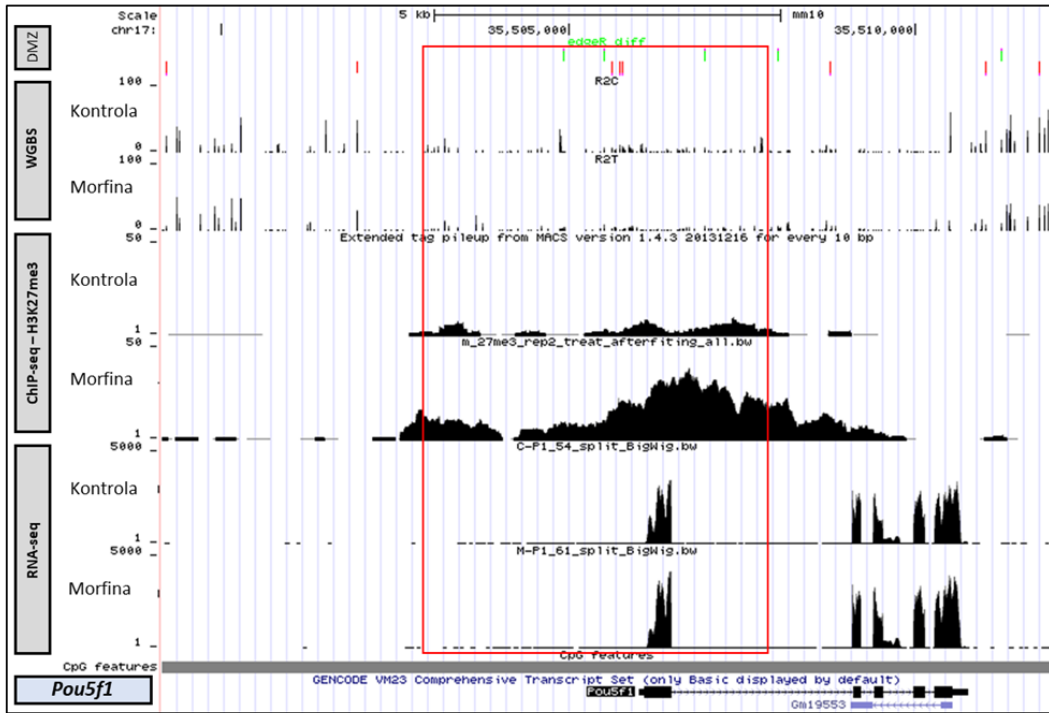
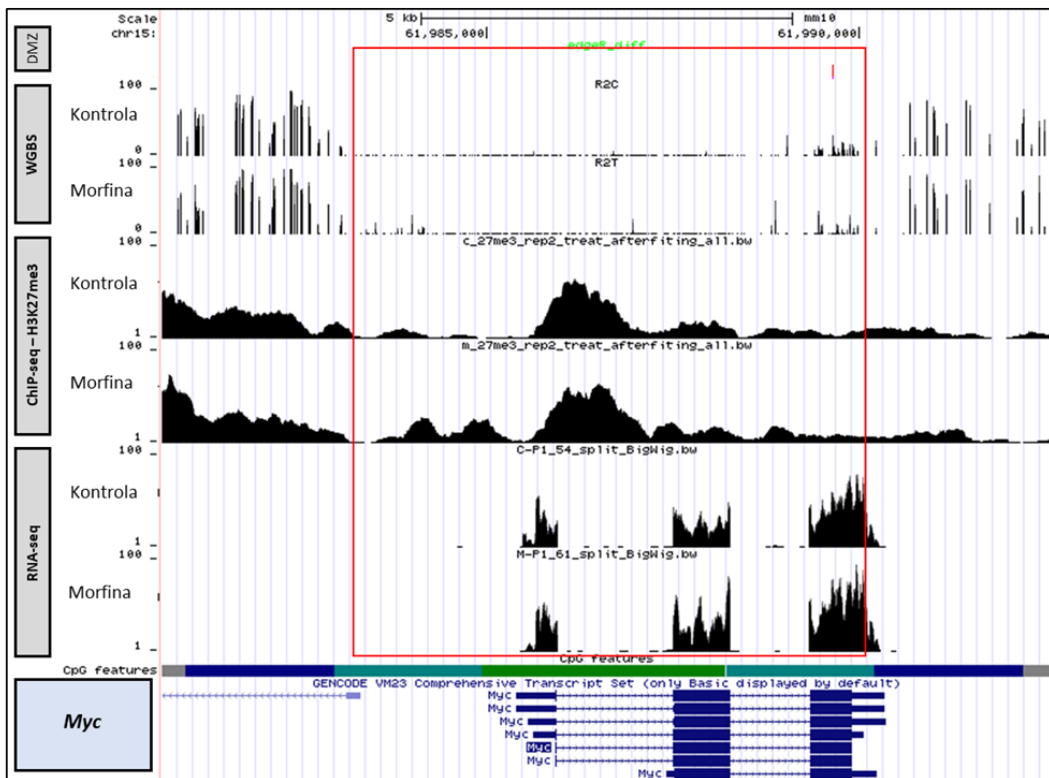
4.4.1. *Yamanaka* transkripzio faktoreak

Integrazio prozesuan *Yamanaka* transkripzio-faktore moduan ezagutzen ditugun *POU Class 5 Homeobox 1 (Pou5f1)*, *Oct4* bezala ere ezaguna; *MYC Proto-Oncogene BHLH Transcription Factor (Myc)* eta *Kruppel-Like Factor 2 (Klf2)* geneak topatu genituen. *Yamanaka* faktoreak, 2006. urtean *Takahashi* eta *Yamanaka*-k, sagu enbrioi-tako fibroblasto helduetatik iPSC-ak (ingelesezko *induced pluripotent stem cells*) eratzeko gakoak diren transkripzio faktoreak identifikatzeko saiakera batean aurkitu zituzten geneak dira: *Pou5f1* edo *Oct3/4*, *SRY-Box Transcription Factor 2 (Sox2)*, *Kruppel Like Factor 4 (Klf4)*, eta *c-Myc* edo *Myc*. Gene horiek oso adieraziak daude ama zelula enbrionikoetan (ESC), eta horien gainadierazpenak zelula horien pluripotentzia bultzatu dezakete, bai saguan eta bai gizakian (*Takahashi & Yamanaka, 2006*). Aipatu beharra dago, integrazio analisisian identifikatutako *Klf2* genea, errealitatean ez dela *Yamanaka* faktore bat, baina *Klf4*-en familia kide garrantzitsua da. Beraz, segidan *Yamanaka* transkripzio faktore horiek ikertzera iragan ginen.

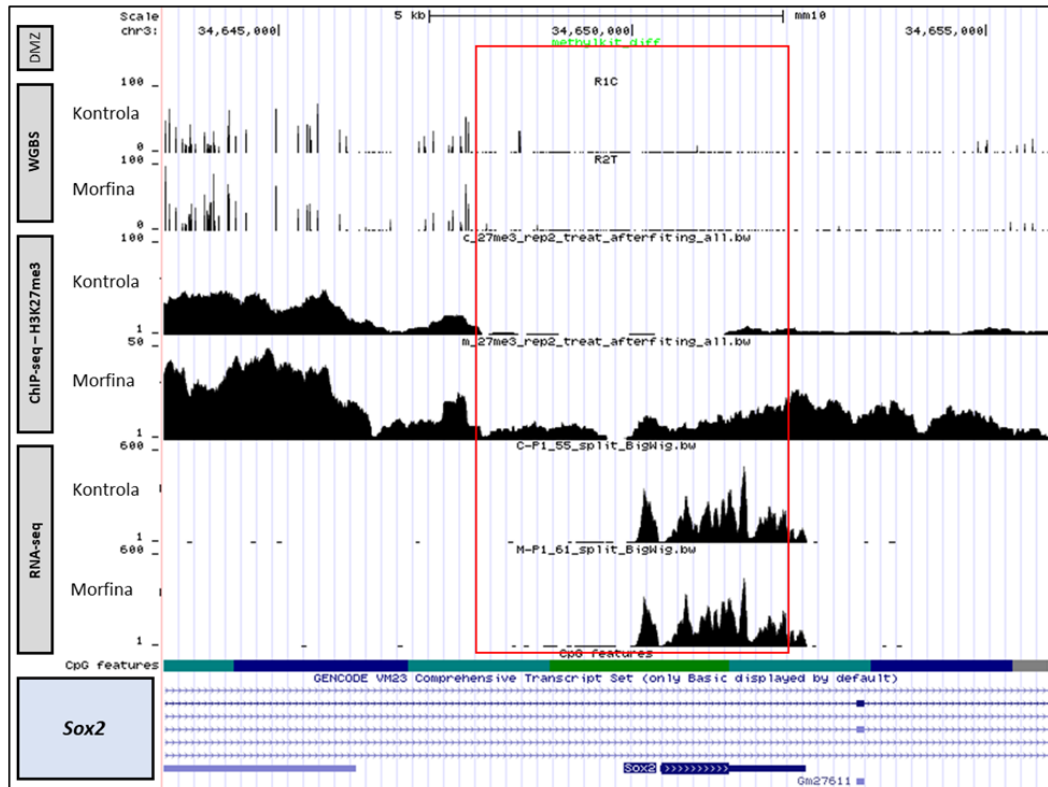
Pou5f1 (Oct4) eta *Myc* faktoreek adierazpenaren emendio adierazgarriak jasan zituzten morfinaren presentzian, eta hori 4.21.A. eta B. irudietako RNAseq paisaietan ikus dezakegu, hurrenez hurren. DNAREN metilazioa aztertzerakoan bi geneen gune sustatzaileetan morfinak eragindako DMZ hipometilatuak topatu genituen, eta ondorioz metilazio estatus baxuagoa aurkeztu zuten, eta horrek erabat kointziditzen du behaturiko adierazpen aldaketarekin. Azkenik, H3K27me3 eraldaketari dagokionez, bi geneen gune sustatzaile-inguruetan eraldaketa epigenetiko horren igoera adierazgarriak identifikatu genituen morfinaren presentzian, aurreko emaitzekin talka eginez.

Sox2 eta *Klf4* transkripzio faktorearen kasuan, ostera, ez genuen morfinak sortutako aldaketa adierazgarriak topatu adierazpen mailak aztertzekeo garaian (RNAseq datuak)(4.21.D. eta E. irudiak). Morfinak metilazio-mailetan eraginik izan zuen aztertzerakoan ere, ez genuen aldaketa adierazgarri bakar bat ere sumatu bi gene horiengan. Azkenik, H3K27me3 eraldaketaren CHIPseq datuak aztertzerako garaian, aldiz, *Sox2* eta *Klf4* geneen gune sustatzailean marka epigenetiko horren igoera adierazgarri bana topatu genuen.

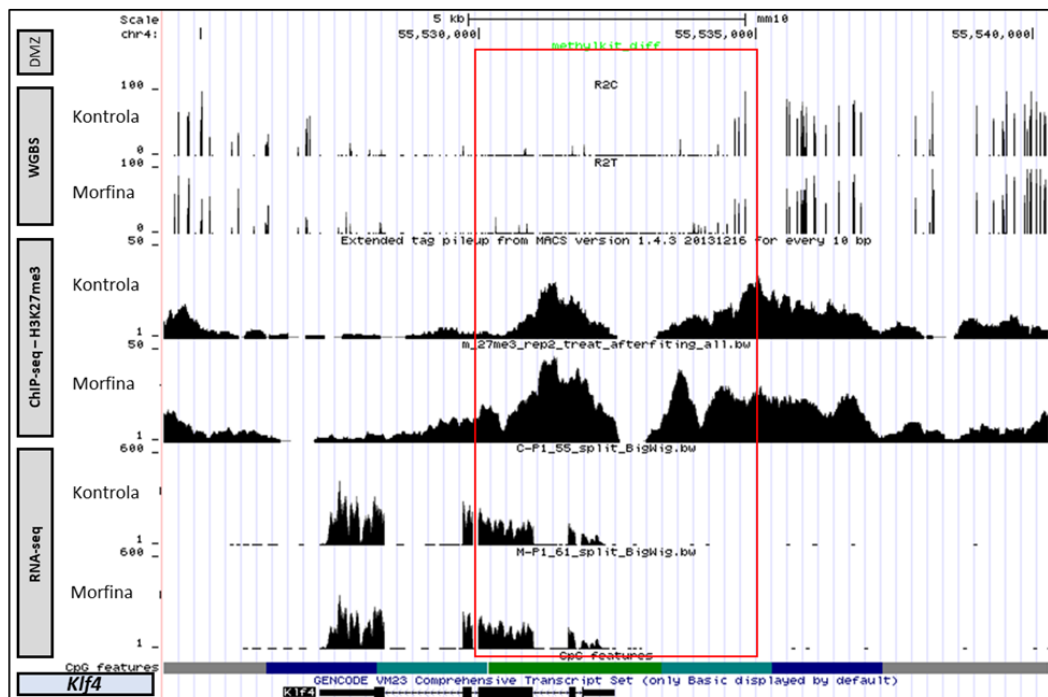
Amaitzeko, *Klf2* genea aztertzerira iragan ginen, integrazio prozesuan aurkitu genuen beste geneetariko bat. *Yamanaka* faktorea ez bada ere, *KLF4* faktorearen familiakide gertukoena da, eta euren artean konparatzen baditugu, biek amankomuna duten lotze eremuek (ingelesezko *zinc finger DNA binding domain*) %90eko antzekotasuna dutela frogatu izan da, bi faktoreek duten lotze itu-sekuentziak antzekoak izan daitezkeela iradokiz (Shields & Yang, 1997). Gene horrek morfinaren eraginez izandako adierazpena aztertzean, morfinak haren transkripzio mailak handitu zituela behatu genuen (4.21.F. irudia). Metilazioari inguruko aldaketak aztertzerakoan (WGBS datuak) DMZ ugari identifikatu genituen, eta horiek morfinaren ondorioz gune sustatzailean agertu ziren hipometilazioak izan ziren. Emaitza hori bat dator hasieran aipatutako genearen adierazpen-aldaketa joerarekin. H3K27me3 eraldaketan oinarrituriko CHIPseq datuek, beste behin, morfinaren presentzian gune sustatzaileetan eraldaketa horren presentzia igoera bat eman zela adierazi zuten, eta hori ez dator bat adierazpenaren igoerarekin. Aipatu ditugun aldaketa horiek guztiak balioztatuak izan ziren (4.22 irudia) CPM balioen (RNAseq eta CHIPseq) eta sustatzaileko metilazio balioen (WGBS) normalizazioaren bidez.

A**B***(Irudiak hurrengo orrialdean jarraitzen du)*

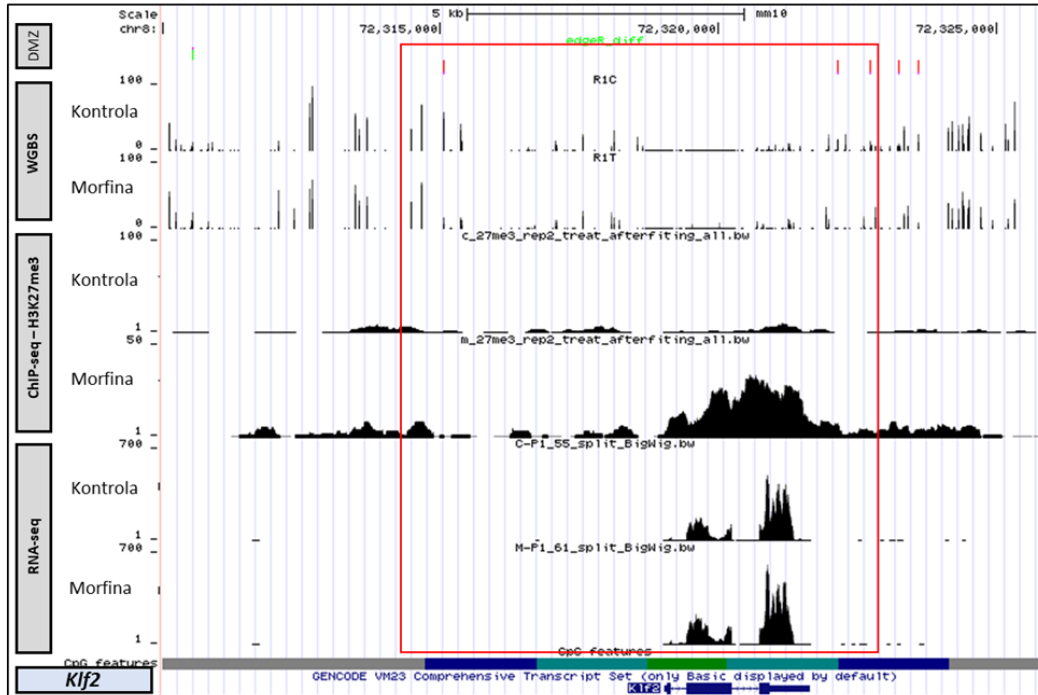
D



E

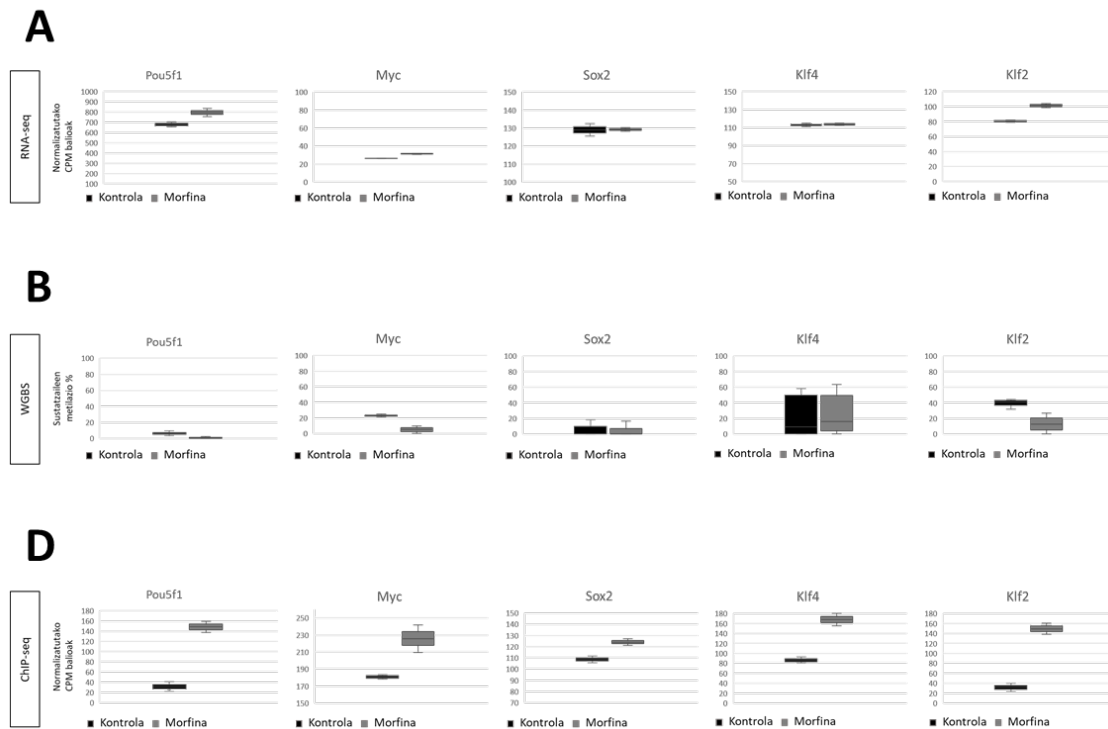


(Iruadiak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

F

4.21. irudia. Yamanaka transkripzio faktoreen erregulazio epigenetikoa. Morfinak mESCtan eragindako erregulazio epigenetikoa (A) *Pou5f1*, (B) *Myc*, (D) *Sox2*, (E) *Klf4* eta (F) *Klf2* geneetan. UCSC genome browser plataforma bidez irudikatuak. Goitik behera: WGBS, ChIPseq (H3K27me3) eta RNAseq. DMZ, WGBS datuen paisaiaren gainean agertzen da (berdeak hipermetilazioak, eta gorriak hipometilazioak). Kaxa gorriek, transkripto ezberdinen gene sustatzaileak zehazten dituzte. CpG feature lerroak CGI eremuak adierazten ditu berdez, jarraian shore gunek urdin turkesaz eta Shelf gunek urdin ilunez, bere bi alboetan.

Horrenbestez, *Pou5f1* eta *Myc* Yamanaka transkripzio faktoreak, *Klf2* faktorearekin batera, morfinarekiko sentikorrak direla frogatu ahal izan genuen, eta zehazki, pluripotentziarako funtsezkoak diren gene horien adierazpena handitu egiten da morfinaren presentzian. Adierazpenaren igoera horren eragilea DNAREN metilazioa izan zen, eta hori geneen gene sustatzailearen metilazio patroia modulatu zela gauzatu zela behatu genuen. H3K27me3 eraldaketak, ordea, ez zuen inongo eraginik izan, azterturiko transkripzio faktore guztietan aurkako joera hauteman genuelako, eta horiek erakutsi zuten adierazpen mailan ez zen horren efekturik islatu. *Sox2* eta *Klf4* geneek, aldiz, ez zuten sentikortasunik erakutsi morfinaren aurrean.



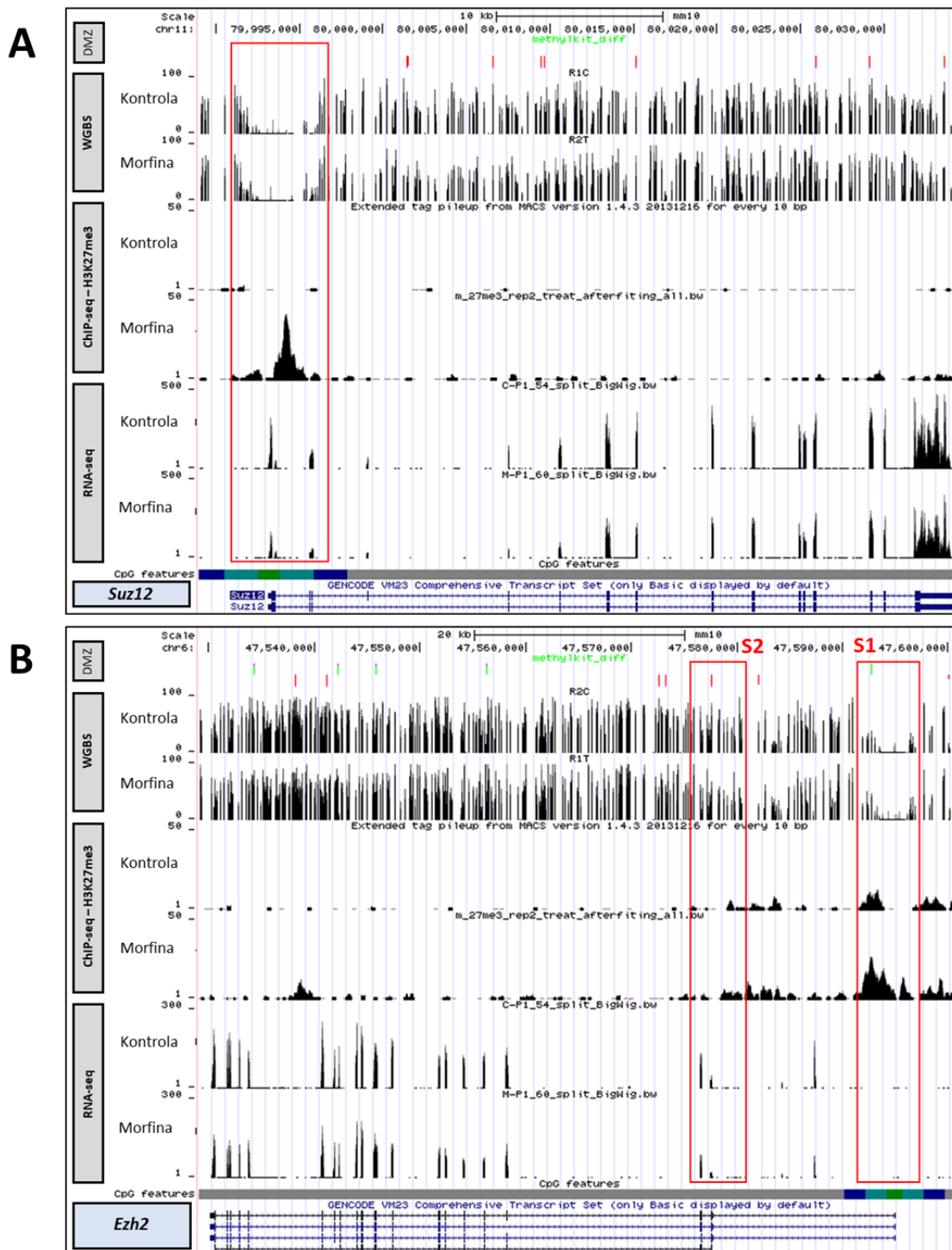
4.22. irudia. Yamanaka transkripzio faktoreen emaitzen balioztatzea. **(A)** RNAseq eta **(D)** ChIPseq (H3K27me3) datuen balioztatzea CPM balio normalizatuen *boxplot*-en bidez. **(B)** WGBS datuen balioztatzea metilazioen ehunekoen *boxplot*-en bidez.

4.4.2. PRC2 konplexua

Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) konplexu epigenetikoa *Polycomb* konplexuetariko bat da, eta horrek funtsezkoa funtzioa betetzen du mESC zelulen pluripotentiaren mantenuan; genee adierazpen koordinatua bultzatzen du H3 histonako 27. lisinaren trimetilazioaren bidez (Loh et al., 2021). Integrazio prozesuan identifikatu genuen gene garrantzitsuenetariko bat *SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit* (SUZ12) izan zen, H3K27me3 eraldaketa hori katalizatzen duen PRC2 konplexuaren entzima gakoa. Hori dela eta, konplexu horretako geneetan morfina presentziarekin zer gertatzen den aztertzea iragan ginen. *Suz12* entzimaz gain, aztertu genituen gainerako kideak honako hauek izan ziren: *Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit* (*Ezh2*), *Embryonic Ectoderm Development* (*Eed*), *RB Binding Protein 4, Chromatin Remodeling Factor* (*Rbbp4*), eta *RB Binding Protein 7, Chromatin Remodeling Factor* (*Rbbp7*) geneak.

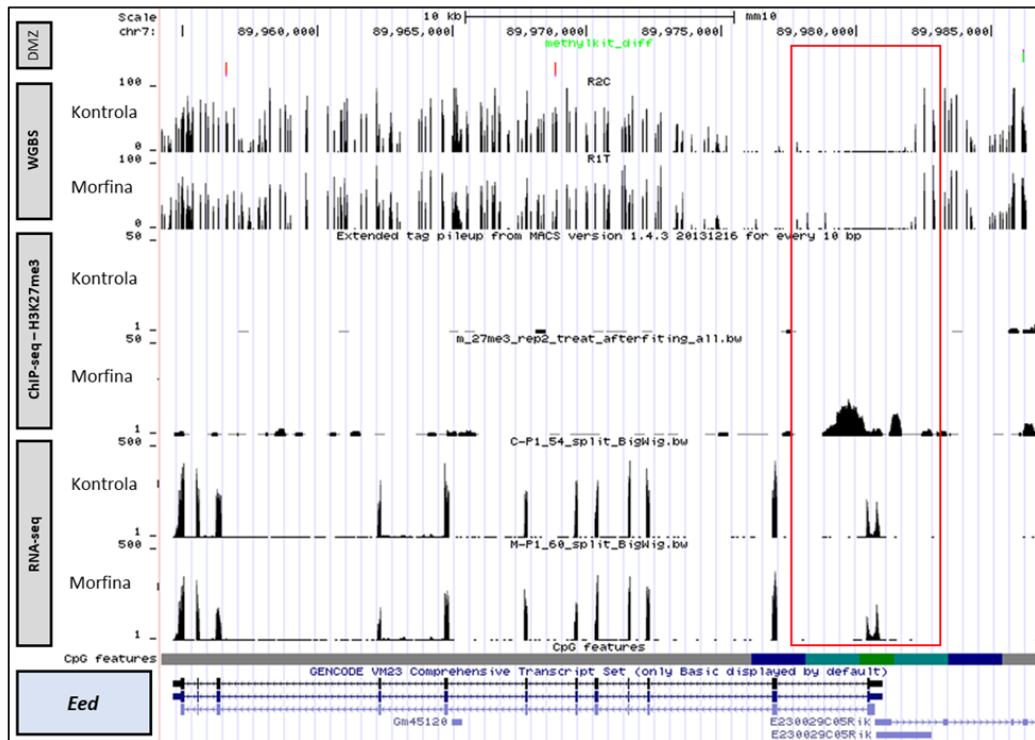
Integrazio prozesuan identifikatutako *Suz12* geneak, morfina presentzia adierazpenaren jaitsiera adierazgarri bat izan zuen (4.23.A. irudia). WGBS datuak erakutsi zuten moduan, genearen gorputz guztia erabat hipometilaturik topatu genuen, baino

bere gene sustatzailean ez genuen adierazpen jaitsiera hori eragingo zuen DMZ hipermetilatu gakorik topatu. Histona metilatuari dagozkion datuek, aldiz, gene sustatzailean H3K27me3 eraldaketa epigenetikoaren presentzia igoera adierazgarri bat baieztatu zuten.

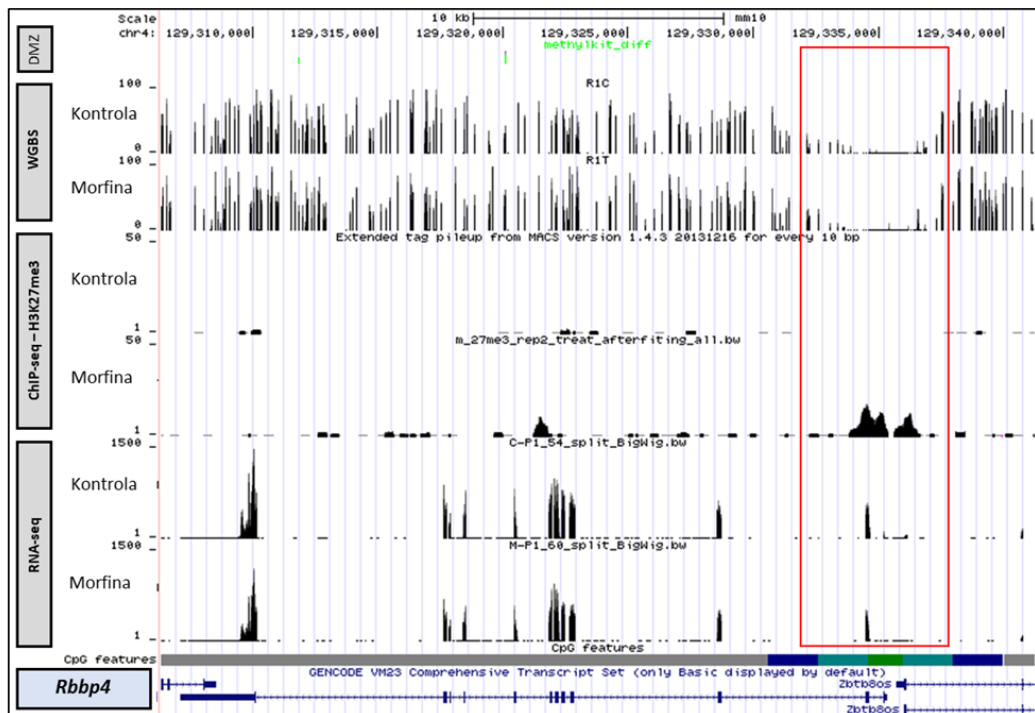


(Irudiak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

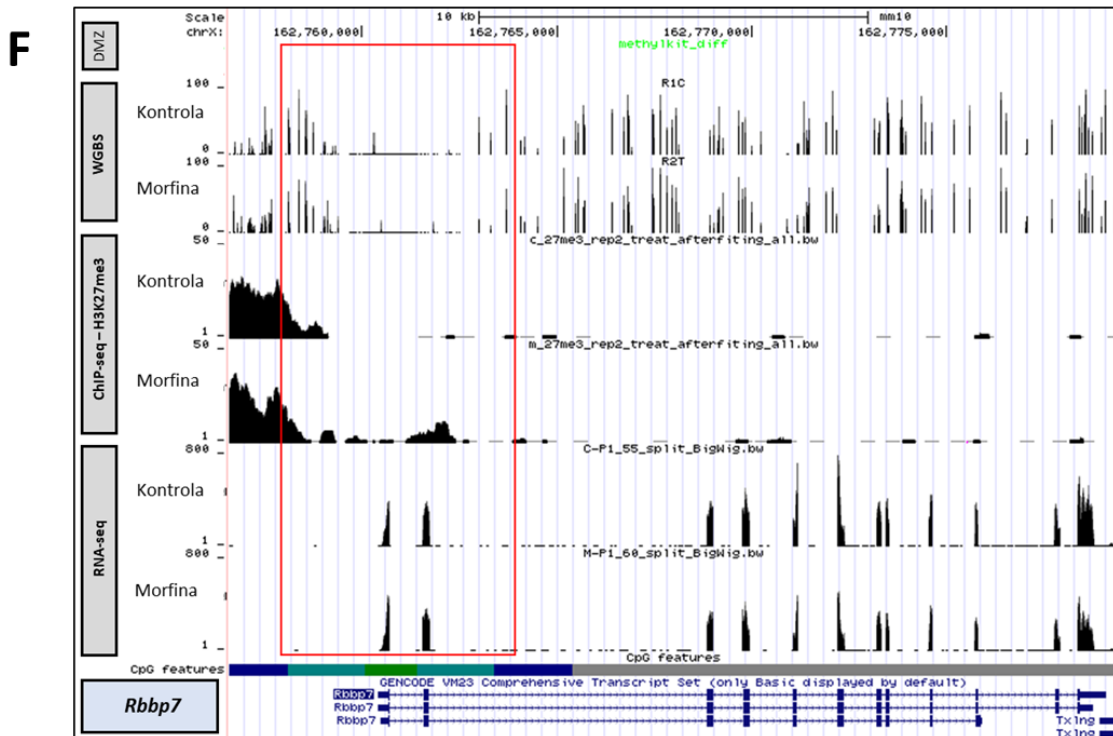
D



E



(Irudiak hurrengo orrialdean jarraitzen du)



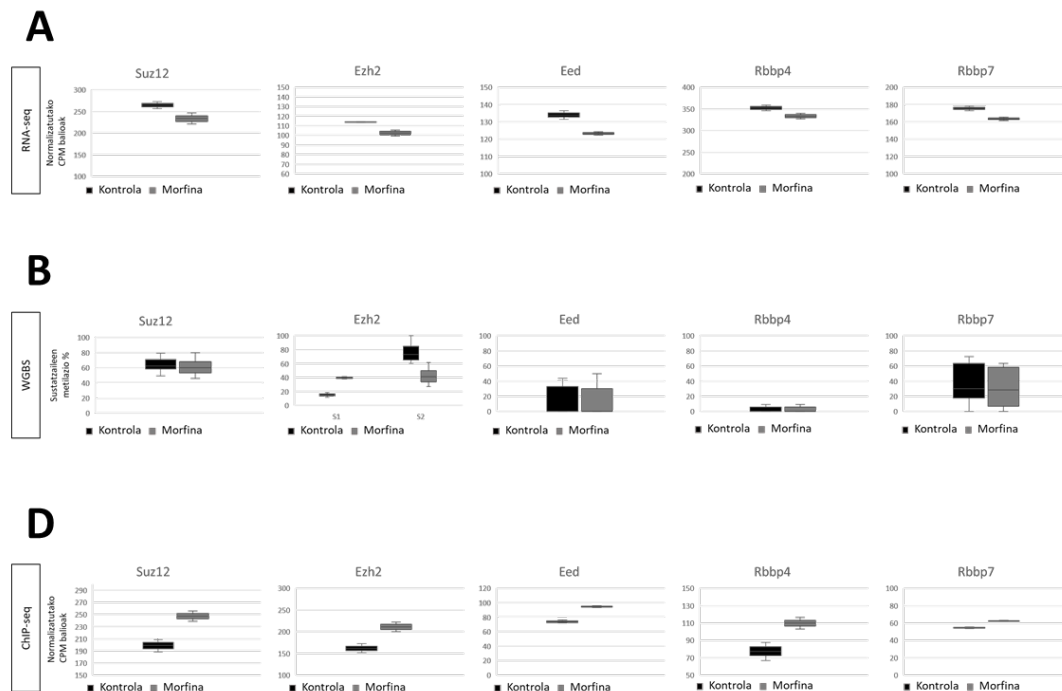
4.23. irudia. PRC2 Polycomb konplexuaren erregulazio epigenetikoak. Morfinak mESCTan eragindako erregulazio epigenetikoak (A) *Suz12*, (B) *Ezh2*, (D) *Eed*, (E) *Rbbp4* eta (F) *Rbbp7* geneetan. UCSC genome browser plataforma bidez irudikatua. Goitik behera: WGBS, CHIPseq (H3K27me3) eta RNAseq. DMZ, WGBS datuen paisaiaren gainean agertzen da (berdeak hipermetilazioak, eta gorriak hipometilazioak). Kaxa gorriek, transkripto ezberdinen gene sustatzaileak zehazten dituzte. CpG feature lerroak CGI eremuak adierazten ditu berdez, jarraian shore guneak urdin turkesaz eta Shelf guneak urdin ilunez, bere bi alboetan.

PRC2 konplexuaren kide katalitikoak den *Ezh2* genea aztertzerako garaian, RNAseq datuek morfinak gene horren adierazpena jaistea ekarri zuela adierazi ziguten (4.23.B. irudia). DNA metilatua inguruko datuek, informazio interesgarria azaleratu zuten, izan ere genearen gorputza DMZ ezberdinez beteta topatu bagenuen ere, lau transkripto totaletik hiruren gene sustatzailean (S1), transkripto horien adierazpen jaitsiera ekar dezakeen DMZ hipermetilatu gako bat behatu genuen. Beste gene sustatzailea (S2), ordea, hipometilaturik topatu genuen. Azkenik, H3K27me3 eraldaketaren presentzia handiago bat behatu genuen morfinarekin batera, eta horrek, geneak izandako adierazpen aldaketarekin erabat kointziditzen du.

Eed, aurreko beste bien antzera, PRC2 konplexuko entzima gakoa da, eta morfinak bere adierazpena jaitsi egiten duela adierazi ziguten RNAseq datuek (4.23.D. irudia). WGBS datuak aztertzerako garaian, osteraz, ez genuen DMZ adierazgarririk topatu genearen sustatzailean eta DMZ hipometilatu solte bat soilik genearen gorputzean zehar. H3K27me3 eraldaketaren CHIPseq datuek, histonaren igoera identifikatu zuten

sustatzailean morfinaren tratamenduaren ostean, zeinak Eed genearen adierazpena jaitسي dezakeen.

Azkenik, *Rbbp4* eta *Rbbp7* geneak aztertzerira iragan ginen. Hauek antzeko egitura duten proteina homologoak eratzen dituzten geneak dira (4.23.E. eta F irudiak). Aurreko kasu guztietan gertatu zen modu berean, bi gene horien adierazpena txikitu egin zen morfinaren presentzian. WGBS datuak aztertzerako garaian, ez genuen inolako DMZ adierazgarririk topatu, eta, aitzitik, ChIPseq datuek euren gune sustatzailean H3K27me3 histonaren presentzia handiago bat topatu genuen morfinarekin tratatuak izan ziren laginetan, adierazpen aldaketa azaldu dezakeen gertaera. Aipatu ditugun aldaketa horiek guztiak balioztatuak izan ziren (4.24 irudia) CPM balioen (RNAseq eta ChIPseq) eta sustatzaileko metilazio balioen (WGBS) normalizazioaren bidez.



4.24. irudia. PRC2 *Polycomb* konplexuko geneen emaitzen balioztatzea. (A) RNAseq eta (D) ChIPseq (H3K27me3) datuen balioztatzea CPM balio normalizatuen *boxplot*-en bidez. (B) WGBS datuen balioztatzea metilazioen ehunekoen *boxplot*-en bidez.

Horrenbestez, PRC2 konplexuaren kideak diren entzima guzti horiek morfinaren presentzian adierazpena jaitسي zutenez, konplexu osoa morfinarekiko sentikorra dela baieztatu genuen. Hala ere, adierazpen aldaketa horiek arautzeaz arduratzen den mekanismo epigenetiko nagusia H3K27me3 eraldaketa dela behatu genuen, kasu

guztietan histona metilatu horren igoera bat behatu genuelako gune sustatzailean, behaturiko adierazpen aldaketak azalduz. Edozein kasutan, nabarmendu beharra dago, *suz12* eta nagusiki *Ezh2* geneen adierazpena erregulatzeko garaian, DNAREN metilazioak ere funtzio giltzarria izan dezakeela, bi eraldaketen arteko kooperazio lan bat egonez.

4.5. Morfinak X kromosomaren inaktibazioan (XCI) duen eragina mESCtan *Smchd1* genearen erregulazio epigenetikoaren bidez

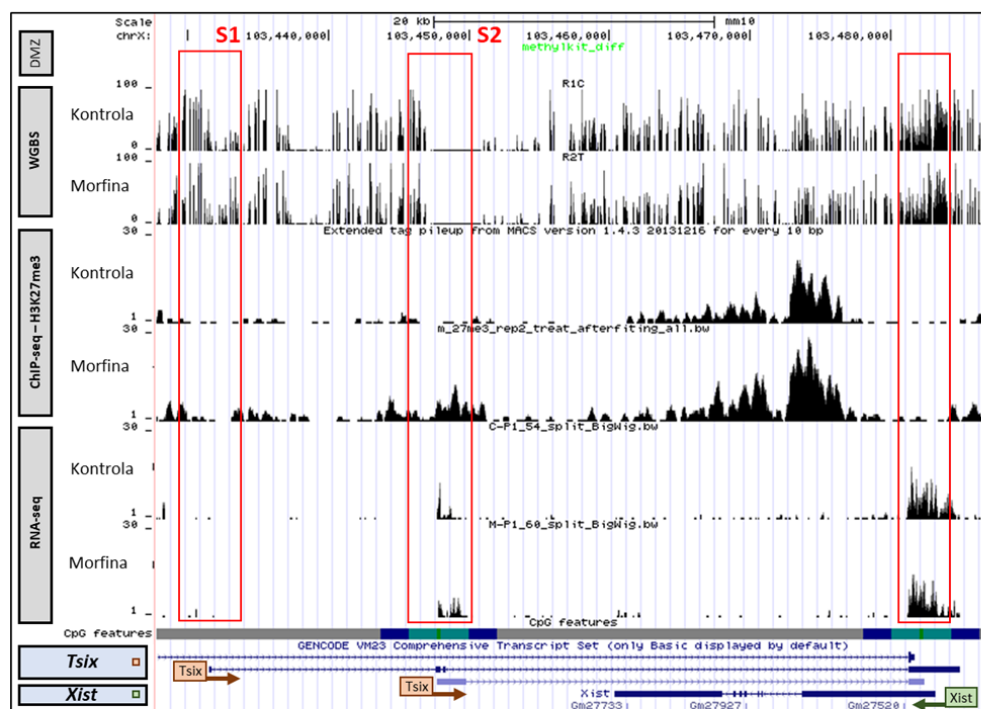
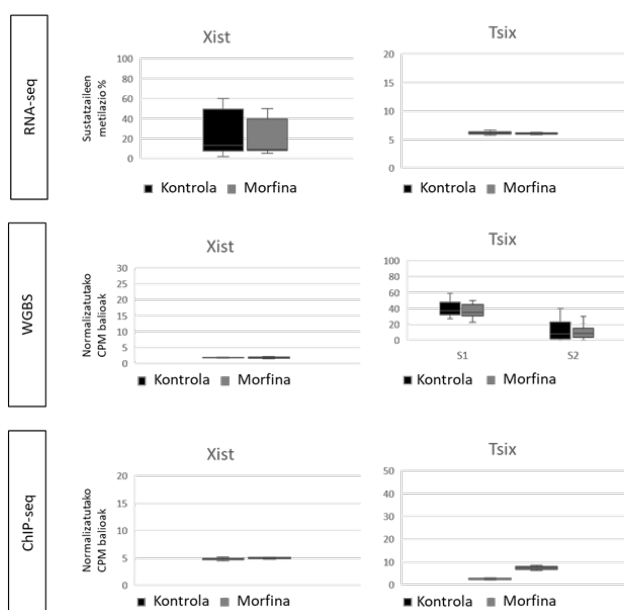
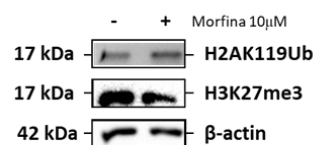
Integratio analisian hauteman genuen beste erregulatzailer epigenetiko garrantzitsu bat *Structural maintenance of chromosomes hinge domain containing1 (Smchd1)* genea izan zen. SMCHD1 entzima, genomaren errepresio epigenetikoarekin erlazionatua dago, eta funtzio gakoa gauzatzen du indibiduo emeatako X kromosomaren inaktibazio prozesuan (XCI) (Sakakibara et al., 2018; Wutz et al., 2018), baita gune autosomiko jakinen errepresio transkripzionalean ere, hala nola inprontadun geneetan eta *Hox* klusterrean (Jansz et al., 2013; Chen et al., 2015; Benetti et al., 2021). Funtzio horietan jokatzeko duen papera kontuan hartuz, memoria epigenetiko bultzatzen duten mekanismoekin erlazionatu da, marka errepresiboen mantentzea gauzatzen duelako, denboran zehar iraunez. Horrez gain, X kromosomaren aktibitate bikoitza (X kromosoma erabat aktibatuta dagoenean) pluripotentiarekin erlazionatu izan da. Ikerketa ezberdinek frogatu dutenez, zelula amen pluripotentzia bultzatzen dituzten TF-ak eta Xa (X kromosoma aktiboa) positiboki korrelazionatuak daude (Schulz et al., 2014; Chen et al., 2016), eta SMCHD1 entzimak XCI bultzatzen duenez, horren presentziak negatiboki eragiten du pluripotenzian.

Ugaztunetan gertatzen den X kromosomaren inaktibazio prozesua (XCI), kromatina isilaren eraketa kontrolatuaren adibide garbia da, eta prozesu horretan indibiduo emeatako X kromosometako bat inaktibatu egiten da bi sexuen artean dauden dosiak konpentsatzeko. Inaktibazio prozesu horrek garapen prozesuan zehar arautuak izaten diren zenbait pausu ditu. Prozesua *Xist* lncRNAREN bidez hasten da eta ondoren *Polycomb*

konplexuek gauzaturiko histonen eraldaketek gidaturiko konpartimendu errepresiboen eraketa gauzatzen da, lehendabizi PRC1ek katalizaturiko H2A histonaren 119. lisinaren ubikitinazioaren (H2AK119ub) bidez, eta bigarrenagoz PRC2k katalizaturiko H3 histonaren 27. lisinaren trimetilazioaren (H3K27me3) bidez. Amaitzeko X kromosomaren inaktibazioaren errepresio egonkorra ematen da, non SMCHD1 eta DNMT1 entzimek funtzio gakoa betetzen duten. Berriki egindako lanek erakutsi dutenez, SMCHD1ek Xi (X kromosoma inaktiboa) berrantolatzen du haren bereizgarri den hiru dimentsioko (3D) egitura sortu dezan (Wang et al., 2018; Wang et al., 2019). Horrenbestez, DNMT1 metilasak burutzen duen CpG dinukleotidoen metilazioa, eta SMCHD1 gauzatzen duen Xi-aren 3D-ko egituraren eraketa, gertaera gakoak dira zelulak zatitzen diren heinean dagoeneko isilarazia dagoen X kromosomak bere horretan iraun dezan, eta zelulek memoria epigenetikoak garatu dezaten.

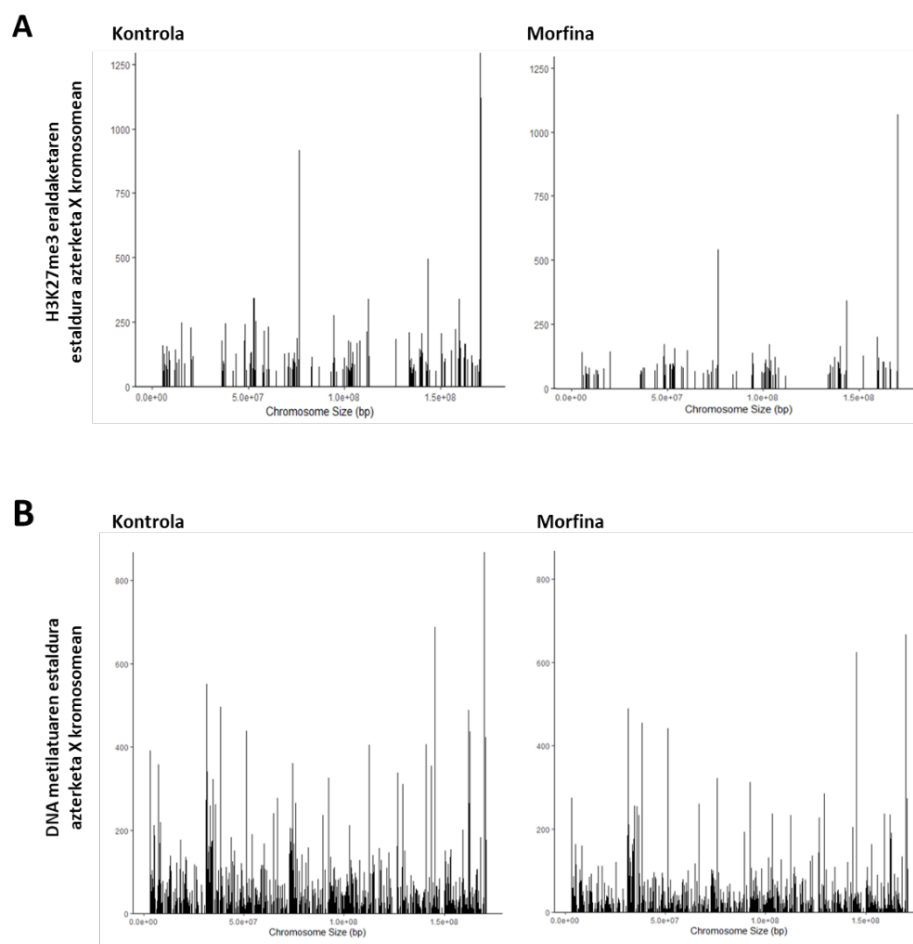
Hori guztia dela eta, mESCtan gauzaturiko morfinaren tratamendu kronikoak XCI prozesuan nola eragiten duen aztertu nahi izan genuen aurrenekoz, prozesuaren fase ezberdinetan zentratuz. XCI hasieran, Xist lncRNA-k betetzen duen funtzioa ezinbestekoa da, horrek erakartzen baitu PRC1 konplexua, eta horren bidez katalizatzen baita H2AK119Ub eraldaketa. Xist-ek eta funtzio antagonista duen Tsix lncRNAek (bi transkripto eta bi gene sustatzaile ezberdin dituen genea) tratamenduaren ostean izan zuten erregulazio epigenetikoak aztertzerakoan ez genuen inongo aldaketa adierazgarririk sumatu, ez DNAn metilazioan, eta ez histonen metilazioan (4.25.A irudia). RNAseq datuek, bada, bi gene horien adierazpenak morfinarekiko sentikorrek ez zirela baieztatu zuten. Emaizta horiek jarraian baliozkotu ziren datuen normalizazioen bidez (4.25.B. irudia).

Ondoren, PRC2 konplexuko kide guztiak morfinarekiko sentikorrek direla dagoeneko ikusi dugun arren (atala referenciar), ez genekien ea PRC1 konplexua, eta ondorioz bere produktua den H2AK119Ub eraldaketa, eraginda zeuden ala ez. Morfinak H2AK119Ub histonaren maila globalean zer nolako eragina duen aztertzeko WB bat burutu genuen (4.25.D. irudia). Inmunoblotting analisiak adierazi zuenez, morfinak ez du H2AK119Ub eraldaketan inongo aldaketa adierazgarririk sortzen, eta H3K27me3 eraldaketan aldiz, morfinaren presentziak histona mailaren jaitsiera berretsi zuen. Hortaz, jada aipatu dugun moduan, XCIaren hasiera fasea prozesu sekuentziala da, eta bertan parte hartzen duten partaideak morfinarekiko sentikorrek ez direla frogatu genuen (Xist eta PRC1 konplexuari dagokionez). XCI prozesuaren hasiera eta ondoren mantentze fasea elkarlotzen dituen PRC2 konplexua eta berak gidaturiko H3K27me3 eraldaketa epigenetiko errepresioegilea aldiz, negatiboki eraginda zeudela ikusi genuen.

A**B****D**

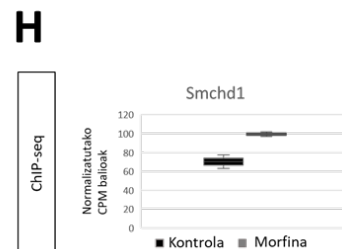
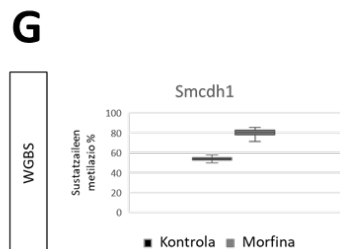
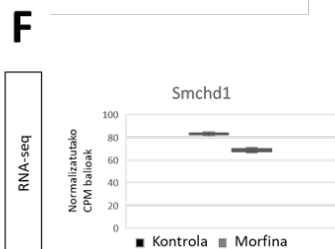
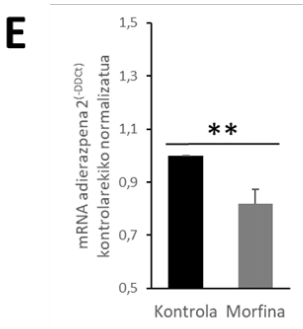
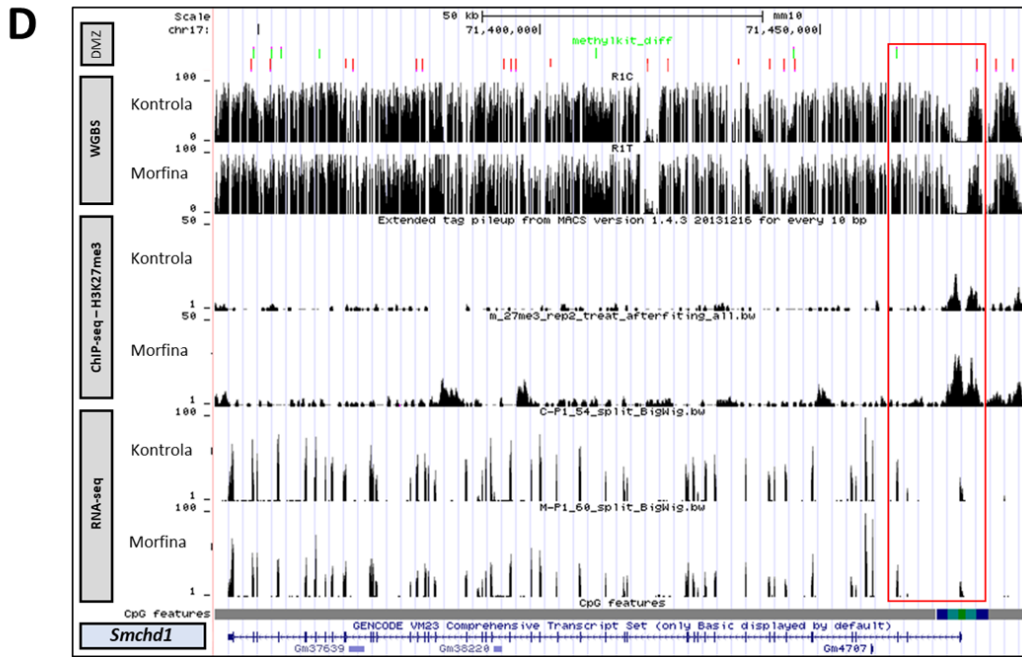
4.25. irudia. XCI prozesuaren hasiera fasea. (A) Morfinak mESCtan eragindako erregulazio epigenetikoak *Xist/Tsix* lncRNAen geneetan. *UCSC genome browser* plataforma bidez irudikatuak. Goitik behera: *WGBS*, *ChIPseq* (H3K27me3) eta *RNAseq*. *DMZ*, *WGBS* datuen paisaiaren gainean agertzen da (berdeak hipermetilazioak, eta gorriak hipometilazioak). Kaxa gorriek, transkripto ezberdinen gune sustatzaileak zehazten dituzte. *CpG feature* lerroak CGI eremuak adierazten ditu berdez, jarraian *shore* guneak urdin turkesaz eta *Shelf* guneak urdin ilunez, bere bi alboetan; **(B)** *RNAseq*, *WGBS* eta *ChIPseq* analisietako datuen balioztatzea *boxplot*-en bidez; **(D)** mESCtan buruturiko morfinaaren tratamendu kronikoak PRC1 eta PRC2 koplexuek katalizatzen dituzten H2AK119Ub eta H3K27me3 eraldaketetan, hurrenez hurren, eragindako aldaketen azterketa *western blotting* teknikaren bidez.

Ondoren, gure hurrengo helburu nagusia XCI prozesuaren mantentze lana gauzatzen duten eragileak aztertzea izan zen. Lehenengo, PRC2 konplexuak eta H3K27me3 eraldaketak erakutsitako jaitzierak, X kromosomaren mailetan nola eragin zuen ikertzeko, eraldaketa horren estaldura maila aztertu genuen. 4.X.A irudian ikusi daitekeen bezala, H3K27me3 entzimaren aberastea gutxitua ageri zen X kromosoman zehar (ingelesezko *coverage plot* – 4.26.A. irudia)(Muñoa-Hoyos, I.-ren tesia). Bigarrenez, DNMT1 entzimaren murrizketak X kromosomaren metilazio mailetan eragin zuen aztertzeko, berriz, WGBS sekuentziazio datuekin DNA metilatuaren estaldura aztertu genuen (*coverage plot* – 4.26.B. irudia). Emaitzek adierazi zutenez, X kromosomak dituen zitosina metilatu-mailak nabarmenki baxuagoak ziren.



4.26. irudia. XCI prozesuaren mantentze fasea. (A) PRC2 konplexuaren adierazpen jaitzierak X kromosoman izandako eragina aztertzeko H3K27me3-aren estaldura analisia (*coverage plot*); **(B)** *Dnmt1* genearen adierazpen jaitzierak X kromosoman izandako eragina aztertzeko DNA metilatuaren estaldura analisia (*coverage plot*).

(Irudiak hurrengo orrialdean jarraitzen du)



(D) Morfinak mESCTan eragindako erregulazio epigenetikoak *Smcd1* genean. UCSC genome browser plataforma bidez irudikatuak. Goitik behera: WGBS, ChIPseq (H3K27me3) eta RNAseq. DMZ, WGBS datuen paisaiaren gainean agertzen da (berdeak hipermetilazioak, eta gorriak hipometilazioak). Kaxa gorriek, transkripto ezberdinen gune sustatzaileak zehazten dituzte. CpG feature lerroak CGI eremuak adierazten ditu berdez, jarraian *shore* guneak urdin turkesaz eta *Shelf* guneak urdin ilunez, bere bi alboetan; (E) *Smcd1* genearen adierazpenaren neurketa RTqPCR bidez, erabilitako gene normalizatzaileak *Gadph* eta *Pcx* izan ziren, eta lortutako Ct balioak $2^{(-DDCT)}$ moduan, eta kontrolarekiko normalizatua izan zen ($n=3$). Emaitzen analisi estatistikoa Student-en T proba (ingelesezko Student's t-test) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereiziz: * $p<0.05$, ** $p<0,01$ eta *** $p<0,001$; (F) RNAseq eta (G) ChIPseq (H3K27me3) datuen balioztatzea CPM balio normalizatuen *boxplot*-en bidez. (H) WGBS datuen balioztatzea metilazioen ehunekoen *boxplot*-en bidez.

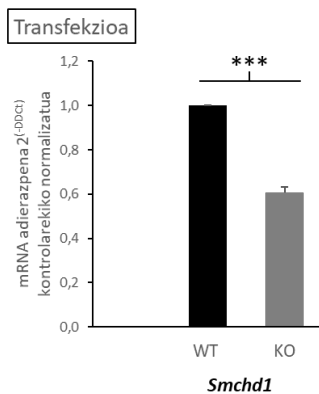
Azkenik, *Smchd1* genea aztertu genuen (4.26.D. irudia), XCI mantentzeko gene garrantzitsua, eta aurretik aipatu bezala, integrazio prozesuan azaleratu zen proteina gakoa. RNAseq datuek adierazi zuten, morfinak *Smchd1* genearen adierazpena jaitea eragin zuen, eta hori, RTqPCR teknikaren erabiliz balioztatu genuen (4.26.E. irudia). Morfinak *Smchd1* genearen adierazpena arautzeko garaian, horren atzean dauden mekanismo epigenetikoak zeintzuk diren aztertzeko, estatus epigenetikoaz aztertu genuen. Eraldaketa epigenetikoaren paisaiek erakutsi zuten, gene hori erabat baldintzaturik topatu genuen morfinaren presentzian. Aurretik buruturiko ikerketetan, morfinaren ondorioz gune sustatzailean H3K27me3 eraldaketaren presentzia modu esanguratsuan handitzen dela frogatu genuen. Edonola ere, ezezaguna genuen DNaren metilazio patroia dagokionez aldaketa adierazgarriak ematen den. Beraz, WGBS teknikaren bidez eskuraturiko datuak aztertzeraino iragan ginen. Metilazioaren estatusa erabat asaldatua topatu genuen *Smchd1* genearen gorputz osoan zehar, nagusiki hipometilatua, eta gune sustatzaileak oso gertu haren adierazpena jaitsi dezakeen hipermetilazio klabe bat topatu genuen. Sustatzaileko metilazio balioen (WGBS) normalizazioak konfirmatu zuten morfinak gune sustatzaile horretan induzitutako hipermetilazioa (4.26.G. irudia), eta hori bat dator geneak izandako adierazpen jaitsierarekin. Hortaz, haren gune sustatzaileko metilazio-mailen modulazioarekin, H3K27me3 eraldaketarekin batera, genearen adierazpen arautu zen, bien arteko elkarrekintza baten bidez.

Morfinaren eragina *Smchd1* geneak morfinarekiko duen sentikortasuna egiaztatzeko transfekzio saikerak:

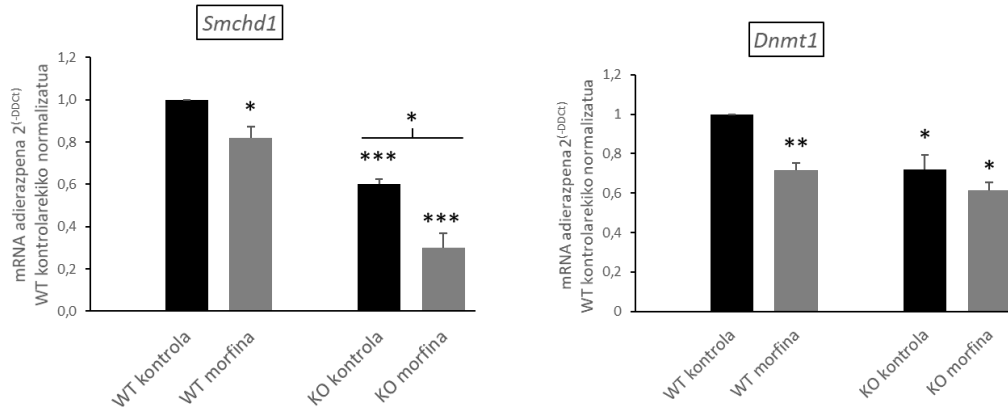
Gure emaitzek *Smchd1* genea morfinarekiko sentikorra dela adierazi zuten. Horrenbestez, gure hipotesia baieztatu ahal izateko isilarazpen esperimentuak gauzatu genituen, genearen inguruan are gehiago sakontzeko asmoz. *CRISPR/Cas9* teknikaren bidez, plasmidoekin buruturiko transfekzio saiakeran *Smchd1* entzimaren mESC *knockout* partzialak sortu genituen, eta horren bidez genearen absentsia partzialak duen eragina aztertu nahi izan genuen. Izan ere, erabateko isilarazpenarekin ezingo genukeen morfinaren efektua zein den aztertu. Transfektatze prozesuak balioztatu ahal izateko RTqPCR teknikaren bidez *Smchd1* genearen adierazpena neurtu genuen, eta emaitzek transfekzioaren arrakasta nabarmendu zuten (4.27.A. irudia). *Dnmt1* eta *Smchd1* geneen inguruan informazio gehiago eskuratzeko eta haien inguruko ezagutza handitzeko helburuarekin, morfinaren tratamendu kronikoa gauzatu, eta RTqPCR analisiek *Smchd1* genearen sentikortasuna berretsi zuten. Izan ere, tratatuak izan ziren *Smchd1*^{+/-} zelulek,

jada bazuten genearen adierazpen-murrizketa indartsuagoa adierazi zuten morfina- presentzian (4.27.B. irudia), hau da, isilarazia izan ez zen aleloa morfina-rikiko sentikorra zela behatu genuen. Horrez gain, *Dnmt1* genearen adierazpena *Smchd1*^{+/-} mESC-en kasuan murriztua geratu zela ikusi genuen (4.27.B. irudia). Beraz, entzima hori, modu batera edo bestera, *Dnmt1* genearen adierazpena arautzeko gai dela adierazten dute gure emaitzek.

A



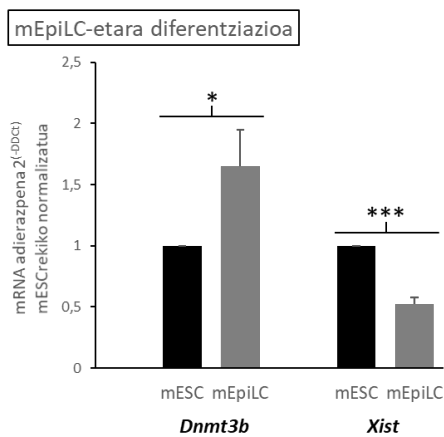
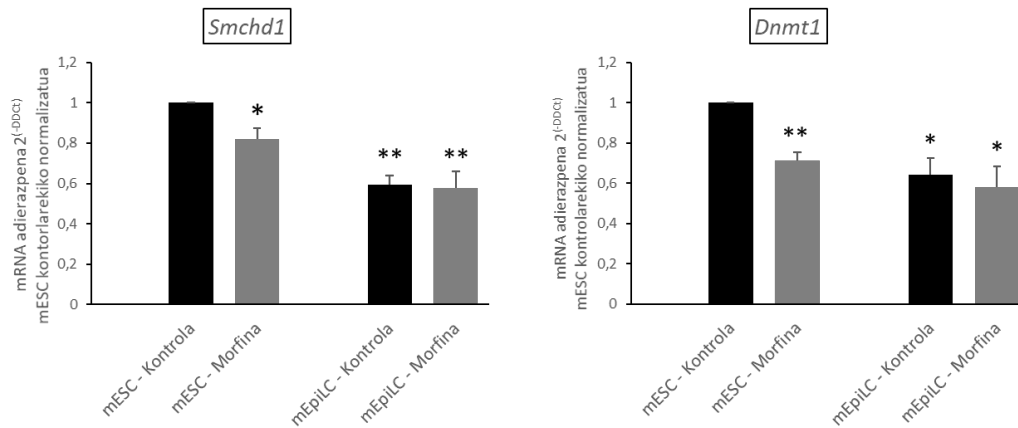
B



4.27. irudia. Transfekzioa esperimentua. (A) Transfekzio prozesuaren balioztatzea *Smchd1* genearen adierazpen neurketarekin (RT-qPCR); **(B)** mESC *Smchd1*^{+/-} knockout zelulekin buruturiko esperimentua, non morfina-aren tratamendu kronikoa burutu zitzaion. Buruturiko RTqPCR analisi guztietan *Gadph* eta *Pcx* izan ziren erabilitako gene normalizatzaileak (*housekeeping*), eta lortutako Ct balioak 2^(-DDCt) moduan, eta WT kontrolarekiko normalizatuak adierazi ziren (n=3). Emaitzen analisi estatistikoa Student-en T proba (ingelesezko Student's t-test) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereiziz: *p<0,05, **p<0,01 eta ***p<0,001.

Morfinaren eragina mESC-EpiLC diferentziazioan gauzatzen den XCI prozesuan:

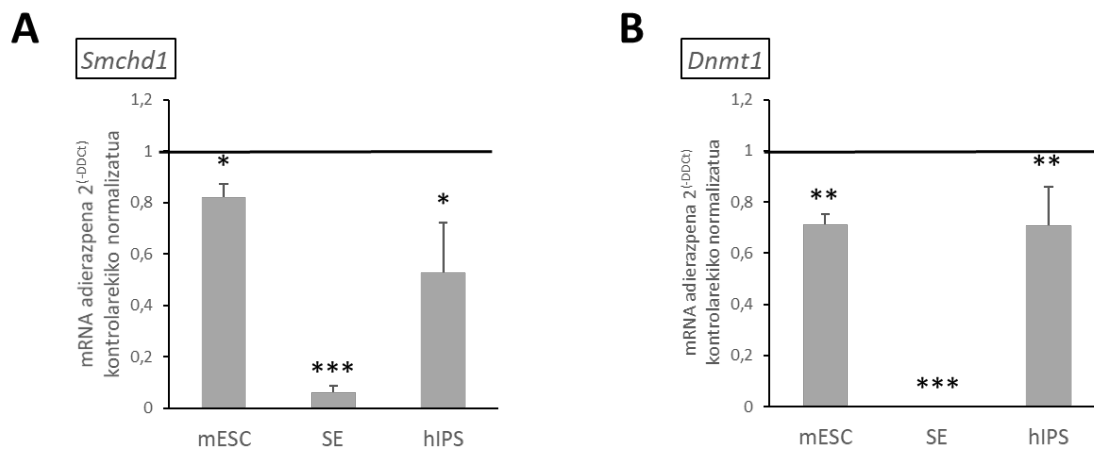
Saguetan, X kromosomaren inaktibazio prozesua mESCak diferentziatzen hasten direnean hasten da (Wutz & Jaenisch, 2000; Penny et al., 1994; Panning & Jaenisch, 1996). Bitartean, *Tsix* lncRNAk *Xist* genearen adierazpen kontrolatua izaten du, prozesua behar dena baino lehen hasi ez dadin. Hortaz, gure hurrengo xedea mESC horien diferentziazio prozesua hasi, eta bi gene horiei dagokionez ematen diren aldaketak aztertzea izan zen, morfinak prozesu horretan duen eraginarekin batera. Helburu horretarako mESC zelulak mEpiLC-tara diferentziatu genituen, hau da, zeluletan aleatorioki gertatzen den XCI jada amaituta duten zelulak. Diferentziazio prozesuaren eraginkortasuna, zelulek jasandako morfologia aldaketek (mEpiLC bereizgarria den morfologia, bibliografiak diotenaren arabera), eta prozesu hori berresten dituen geneen adierazpen aldaketek konfirmatu zuten (RTqPCR teknika bidez balioztatutako *Dnmt3b* genearen adierazpen igoera eta *Xist* genearen adierazpen jaitsiera, Hayashi et al., 2011) (4.28.A. irudia). Emaitzek adierazi zigutenaren arabera, bai *Smchd1* eta bai *Dnmt1* geneen kasuan, diferentziazio prozesuan zehar eurek duten adierazpena jaisten joan zen, eta jaitsiera hori morfinarekiko modu independentean eman zen (4.28.B. irudia); mESCak morfinarekiko tratatuak izan edo ez, behin diferentziazio prozesua eman eta gero bi gene horien adierazpen-murrizketa berdin gertatu zen bi laginen artean. Hortaz, morfinak mESCtan sorturiko aldaketa adierazgarriak diferentziazio prozesuan emandako aldaketa adierazgarriengatik ezkutatua geratu zen, EpiLCetara diferentziazio prozesuan jaitsiera hori handiagoa delako.

A**B**

4.28. irudia. Diferentziazioa esperimentua. (A) Diferentziazio prozesuaren balioztatzea *Dnmt3b* eta *Xist* geneen adierazpen neurketarekin (RT-qPCR); **(B)** EpiLC zelulekin buruturiko esperimentua, non morfina erabiltzen da kronikoki burutu zitzaientzat. Buruturiko RTqPCR analisi guztietan *Gadph* eta *Pcx* izan ziren erabilitako gene normalizatzaileak (*housekeeping*), eta lortutako Ct balioak $2^{(-DDCt)}$ moduan, eta WT kontrolarekiko normalizatuak adierazi ziren (n=3). Emaitzen analisi estatistikoa Student-en T proba (ingelesezko Student's t-test) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereiziz: *p<0,05, **p<0,01 eta ***p<0,001.

Ondoren, orain arte *in vitro* metodoen bidez mESCtan ikusi genituen emaitza horiek egiaztatu nahi izan genituen; mESC zelula horiek saguen enbrioetatik eratorriak diren zelulak direnez (enbrioaren blastozisto etapako barne zelula masak eratorritako zelula amak), enbrioaren hasierako garapen prozesu hori aztertu nahi izan genuen, morfina bertan duen eragina ikertuz. Horretarako, behin zigotoa zatitzen hasi eta bi zeluletako fasean, morfina erabiltzen duen kronikoki burutu zen 24h-z eta blastozisto etaparako mantendu zen, ondoren bertako zelulak aztertzeraz iraganen. Helburu nagusia, *Dnmt1* eta

Smchd1 geneek *in vitro* izandako adierazpen aldaketak errepikatzen ziren ala ez frogatzea izan zen, eta RTqPCR analisek hori baieztatu zuten (4.29.A. irudia). Horrez gain, bi entzima horiek antzekotasun asko dituzte saguaren eta gizakion arten, bai egitura aldetik eta bai funtzio aldetik (Blewitt et al. 2008; Nozawa et al. 2013). Beraz, morfinak gizakian ondorio transkripzional berberak zituen aztertu nahi izan genuen (4.29.B. irudia). hIPS (ingelesezko *human induced pluripotent stem*) zeluletan buruturiko morfinaren tratamendu kronikoak (24 orduko tratamendua, 10 μ Mko kontzentrazioan) aurreko kasuan ikusitako emaitza berdinak izan zituen. Beraz, bi organismo biologiko ezberdinetan morfinak eragin berbera zuela adierazi ziguten.



4.29. irudia. (A) *Smchd1* eta (B) *Dnmt1* geneen adierazpenari dagokienez morfinaren tratamendu kronikoak eragindako aldaketen azterketa saguen enbrioietan (SE) eta giza zeluletan (hIPS), RTqPCR teknikaren bidez. SEtan *Gadph* eta *Pcx* erabili ziren gene normalizatzailer moduan (*housekeeping*), eta hIPStan, berriz, *Hprt1* eta *Beta-actin*. Lortutako Ct balioak 2^(-DDCt) moduan, eta mESC kontrolarekiko normalizatuak adierazi ziren (n=3); Emaizten analisi estatistikoa Student-en T proba (ingelesezko Student's t-test) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereiziz: *p<0.05, **p<0,01 eta *p<0,001.**

Beraz, morfinak XCI prozesuaren mantentze fasean parte hartzen duten partaide guztien gain eragiten du, hasiera-fasearen amaieran ere eraginez (H3K27me3 mailak jaisten ditu). Lehendabizi PRC2 konplexuan eragiten du, ondoren DNAREN metilazioaz arduratzen den DNMT1 entziman, eta amaitzeko, Xi-aren bereizgarria den egitura kondentsatua bultzatzen duen SMCHD1 entziman. Kasu guztietan, horien adierazpena adierazgarriki jaitsi, eta ondorioz, euren funtzioa ere nabarmenki murriztua topatu genuen. Horrez gain, azken bi entzima horiei dagokienez mESCtan behaturiko adierazpen aldaketak *in vivo* berretsi genituen saguen enbrioietan, baita gizaki jatorria dituzten zeluletan ere. Aldiz, transfekzio esperimientuek *Dnmt1* genearen adierazpena *Smchd1* genearekiko menpektoa

edota bere presentziarengatik baldintzatua zegoela adierazi zuten. Azkenik, mESCtatik EpiLCetara diferentziazio prozesuan, bi gene horien presentzia nabarmenki jaisten da, eta hori morfinarekiko independente da, jaitsiera hori berdina da morfinaren tratamendu jaso ala ez. Beraz, bi gene horiek morfinaren aurrean duten sentikortasuna handia bada mESCtan, diferentziazioa eta gero, aldaketa horiek arintzen edo baretzen doaz.

5. EZTABAIDA

Biomedikuntzak egun duen erronka handienetariko bat gure bizimoduak gure osasunean nola eragiten duen ulertzea da. Aldaketa epigenetikoak garapen arruntaren eta zahartzearen parte badira ere, ingurumen faktoreek sortu ditzaketen aldaketak ugariak dira oso, eta, ondorioz, interes handia dago ingurumen-faktore horiek osasun-arazoetan edo gaixotasunetan nola eragiten duten ulertzean. Izan ere, fenotipoan emandako aldaketa horiek denboran zehar iraun dezakete, eta gainera, ondorengo belaunaldiak eraginda egon daitezke aldaketa epigenetiko horien herentzia ahalbidetzen dituzten mekanismoen bidez (Chen & Dent, 2014; Becker & Weigel, 2012). Asaldura horiek kanpoko zenbait estimuluaren ondorioz agertzen badira ere, garapen prozesuan zehar estimulu jakinen faltaren ondorioz ere agertu daitezke (Skinner, 2014b; Heard & Martienssen, 2014; Cortessis et al., 2012; Guerrero-Bosagna et al., 2012; Skinner et al., 2010).

Dietak (Whitelaw & Whitelaw, 2006), estresak (Skinner, 2014a), disruptore endokrinoek (Anway et al., 2005) eta mendekotasun-drogek (Skinner, 2014b) bezalako ingurumen-eragileak dira kanpo-faktore horien adibide nagusienak, eta horiek saguen eta gizakion fenotipoan eragin dezakete, besteak beste. Aldaketa epigenetiko horiek denboran zehar mantentzen diren eragin fenotipokoak sortzen badituzte ere, horietariko gehienak ez dute inpaktu jakinik hurrengo belaunaldietan. Marka epigenetiko gutxi batzuek soilik agertu dute hurrengo belaunaldietara iragateko gaitasuna; gameto helduen bidez iragaten diren markak, bidean dauden prozesu biologiko garrantzitsuetatik ihes eginez. Belaunaldien arteko benetako herentzia erakutsi duten ingurumen-faktore espezifikoak fungizidak (binklozolina)(Anway et al., 2005), alkohola (Gabgissstty et al., 2020; Govorko et al., 2012), nikotina (Liu et al., 2020; Zhu te al., 2012) eta morfina (Brynildsen et al., 2020; Ahmadian-Moghadam et al., 2019; Byrnes et al., 2011; Byrnes, 2005) izan dira.

Morfina opioaren osagai aktiboena da, eta isolatzen lehenengoa izan zen opioidea (Krishnamurti & Rao, 2016). Opioideek oinazea arintzeko duten balio terapeutikoa aski ezaguna da gaur egun, eta, ondorioz, medikuntzan morfinak duen erabilera erabat ohikoa da, nahiz eta albo-efektu ugari izan. Morfina belaunaldi arteko herentzia eragin dezakeen kanpo faktoreen artean dagoenez, berraztertze mekanismoetatik ihes egin eta marka epigenetiko zehatzek duten prebalentzia aztertze erreminta paregabea bihurtu da. Morfinak sor ditzakeen aldaketa fenotipokoaren artean nagusienak portaeran, dopamina-seinaleztapenean, plastikotasun sinaptikoan eta neurona-egituraren ematen direnak daude (Yohn et al., 2015; Byrnes et al., 2013; Munoa et al., 2015). Aldaketa fenotipoko horiek mantentzeko azpimekanismoen existentzia bat egon badagoela praktikoki onartua

badago ere, orain arte ez da belaunaldiz belaunaldi ematen den herentzia hori azalduko duen epigenomaren aldaketa zehatzik identifikatu. Hori dela eta, tesi lan honen helburu nagusia belaunaldiz belaunaldi mantentzeko aukerak dituzten marka epigenetiko horiek identifikatzea da, atzean dauden mekanismo epigenetiko nagusiak ikertuz, eta oroimen zelular epigenetikoaren oinarriak ezagutzeko pausuak emanez.

5.1. Morfinaren tratamendu kronikoak aldaketa globalak eragiten ditu DNAREN metilazioan

DNAREN metilazioa, eta haren presentzia arautzen duen DNMT/TET/MBD makineria proteikoa funtsezkoa da zelula guztien funtzionamendu egokirako; izan ere, eraldaketa epigenetiko horrek transkripzioaren erregulazioan jotzen duen papera ezinbestekoa da. Ugaztunetan esaterako, garapenean zehar gakoak diren prozesu biologikotan duen parte hartzea ezinbestekoa da: transposoiaren isiltzean, X kromosomaren inaktibazio prozesuan eta inpronta genomikoan, besteak beste (Smith & Meissner, 2013). DNAREN metilazio-patroi aberrantea, edota DNAREN metilazioaz arduratzen diren entzimetan emandako desdoikuntzek arazoak sortzen dituzte zelulen funtzionamendu egokian eta garapen prozesuan, eta kasu askotan, minbizi ezberdinekin erlazionatu izan dira (Hamidi et al., 2015; Baylin & Jones, 2016). MS/MS analisiek DNA metilatuaren demetilazio prozesu globala azalarazi dute mESC zeluletan buruturiko morfinaren tratamendu kronikoaren ostean. Behatu dugun metilazioaren jaitsiera hori, aldi berean topatu dugun hidroximetilazio-mailen igoerarekin bat dator; demetilazio-prozesu aktiboa gauzatzean, zitosinetako metilo hondarraren (5mC) oxidazio prozesua ematen da, prozesu horretako lehen produktua hidroximetilazio hondarra (5hmC) delarik. Hondar oso iragankorra denez, horren presentziaren igoerak genomaren hipometilazio egoera globala ekartzen duen mekanismo nagusia demetilazio-prozesua aktiboa dela adierazten du. Gure esperimenduetan ikusi ditugun aldaketa horiek, esaterako, bat datoz bestelako drogekin buruturiko esperimenduetan behaturiko aldaketekin, hala nola kokainarekin (Tian et al., 2012; Novikova et al., 2008), kanabinoideekin (Watson et al., 2015), edota bestelako toxina edo kanpo faktoreekin (Caputi et al., 2021; Suzuki et al., 2013; Yang et al., 2014; Yoon et al., 2017).

Morfinak metilazio patroian eragindako aldaketa espezifikoa ikertu badira ere, mu opioide hartzailearen genean (*Oprm1* genea) eragindako aldaketak, adibidez (Sandoval-Sierra et al., 2020; Xu et al., 2018; Cecil et al., 2015; Doehring et al., 2013), oso lan gutxi burutu dute metilazio patroia mapatze genomiko osoa, metiloma aztertze helburuarekin. Horrek, morfinak eragindako aldaketak modu sakonago batean aztertzea ahalbidetu badezake, zaila da bertan lorturiko emaitzak sendoak izatea. Tesi lan honetan, morfinak mESCTan metilazioari dagokionez buruturiko aldaketak modu sakonagoan aztertze *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS) teknika gauzatu dugu, metiloman emandako aldaketa guztien ikuspegi orokor bat eman dezakeelarik, orain arte burutu diren ikerketen lan osagarri garrantzitsua izanik. Morfinak eragindako DMZ hipometilatuen kopurua, hipermetilatuena baino askoz handiagoak dira, beraz, aurretik behatu genituen emaitzak berresten ditu. Edonola ere, DMZ horien banaketaren azterketak garbi adierazi du metilazio patroian emandako aldaketa hori ez dela prozesu aleatorio bat; kromosoma batzuk askoz ere sentikorrak dira. Metanfetaminekiko dependentzia duten pertsonen odol-zelulekin burututako ikerketa batek antzeko emaitzak adierazi ditu (Liu et al., 2020), kromosoma bakoitzak duen sentikortasuna erabat desberdina dela nabarmenduz. DMZen banaketa hori, kromosoma-tamainarekiko eta horiek duten CpG dinukleotidoen presentziarekiko independentea dela ikusi dugunez, morfinak eragindako aldaketa horiek gene jakinetara bideratuak daudela adierazten dute emaitzek. Horren inguruko arrazoiak ezagutzen ez baditugu ere, horrek argi uzten du aldaketa horien espezifikotasun handia.

Kuriosoki, egoera hipometilatu orokor bat behatu badugu ere, sustatzaileko zitosina hipermetilatuen ehuneko balioak genoma osoan zehar behatu direnak baino zeozer handiagoak dira, morfinak geneen gene sustatzailean eragindako metilazio igoera kasu ugariak dielarik (Liu et al., 2022; Sandoval-Sierra et al., 2020; Zhu et al., 2016). Metanfetaminekiko dependentziaren inguruko ikerketan behatu dutenez, dependentzia handiago duten pazienteek gene hipermetilatuago gehiago aurkezten dituzte dependentzia baxuagoa dutenek baino, gure emaitzak sendotuz (Liu et al., 2020). CGI guneak aztertzerakoan, ostera, aldaketa oso gutxi behatu ahal izan ditugu. CGI gune horiek CpG dinukleotidoetan aberatsak diren guneak badira ere, bertan egoten diren metilazio mailak bereziki baxuak dira, eta gehienetan gene ezberdinen gene sustatzaileekin erlazionatzen dira. Gene sustatzaile horiek metilatuak topatzen direnean, gene horiek modu oso egonkorrean isilaraziak egoten direla nabarmendu izan dute (Esteller, 2002; Bird, 2002). Hortaz, metilazio patroia dagokionez gene sustatzaileetan topatzen diren CGI eremuetan morfinak eragindako aldaketarik topatuz gero estatus hipometilatuago bat ohikoagoa da. Bestalde, aipagarria da DMZ guztien %15a

sustatzaileetan eta euren inguruetan ematen direla, horrenbestez, horrek mESCtan eduki ditzakeen inplikazio transkripzionalak handiak dira.

mESCen ezaugarri karakteristikoena euren izaera pluripotentea denez, zelula horiek ia edozein zelula-motatan bereizteko ahalmena dute (Huang et al., 2020; Evans & Kaufman, 1981). mESCtan pilatutako marka epigenetikoak mantenduz gero, zelula horietatik eratorritako zelula mota guztietara heredatzeko aukera dagoela kontuan hartuta, morfinak ehun somatiko horietan eragiten dituen aldaketa epigenetiko eta transkripzionalak aztertzea interesgarria da oso. Horrenbestez, mESCtan morfinak dituen eragina aztertzeaz gain, morfinak DNAREN metilazioari dagokionez organo heldu desberdinetan duen eragina aztertu nahi izan genuen, albo efektu horien atzean dauden mekanismoak ulertzeko helburuarekin, eta dauden ikerketekiko osagarria izateko helburuarekin. Orain arte burutu diren ikerketa gehienek morfinak nerbio sisteman eta portaeran dituen albo efektuekin lotu badituzte ere nagusiki (Stein et al., 2003), albo efektu ugari sortu ditzake hainbat sistema eta organo ezberdinetan.

Ez dugu morfinaren aurrean metilazio-patroien joera global zehatzik topatu, eredu horiek aldatu egiten baitira sexuaren eta aztertutako eskualdearen edo ehunaren arabera, eta hori, ziur aski, organo bakoitzean dauden zelula-motak erabat ezberdinak direlako gertatzen da. Gure emaitzek hipometilazio globala erakutsi dute testikuluan, obuluetan eta indibiduo arren biriketan, zelula neuronaletan ikusitako patroia berarekin bat datozenak (Trivedi et al., 2014). Aitzitik, DNAREN hipermetilazio globala ikusi dugu sagu arren gibel eta bihotzetan, baita sagu emeen giltzurrunetan ere. Kanabinoideekin (Watson et al., 2015) edota adikzio sortzen duten drogekin (Suzuki et al., 2013; Yoon et al., 2017), heroinarekin kasu, DNAREN hipermetilazioa behatu da exoi eta gorputz genetikoetan. Opioideen bidezko DNAREN metilazioaren modulazio hori, kasurako, arratoien garuneko eskualde askotan identifikatu da, morfinaren eraginpean kronikoki egon ondoren (Barrow et al., 2017).

Hortaz, gure emaitzek morfinak ondorio sistemikoak eragiten dituela frogatzen dute; morfinaren eraginpean egon ondoren aldaketak ematen dira DNAREN metilazio-mailari dagokionez, eta aztertutako organoaren eta sexuaren arabera aldaketa horiek erabat ezberdinak dira. Sexuaren araberrako aldaketa fenotipokoaren herentzia baieztatu izan duten ikerketak existitzen dira (Back et al., 2011; McHugh et al., 2013), eta horiek aldaketa fenotipokoak eragiteko gaitasuna duten eta sexuaren menpekoak diren eraldaketa epigenetikoak egon behar dutela frogatzen du. Sistema opioidearen inguruan egindako ikerketek, esaterako, morfinaren aurrean sexuaren arabera dagoen egokitzapena ezberdina dela adierazi dute, eta hori sexuaren arabera eratzen diren mu opioide-

hartzaileen aldaera ezberdinek eragiten dutela adierazi dute (Chakrabarti et al., 2012; Verzillo et al., 2014). Kasurako, sagu eta arratoi arrek opioideekiko duten eragina handiagoa dela dioten ikerketak badaude (Kest et al., 2000; Cicero et al., 1996; Islam et al., 1993; Baamonde et al., 1989; Candido et al., 1992), eta horiek, bat datoz gure emaitzekin; sagu arrek izandako aldaketa handiagoak izan dituzte, eta hori sexuaren arabera sistema opioidean dauden ezberdintasunek eragiten dute. Gure emaitzek, beraz, gizonen eta emakumeen arteko desberdintasunak sendotzen dituzte, eta ondorioz, parekotasun sexualaren beharra azpimarratzen dute etorkizunean morfinaren efektuen inguruan burutuko diren ikerketetan.

Aipagarria da sexu organoek, bai testikuluak eta bai obarioak, metilazio-maila globalen aldaketa joera bera agertu dutela, jaitsiera adierazgarriak, zehazki. Gainerako organoetan ez dugu horrelako kointzidentziarik topatu, eta kuriosoki, ikusitako aldaketa hori mESCtan behatutako aldaketa-mota bera izan da. Orain arte morfinak arren eta emeen ugal aparatuetan aldaketa fenotipokoak sortzen dituela adierazi duten lanetan aztertutako aldaketak DNAREN metilazioak jasandako jaitsiera orokorrarekin erlazionatuta egon daitezke, hala nola: testosterona-maila (Yilmaz et al., 1999), esperma-ekoizpena eta sertoli-zelulen populazioa (Estomba et al., 2016; Mafra et al., 2011), eta antzutasuna (Estomba et al., 2016; Fraune et al., 2012) arren kasuan, eta emeetan, aldiz, folikuluen hazkuntza (Lintern-Moore et al., 1979). Metilazioaren eta aldaketa fenotipoko horien artean loturarik badagoen ez badakigu ere, organo sexualetan behatutako aldaketa joerak bera dira, eta gainera, organo horietan ematen diren aldaketa epigenetikoak hurrengo belaunaldietara heredatzeko duten potentzialtasuna ikaragarri handia da (Gapp et al., 2014; Yohn et al., 2015). Horrenbestez, erabat interesgarria litzake horren inguruko ikerketa sakonago bat burutzea; morfinak zelula horiengan duen inaktuaren atzean dauden mekanismoak mESCtan ematen diren antzekoak diren aztertzeke, adibidez, edota bertan emandako marka epigenetikoek ondorengoetara modu egonkorrean iragateko gaitasuna duten ala ez aztertzeke. DNAREN metilazioan gertatzen diren aldaketa guztien mapatze bat burutzea interesgarria izan daiteke; morfinak inprontadun geneetan eragindako aldaketa epigenetikoak aztertze gakoa izan daiteke ugal zelulek DNAREN metilazio bidez herentzia zelular epigenetikoak gauzatu dezaketela baieztatzen duten ikerketak berresteko (Popp et al., 2012; Hajkova et al., 2008; Lane et al., 2003; Hajkova et al., 2002).

5.1.1. Morfinaren tratamendu kronikoak genomako demetilazio aktiboan eragiten du TET entzimen-bidezko autoerregulazio mekanismoarekin.

Morfinak mESCen metilazio patroian eragindako aldaketen deskribapen orokor bat egin badugu ere, gure helburu nagusienetarikoa bat, DNAREN metilazio mailak erregulatzen dituzten konplexu proteikoei dagokionez zer nolako aldaketak ematen diren aztertzea izan da. Horrek, ikusitako genomaren metilazio estatusaren aldaketak azal ditzaketen autoerregulazio mekanismoak existitzen baden ala ez aztertzea ahalbidetuko digu, besteak beste. Beraz, helburu horrekin metilasa moduan ezagutzen diren DNMTak, demetilasa moduan ezagutzen diren TETak, eta metilo hondarren mantenturako funtzio gakoa burutzen duten MBDak aztertu ditugu. Gure emaitzek garbi adierazi dutenez, bi entzima izan dira gakoak mESCtan morfinaren tratamendu ostean behatutako metilomaren aldaketak azaltzeko garaian, alde batetik mantentzen metilazioa gauzatzen duen DNMT1 entzima, eta bestetik, demetilazio aktiboa gauzatzen duen TET1 entzima.

mESCtan burututako morfinaren tratamenduak DNMT1 entzimak bideratutako demetilazio prozesu pasiboaren bidez burututako metilazio-maila globalen jaitsiera globala indartzen duela aditzera eraman gaituzte gure emaitzek. Izan ere, morfinak *Dnmt1* genearen adierazpena jaistera ekartzen du, entzimak zelula barruan duen presentzia jaitsiz, eta, ondorioz, DNA metilatuaren mantentze lanak kolokan jarritz (Wang et al., 2009; Chen eta Riggs, 2011; He et al., 2017). Oxikodonarekin garunean burututako zenbait esperimenduek, opioide horren erabilerak DNMT1 entzimaren azpierregrulazioak bultzatutako egoera hipometilatu orokorra sortzen duela nabarmendu dute (Fan et al., 2021; Fan et al., 2020), gure emaitzekin bat datorrena. Hala ere, genomako metilazio mailak mantentzen dituen entzima gako horren adierazpena morfinarekiko sentikorra dela ikusi badugu ere, ez dugu haren autoerregulazioa ekarriko duen mekanismo epigenetikorik aurkitzeko gai izan. Aitzitik, adierazpena jaisten duen mekanismo epigenetikoak morfinak haren gune sustatzailean induzitutako H3K27me3 eraldaketa dela deritzogu. Autoerregulazio mekanismo bat ezin izan badugu baieztatu ere, horren inguruko esperimendu gehiago burutzea beharrezkoa da.

Aldiz, mESCtan burututako morfinaren tratamenduak TET1 entzimaren adierazpena igotzea ekartzen du, eta igoera horrek, familiako kide guztien bereizgarria den demetilazio prozesu aktiboa (Iyer et al., 2009; Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010) nabarmenki

handitzea ahalbidetzen du, genomaren egoera hipometilatu orokor bat sortuz. Aipatu dugun moduan, MS/MS teknikaren alderdi interesgarrienetariko bat 5hmC hondarrak identifikatzeko duen gaitasuna da (Le et al., 2011; Zhang et al., 2012), eta horren bidez, mESCtan zeuden 5mC mailak jaisteaz gain, 5hmC mailak nabarmen igo zirela behatu genuen, demetilazio prozesu aktibo baten adierazgarria (Pastor, Aravind & Rao, 2013; Wu & Zhang, 2017). Morfinak eta menpekotasuna sortzen duten bestelako drogek entzima horien gain duen eragina aztertzeaz arduratu diren ikerketak oso urriak badira ere, oxikodonarekin buruturiko zenbait esperimenteru opioide horren presentziak garunean TET entzimen jaitziera ekartzen duela adierazi dute (Fan et al., 2021; Fan et al., 2020). Morfinak arratoien garunean duen eragina aztertzeke egindako ikerketa batean, aldiz, DNAREN metilazioak bultzatutako TET3 entzimaren adierazpen emendio bat behatu zuten (Jiang et al., 2021). mESCtan *Tet3* geneak duen adierazpena kontuan hartzen badugu, eta funtzio analogoa dutela kontuan hartuta, gure emaitzekin guztiz bat dator. Horrez gain, *Tet1* geneak morfinaren aurrean autoerregulazio mekanismo bat duela baieztatu dugu gure emaitzetan; TET1 entzimak haren genearen gune sustatzaileko metilazio patroia modulatu, haren adierazpena doitzen du haren eragin zelularra handituz.

Horrenbestez, morfinaren eraginaren ondorioz mESCtan ematen den genomaren egoera hipometilatu globalaren atzean dagoen mekanismo epigenetiko nagusia DNAREN demetilazio aktiboa dela esan dezakegu, TET1 entzimak bideratua, eta gainera haren presentzia kontrolatzen duen autoerregulazio mekanismo bat erakutsi du. Hala ere, DNMT1 entzimaren beheranzko erregulazioak demetilazio prozesu aktibo hori indartuko duen demetilazio pasiboa ahalbidetzen du, bi prozesuen arteko elkarlan bat gauzatu.

5.2. Morfinaren tratamendu kronikoak pluripotentzia mantentzen du mESCtan

Enbrioiko zelula amak (ESC) ezarri aurretiko enbrio-barneko zelula-masatik (ingelesezko *inner cell mass*; ICM) erauzten dira (Huang et al., 2020; Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998), eta definitzen dituzten bi ezaugarri bereizgarriak autoberritzeko duten gaitasuna, eta organismo helduko zelula-leinu guztiak sortzeko

duten gaitasuna da; zelula horiek mesodermoko, endodermoko eta ektodermoko zelulak eratzeko gai dira. Hau da, zelula ama pluripotenteak dira (ingelesezko pluripotent stem cells; PSC) eta horiek, hiru baldintza nagusi bete behar dituzte. Lehenik, pluripotenzia bultzatzen dituzten bidezidorrak aktibo eta diferentziazio prozesua inaktibo egotea arautzen dituzten faktoreak adieraztea. Faktore horien artean ezinbestekotzat hartzen direnak *Oct4* edo *Pou5f1*, *Sox2* eta *Nanog* dira, eta horrez gain, enbrioiaren ezarpen aurreko etaparen bereizgarriak diren bestelako transkripzio faktoreak ere garrantzitsuak dira, hala nola: *Klf2*, *Klf4*, *Klf5*, *Stella* (*Dppa3*), *Fgf4*, *Esrrb*, *Rex1* (*zfp42*), *Tfcp2l1*, eta *Tbx*. Faktore horiek guztiak ezinbestekoak dira zelula amek mugarik gabe euren burua berritzeko, eta garapen prozesuan zehar edozein zelula-motatan bereizteko gaitasuna eskura dezaten (Nichols & Smith, 2012; Yeo & Ng, 2012; Dean et al., 2016). Bigarrenik, zelula horien estatus epigenetikoa praktikoki hutsala izatea. Estatus epigenetikoaren maila baxuak mESCen ezaugarri karakteristikoa da, bai DNAREN metilazioari eta bai histonen eraldaketei dagokienez. Enbrioiak bi zelula dituenetik, haren ezarpena gauzatzen duen arte, *post-fertilization reprogramming* moduan ezagutzen den birprogramazio epigenetikoa jasaten du, non gametoek zekartzaten patroia epigenetikoa ezabatze orokor bat pairatzen duten (Oswald et al., 2000; Santos et al., 2002), eta mESC zelula horiek bi eraldaketa epigenetikoari dagokienez agertzen dituzten mailak, zelula somatikoekin edo diferentziatuekin konparatzen badugu, oso baxuak izaten dira (Sim et al., 2017; Shanak et al., 2020). Hirugarrenik eta azkenik, X kromosoma egoera aktibo batean mantentzea. Ugaztun emeetan, orokorrean, X kromosometako bat isilduta edukitzen dute X kromosomen dosia bikoitza saihesteko. Hala ere, mESCek aurretik birprogramazio epigenetikoa gauzatzen duten eta X kromosoma modu aktibo batean egotera pasatzen da, eta haren aktibitate bikoitza ezinbestekoa izaten da pluripotentziarako (Schulz et al., 2017).

5.2.1. Morfinak pluripotentziaren mantenua gauzatzen du *Yamanaka* faktoreen adierazpena doituz

Zelula barnean dauden geneen adierazpena arautzea ezinbestekoa da, pluripotenzia bultzatzen dituzten bidezidorrak aktibatuz. Transkripzio faktoreak esaterako, ezinbestekoak dira pluripotenzia hori eskuratzeko garaian. Morfinaren tratamendu kronikoak *Pou1f5* eta *Myc* faktoreen adierazpena handitzea eragiten du mESCtan

sustatzailean eragindako metilazio estatusaren modulazioaren bidez. Alderantziz, ezinbestekoak diren beste bi faktoreengan morfinak ez du inongo eraginik, *Sox2* eta *klf4* faktoreak, zehazki. Faktore horiek 2006. urtean Takahashi eta Yamanakak, sagu enbrioi-tako fibroblasto helduetatik iPSC-ak eratzeko saiakerak burutu zituztenean identifikatu zituzten gene gakoak dira eta *Yamanaka* faktore moduan ezagunak dira; lau faktore horien konbinazioaren gehikuntza nahikoa da zelula somatikoetatik zelula pluripotenteak eskuratzeko. Aipatu ditugun gene horiek adierazita daude enbrioi-tako ama zelula guztietan (ESC), eta zelula diferentziatuetan gene horien gainadierazpena bultzatuz gero, zelula horiek pluripotentzia eta autoberritze gaitasuna eskuratzen dute, bai saguan eta bai gizakian (Takahashi & Yamanaka, 2006).

POU5F1 eta SOX2 faktoreek pluripotentzia sareen transkripzio faktore klabe moduan funtzionatzen dute, pluripotentziarekin erlazionaturiko geneak aktibatuz (Tokuzawa et al., 2003; Tomioka et al., 2002; Okumura-Nakanishi et al., 2005). MYC, alderantziz, zelulen ugalketa eta biziraupen zelularra bultzatzen duen eta aski ezaguna den proto-onkogenea da, eta horrek zelulek duten ugaltzeko gaitasuna handitzen du (Cartwright et al., 2005). Azkenik, KLF4 faktorea, saguetako ES zeluletan LIF-STAT3 seinalez-tapen bidezidorreko (ingelesezko *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*; STAT3) itu entzima da, NANOG (ingelesezko *Homeobox Transcription Factor Nanog*) transkripzio faktorearen antzera. Aipagarria da, zelula somatikoen birprogramazioa gauzatu dezaketen lau gene horien adierazpen-aberrantea minbiziarekin zuzenean erlazionatua dagoela, eta hori lan ugari nabarmendu dute (Liu et al., 2013; Dufy et al., 2021; Farrugia et al., 2016).

SOX2, KLF4 eta MYC faktoreak, POU5F1 faktorearekin gertatzen ez den bezala, erredundanteak dira mESCen autoberritzea bultzatzeko garaian, horien funtzioak bestelako faktoreek ordezkatu ahal dituztelarik (Nakagawa et al., 2008). Morfinak *Klf2* genearen adierazpenaren igoera ekartzen duela ikusi genuenez, entzima hori KLF4 genearen ordez jokatzen ari dela deritzogu. Zenbait ikerketek familia bereko kideen arteko ordezkapen hori baieztatu dutenez (nakagawa et al., 2008), kasu honetan ere KLF4 faktorearen igoeraren ezaren aurrean, bere papera betetzen duena KLF2 faktorea dela esan dezakegu. Sox2 genearen kasuan ere ez genuen aldaketarik topatu, gure hipotesia kolokan geratzen delarik. Hala ere, iPSC zelulen birprogramatze prozesuaren eraginkortasunean eragiten duen faktore garrantzitsu bat estekimetro egoki bat dela azpimarratzen duten zenbait ikerketek (Papapetrou et al., 2009; Yamaguchi et al., 2010; Carey et al., 2011) POU5f1 eta SOX2 entzimen mailak kritikoak direla azpimarratu dute; POU5F1ren adierazpen altuak eta SOX2 genearen adierazpen baxuak kritikoak dira iPSCak eskuratzekoan efizientzia handia eskuratzeko (Papapetrou et al., 2009; Yamaguchi et al., 2010). Horrek, Sox2 genearen adierazpena ez handitzeak, mESC zelula horien

pluripotenzia mantentzea oztopatu beharrean, bultzatu egiten duela adierazten du. Hori guztia kontuan harturik, lau faktore horiek morfinak mESCek duten pluripotenziaren mantenuan positiboki eragiten dutela baieztatu dezakegu; faktoreen adierazpena modu zehatz batean doitzen ditu, eta hori ahalbidetzen duen mekanismo nagusia DNAREN metilazioa da.

5.2.2. Morfinak pluripotenziaren mantenua bultzatzen du estatus-epigenetikoa erregulatuz: DNA metilazioa eta PRC2 konplexu epigenetikoa

Estatus epigenetikoaren maila baxuak mESCen ezaugarri karakteristikoa da, bai DNAREN metilazioari eta bai histonen eraldaketei dagokienez. Enbrioia bi zelula dituenetik, haren ezarpena gauzatzen duen arte, *post-fertilization reprogramming* moduan ezagutzen den birprogramazio epigenetikoa jasaten du, eta bertan jatorri parental ezberdinetako patroien epigenetikoa ezabatu egiten da, DNAREN metilazioaren berratzte orokor baten bidez (Oswald et al., 2000; Santos et al., 2002). Histonetako eraldaketei dagokienez, genoma aitatiarrak aurkezten dituen mailak hutsalak izaten dira, espermatogenesian histonen gehiengo protaminengatik ordezkatuak izaten direlako nagusiki. Genoma amatiarrak, berriz, eraldaketa batzuk kontserbatzen badituzte ere, H3K27me3 eraldaketak mESCtan aurkezten dituen mailak baxuak izaten dira, oro har (Zhen et al., 2016). Ondorioz, mESC zelulaek agertzen duten estatus epigenetiko baxua enbrioiko zelula amen bereizgarria da (Sim et al., 2017; Shanak et al., 2020), eta horrek ahalbidetzen du haien pluripotenzia. Metilazio patroien berreskurapena mESCak diferentziazio prozesua hasten dutenean ematen da, eta prozesu horretan *de novo* metilazioa burutzen duten proteinek, DNMT3A eta DNMT3B metilasak, jokatzeko garrantzitsua da. Horiek, haien funtzioa bideratzen duen familia-kidearekin batera, DNMT3L entzimarekin, metilazio patroien berria ezartzen dute, zelula horien diferentziazio prozesua bideratuko duten aldaketa epigenetikoak ezarriz. Alderantziz, histonen eraldaketei dagokionez, H3K27me3 eraldaketaren berreskurapena, nahiko geldoa da beste eraldaketa epigenetikoekin konparatzen badugu. Esaterako, adierazpenari dagokionez funtzio pizgarria duen H3K4me3 eraldaketaren berreskurapena askoz azkarragoa da, eta mESC zelula horiek izaten dituzten mailak nahiko altuak izaten dira ordurako. Adierazpenaren erregulazio positiboa ekartzen duten eraldaketak garrantzitsuak dira pluripotenziazio ezinbestekoak diren faktoreen adierazpen sustatzeko mESCtan.

mESC zelulatan metilazioak duen estatusa baxua bada ere, MS/MS eta WGBS tekniken bidez eskuratutako datuek morfinak estatus hori are gehiago txikiagotzen duela adierazi dute, eta hori autoerregulazio mekanismo bat duen *Tet1* genearen adierazpenaren igoerak gauzatzen du, *Dnmt1* genearen adierazpenaren beheranzko erregulazioarekin batera. Bestalde, morfinak H3K27me3 eraldaketa katalizatzeaz arduratzen den PRC2 *polycomb* konplexuko EZH2 entziman metilazioak gidatutako adierazpenaren beheranzko erregulazioa bultzatzen du, eraldaketa epigenetiko horrek jada mESCtan aurkezten dituen maila baxuak baldintzatuz, eta, ondorioz, zelula amek duten pluripotentiaren mantenua bermatzen du. H3K27me3 eraldaketaren presentzia gakoa da; izan ere, iPSCak eskuratzeko protokoloak hobetzen aritu diren lanek genoma metilatutako histona errepresiboz beteta topatzen dela nabarmendu dute, eta, ondorioz, zelula somatikoek pluripotenzia eskuratzeko prozesua nabarmenki zailtzen du (Buganim et al., 2012). Horrek, pluripotentiaren indukzioan parte hartzen duten gene asko isilduta egotea ekartzen du (Soufi et al., 2012). Oztopo hori saihesteko histona desazetilasen inhibitzaileak proposatzen dira (Huangfu et al., 2008; Liang et al., 2010; Feng et al., 2009), kromatina irekitzeko eta transkripzioa bultzatzeko duten gaitasunarengatik, oro har.

Harrigarriki, *Dnmt3l* genea, *Mbd3* genearekin batera, morfinaren itu-gene garrantzitsuak direla behatu dugu mESCtan, haien adierazpena adierazgarriki handitzen direlarik morfinaren presentzian. Hasiera batean mESC zelulen metilazio patroien mantenuarekin eta berreskurapenarekin erlazionatu baditugu ere, hurrenez hurren, horien inguruan burutu diren ikerketa ezberdinek pluripotentiaren berreskurapenean funtzio gakoak bete ditzaketela adierazi dute. DNMT3L entzima, enbrioi goiztiarreak ES zelulak epiblastora diferentziatzen hasten direnean ematen den fasearekin erlazionatzen da, non *Dnmt3l* geneak adierazpenaren aktibazio iragankor bat jasaten duen (Takahashi et al., 2014). Birprogramazioaren inguruko lanetan behatu denez, prozesu horretan ere *Dnmt3l* genearen aktibazioa eman behar da (Cacchiarelli et al., 2015). Horregatik, baliteke metilazioak gauzatutako adierazpenaren igoera hori, mESC zelulen mantenuarekin erlazionatua egotea. MBD3 entzimaren kasuan, ordea, adierazpenaren igoera bat behatu badugu ere, igoera hori ez dago DNAREN metilazioarekin eta H3K27me3 eraldaketarekin erlazionatua. Hala ere, haren presentzia pluripotentiarenarekin positiboki erlazionatua dagoela nabarmendu duten ikerketa ugari daude (Jaffer et al., 2018; Zhang et al., 2016; dos Santos et al., 2014; Zhu et al., 2009).

5.2.3. Morfinak pluripotentiaren mantenua gauzatzen du X kromosoma egoera aktiboan mantenduz

Ugaztunon bizi ziklo osoan zehar, bi birprogramazio epigenetiko ditugu, eta horiek enbrioaren garapenean zehar ematen dira: zigotoaren ernalketa ondorengo faseetan (*post-fertilization reprogramming*), eta migrazio prozesuan dauden PGC zeluletan (*germline reprogramming*). Lehenengo kasuan, XCR prozesua enbrioia 2-4 zeluletako fasean dagoenean hasten da (Okamoto et al., 2005), eta horrekin batera X kromosomaren berraktibazioa gauzatzen da (XCR; ingelesezko *X chromosome reactivation*)(Pintacuda & Cerase, 2015), eta horrela irauten du mESC zelulak diferentziatzen hasten direnean ematen den XCI prozesu arte. Beraz, mESCEk egoera aktiboan izaten dituzte bi X kromosomak (Okamoto et al., 2005; Mak et al., 2004), eta horrek pluripotenti izaera ematen die zelula horiei (Wutz, 2011; Payer et al., 2013; Pasque & Plath, 2015).

XCI prozesua *Xist* lncRNAren gainadierazpenaren bidez hasten da (Marahrens et al., 1997; Penny et al., 1996); isilarazi behar den kromosoma RNA kate horrez inguratzen da, *cis* moduan, eta estaldura horrek gertaera errepresiboen kate edo ur-jauzi bat pizten du (Gendrel & Heard, 2014). *Xist*/tsix geneen paisaiek morfinarekiko ez du inongo aldaketarik sortzen mESCtan dauden *Xist*-en mailetan, ez duelarik XCIren hasierako faseko pausu horretan inongo eraginik. Hala eta guztiz ere, RNAseq analisiko datuek mESCtan *Xist* genearen adierazpen falta dagoela adierazi dute, beste ikerketa askok diferentziatu gabeko ESCEk adierazpen oso baxua dutela nabarmendu duten modu berean (Chaumeil et al., 2006; Payer & Lee, 2014; Maclary et al., 2014).

Morfinak *Xist*/*Tsix* geneen erregulazioan aldaketarik sortzen ez duela behatu badugu ere, *Tsix* lncRNAren adierazpenean ez delako inongo aldaketarik topatu funtsean, RNA horrek zelulan duen presentziaz gain bestelako mekanismo erregulatzailerik garrantzitsuak badaudela nabarmendu da (Nesterova et al., 2011; Navarro 2008). *Six* geneak, haren erregulaziorako gakoa den gune bat dauka 1.go introiean, NOS lotze-elementu moduan (ingelesezko *NOS binding element*) ezagutzen dena, eta bertan *Nanog*, *Oct4* (*Pou5f1*) eta *Sox2* faktoreak elkartzen dira haren adierazpena oztopatuz. Horrenbestez, *Tsix* RNA eta NOS lotze-elementua ezinbestekoak dira mESCtan *Xist* lncRNAren mailak hutsalak izaten jarraitu ahal izateko, eta horrenbestez, XCI prozesua hasi ez dadin eta mESCen pluripotentzia bere horretan mantendu dadin.

5.3. Morfinak XCI oztopatzen du memoria epigenetikorako gakoak diren prozesu erregulatzailen bidez

Errendimendu handiko sekuentziazio teknikekin burututako integrazio prozesuek SMCHD1 entzima azaleratu dute morfinaren itu-gene moduan; morfinak haren sustatzaileko patroia epigenetikoak aldatzen du, DNAREN metilazioaren eta H3K27me3 eraldaketan elkarrekintza medio, eta, ondorioz, haren adierazpena azpierregrulatuta geratzen da. SMCHD1 entzima *Structural Maintenance of Chromosomes* (SMC) proteina-familiako kide ez-kanonikoa da, eta gene autosomiko espezifikoen errepresio transkripzionala gauzatzen du zenbait inprontadun geneetan, klusterretan bildutako protokaderinetan (Chen et al., 2015; Gendrel et al., 2013; Leong et al., 2013; Mould et al., 2013) eta *Hox* geneetan (Chen et al., 2015), besteak beste. Hala ere, SMCHD1 entzimak duen eginkizun nagusia, ugaztunetako indibiduo emeetan ematen den X kromosomaren inaktibazio (XCI) da (Jansz et al., 2018; Gendrel et al., 2012). Prozesu horren azpi-mekanismo molekularrak guztiz ulertzen ez badira ere, SMCHD1 X kromosomaren isiltzea eragiten duen faktore errepresibo garrantzitsua da (Gendrel et al., 2012; Sakakibara et al., 2018; Jansz et al., 2018; Gdula et al., 2019; Kelsey et al., 2015, nozawa et al., 2013; Wang et al., 2018), eta haren absentsiak enbrioi emeen hilkortasuna handitzen du (Wutz, 2011; Augui et al., 2011; Lin et al., 2007; Senner & Brockdorff, 2009), eta haren funtzio desegokiak, aldiz, arazo ugari sortzen ditu genomak: irismen luzeko kromatina elkarrekintzetan aldaketak (Jansz et al., 2018; Wang et al., 2018), geneen aktibazio transkripzionala, CpG dinukleotidoen hipermetilazioa eta H3K27me3 eraldaketa epigenetikoaren galera (Sakakibara et al., 2018; Gdula et al., 2019), besteak beste.

Ugaztunetan ematen den XCI prozesu hori, garapen prozesuan zehar sexuen artean X kromosomaren dosia konpentsatzeko indibiduo emeetan ematen den kromatinaren isiltze prozesu arautua da (Chow & Heard, 2009; Lyon et al., 1961; Lee et al., 2011), eta birprogramazio epigenetikoaren amaieran ematen da. Hau da, blastozistoaren barne masako ESCak epiblastora diferentziatzen direnean ematen den prozesu bat XCI da. Behin prozesu hori amaitu eta gero, X kromosoma isila egonkortu egiten da, eta horrela mantenduko da aurrerantzean zatiketa mitotiko guztietan zehar, X kromosoma ez-aktiboaren epe luzeko oroimen bultzatuz. Xi mantenua bermatzen duen mekanismo horri oroimen epigenetiko deritzogu (Jansz et al., 2018; Gendrel & Heard, 2014; Gendrel et al.,

2012; Payer et al., 2011). Memoria epigenetiko zelularrekin lotuta dagoen XCI prozesua, haren mantentze-fasea, zehazki, morfinak *Smchd1* genean eragindako beheranzko erregulazioaren bidez oztopatua dagoela frogatu badugu ere, parte-hartzaile ugari daude eraginda prozesu osoan zehar; XCI prozesua sekuentziala da, eta pausu ugari ditu. Orokorrean bi fase nagusi ezberdintzen dira: hasiera fasea, non X kromosoma osoan zehar geneen isiltzea finkatzen den, eta mantentze fasea, non errepresio egoera hori egonkortzen den (Wutz, 2011).

XCI prozesua Xist lncRNAren gainadierazpenak hasten du, hala ere, *Polycomb* konplexuek gauzaturiko histonen eraldaketek gidaturiko konpartimendu errepresiboen eraketa ezinbestekoa da hasiera fasea amaitzeko. Lehendabizi, Xist lncRNAk gidatutako eta PRC1 konplexuak katalizatutako H2AK119ub eraldaketa ezartzen da, eta ondoren, PRC2 konplexuak H3K27me3 eraldaketarengatik ordezkutzen du aurrekoa (Zylicz et al., 2019; Zhao et al., 2008). Jada aipatu dugun moduan, PRC2 konplexuaren EZH2 entzima katalizatzailearen adierazpena murriztua dago morfinaren bidez, H3K27me3 eraldaketa mailak ere eraginda daudela iradokiz. Gauzatu ditugun *immunoblotting* azterketek morfinak H3K27me3 eraldaketa-maila globalen jaitsiera ekartzen duela berretsi badute ere (Muñoa-Hoyos et al., 2020), H2AK119ub eraldaketak ez du sentikortasunik morfinaren aurrean. Horrenbestez, morfina XCI prozesuaren hasiera-fasearen azken pausua oztopatzeko gai da soilik, eta hori DNAREN metilazioaren eta H3K27me3 eraldaketarekin gauzaturiko elkarrekintza baten bidez ematen da.

XCI hasiera-fasea amaitu eta gero, isilarazitako X kromosomaren mantentze-fasea ematen da, eta bertan DNAREN metilazioa ezinbestekoa da (Nesterova et al., 2008; Wutz et al., 2011; Lock et al., 1987; Sado et al., 2004). Saguetan buruturiko DNMT1 mutazio esperimenteriek Xi-an ematen diren metilazio akatsek enbrioien hilkortasuna handitzen dute (Sado et al., 2000), eta hori DNAREN metilazioak prozesu horretan duen garrantziaren adierazlea da. Gure X kromosomeko WGBS emaitzek, morfinaren presentzian baieztatu dugun *Dnmt1* genearen azpierregrulazioak eta TET1 demetilaren autoerregulazio positiboak X kromosoma horrek mESCtan dituen DNAREN metilazio mailak are gehiago jaisten dituela egiaztatu dute. DNA metilatuaren jaitsierak, SMCHD1 entzimak duen beheranzko erregulazioarekin batera; zelulen oroimen epigenetikoa konprometitzen dute, eta, ondorioz, mESC zelula horien memoria epigenetiko zelularra nabarmenki eraginez.

Bestalde, *Smchd1* isiltze esperimenteriek entzima horren absentziak *Dnmt1* genearen adierazpena baldintzatzen duela frogatu dute. Atzean dauden mekanismoak ezagutzen ez baditugu ere, bi entzimen beheranzko erregulazioak XCI prozesua oztopatzen dute, eta,

ondorioz, morfinak XCI prozesuaren mantentze-fasearen atzean dituen azpimekanismoak kaltetuak geratzen dira, mESCek duten oroimen epigenetiko zelularrean ere negatiboki eraginez. Edozein kasutan, orain arte *Dnmt1* genearen adierazpen-erregulazioa morfinak H3K27me3 eraldaketaren bidez sustatzailean eragindako modulazioaren bidez ematen dela behatu badugu ere, baliteke erregulazio horren atzean dauden mekanismoak uste baino konplexuagoak izatea; SMCHD1 entzimak, modu batera edo bestera, *Dnmt1* genearen beheheranzko erregulazioa eragiteko gai dela adierazten digute emaitzek, zuzenean edo zeharka. SMCHD1 entzimaren absentziak *Dnmt1* genean eragindako adierazpenaren erregulazio hori baieztatu duen ikerketarik ez badago ere, badago TET entzimen aktibitatearen igoerarekin erlazionatu izan duenik (Huang et al., 2021), antzekoa ondorio transkripzionala duen gertaera.

Hortaz, morfinak mESCen XCI prozesuan sorturiko aldaketa guztiak norabide berean doaz; XCI prozesuko mantentze-fasea gauzatzen duten eragile guztiak negatiboki eraginda geratzen dira, mESCtan Xi mantenurako ezinbestekoak diren oroimen epigenetiko zelularreko mekanismoak kaltetuz. Aurkikuntza horiek informazioa garrantzitsua ematen dute memoria epigenetiko zelularrearen azpian dauden mekanismo epigenetikoei inguruan, eta, ondorioz, belaunaldiz belaunaldiko herentzia baimentzen dituzten mekanismo molekularrak ulertzen hasteko oinarriak ezartzen laguntzen dute.

5.4. Ondorioak eta etorkizunerako aurreikuspenak:

Aldaketa epigenetikoak mitotikoki edota meiotikoki heredagarriak diren eta geneetan adierazpen aldaketak eragiten dituzten eraldaketak dira, eta aldaketa horiek kanpo faktoreen bidez eratuak izan daitezke. Orokorrean, aldaketa epigenetikoak ezabatzeko mekanismoak existitzen badira ere, zenbait kasutan mekanismo horietatik ihes egin eta denboran zehar irauteko gaitasuna dute, hurrengo belaunaldietara igarotzeko aukerak izanik. Hori dela eta, faktore horiek errealitatean duten inpaktua zenbaterainokoa den ulertzea eta ezagutzea interesgarria da oso, eta horrek izugarritzko garrantzia dauka gizarteko arlo ezberdinetan, eta bereziki medikuntzan eta osasunarekin zerikusia duten sektore guztietan. Dakigunez, morfinak albo efektu ugari ditu, eragin nabarmenak sortuz portaeran, dopamina-seinaleztapenean, plastikotasun sinaptikoan eta neurona-egituran

(Yohn et al., 2015). Horren adibideak ugariak dira, eta gainera, horietariko kasu batzuetan belaunaldi arteko herentzia bat behatu da, ondorio fenotipokoak belaunaldi ezberdinetan irauten dutelarik (Vassoler et al., 2014). Belaunaldietan zehar fenotipoetan emandako aldaketa horiek garunean emandako DNAREN metilazio eta histonen marken aldaketekin erlazionatu edo lotu dituzten ikerketak egon badaude ere, bestelako organo eta ehunetan duen eraginaren inguruko eta aldaketa horiek birprogramazio epigenetikoan duten eraginari buruzko ebidentziarik ez dago. Aitzitik, gure ikerketak morfinak dituen eragin sistemikoaren ikuspegi zabalago bat, eta are garrantzitsuagoa dena, birprogramazio epigenetikoan eta mESC zeluletan garrantzitsuak diren prozesu biologiko ezberdinetan, pluripotentzia kasu, izan dezakeen eragina aztertzean zentratu gara, gaiaren inguruko lehen ebidentziak gehituz.

6. ONDORIOAK

1. Morfinaren tratamendu kronikoak DNAREN metilazioaren jaitsiera eta hidroximetilazioaren igoera eragiten du mESCtan, zelulako erregulazio funtzio arruntekin, antolaketarekin, zatiketa mitotiko eta meiotikoarekin, DNAREN erreplikazioarekin, zelula amen mantenuarekin eta garapen prozesuarekin erlacionatutako geneen erregulazioan eraginez.
2. Morfinaren tratamendu kronikoak DNAREN metilazioaren eta hidroximetilazioaren desdoikuntza eragiten du saguetan, eragin epigenetikoak ezberdinak izanik ehun mota edo organo bakoitzean, baita sexuaren arabera ere. Beraz, morfinak *in vivo* dituen eragin zelular eta fisiologikoak sexuaren menpekoak eta sistemikoak dira.
3. Morfinak mESCtan eragindako DNAREN metilazioaren jaitsiera eta hidroximetilazioaren igoera erregulazio konplexuetan morfinaren eraginez emandako desdoikuntzen ondorioak dira. TET1 demetilasaren adierazpena handitzea ekartzen duen autoerregulazio positiboak, eta DNMT1 metilasaren inhibizioak zelula horien genomatik demetilazio prozesu globala eragiten du.
4. Morfinak mESCen pluripotentzia eta autoberritze gaitasunak mantentzen ditu DNAREN metilazioaren bidez, lehenik *Yamanaka* transkripzio-faktore gakoaren adierazpena doitzuz, bigarrenik genomatik estatus epigenetikoa arautuz, eta azkenik, X kromosoma biak egoera aktibo batean mantenduz.
5. Morfinak *Yamanaka* moduan ezagutzen diren faktoreen adierazpena doitzen du mESCtan, euren bereizgarria den pluripotentiaren mantenua bultzatuz. Horretarako, *Oct4*, *Myc*, eta *Klf4* faktorearen funtzio analogoa duen *Klf2* faktoreen adierazpenaren igoera eragiten du sustatzaileko metilazio estatusa modulatzuz.

6. Morfinak genomak duen estatus epigenetikoa murrizten du mESCtan, euren pluripotenziarako ezinbestekoa den DNA metilatuaren maila globalak jaitsiz, eta PRC2 *polycomb* konplexu epigenetikoan gakoa den EZH2 entzima katalitikoaren beheranzko erregulazioa bultzatuz.

7. Morfinak zelula pluripotenteen bereizgarria den X kromosomaren egoera aktiboa mantentzen du XCI prozesuari hasiera ematen dioten hasierako pausuak oztopatuz; prozesua hasteko ezinbestekoa den *Xist* lncRNAren adierazpena isilduta mantenduz, eta H3K27me3 eraldaketa epigenetikoaren mailak jaitsiz.

8. Morfinak XCI prozesua saihesten du mESCtan, PRC2 konplexu epigenetikoaren, DNMT1 metilasaren, eta X kromosoma isilduta mantentzen duen SMCHD1 entzimaren beheranzko erregulazioa modulatu. *Smchd1*, zelulen arteko memoriaren funtsezko arautzailea da, eta gainera, morfinarekiko sentikorra da saguetan eta gizakiotan, isiltze entseguek berretsi dutena. Horrez gain, sagu enbrioaren garapenean zehar eraginda mantentzen da, eta , ondorioz, memoria epigenetiko zelularrean eragin dezakeela aditzera eramaten gaitu.

7. BIBLIOGRAFIA

A

- Abdul QA, Yu BP, Chung HY, Jung H A, Choi JS. Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. *Arch. Pharm. Res.* 40, 1219-1237 (2017).
- Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC. Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. *Genes (Basel)* 5, 635-655 (2014).
- Afsharimani B, Doornebal CW, Cabot PJ, Hollmann MW, Parat MO. Comparison and analysis of the animal models used to study the effect of morphine on tumour growth and metastasis. *Br. J. Pharmacol.* 172 (2), 251–259 (2015).
- Agrawal N et al. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 657-685 (2003).
- Ahmad K, Henikoff S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* 9, 1191-1200 (2002).
- Ahmadian-Moghadam H, Sadat-Shirazi MS, Seifi F, Niknamfar S, Akbarabadi A, Toolee H, Zarrindast MR. Transgenerational influence of parental morphine exposure on pain perception, anxiety-like behavior and passive avoidance memory among male and female offspring of Wistar rats. *EXCLI J.* 18, 1019-1036 (2019).
- Ahuja YR, Sharma S, Mohan V. Cardiovascular diseases: Interplay of epigenetics. *Clin. Exp. Hypertens.* 39, 1-7 (2017).
- Akalin A, Kormaksson M, Li S, Garrett-Bakelman FE, Figueroa ME, Melnick A, Mason CE. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol.* 13(10), R87 (2012.) [Online]. Available: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/methylKit/inst/doc/methylKit.html>
- Akhmanova A, Miedema K, Hennig W. Identification and characterization of the *Drosophila* histone H4 replacement gene. *FEBS Lett.* 388, 219-222 (1996).
- Alabert C, et al. Domain model explains propagation dynamics and stability of histone H3K27 and H3K36 methylation landscapes. *Cell Rep.* 30, 1223–1234.e8 (2020).
- Alabert C, et al. Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes Dev.* 29, 585–590 (2015).
- Alberts B, et al. *Molecular Biology of the Cell* (2002).
- Albrizio M, Guaricci AC, Calamita G, Zarrilli A, Minoia P. Expression and immunolocalization of the mu-opioid receptor in human sperm cells. *Fertil. Steril.* 86, 1776-1779 (2006).
- Alexander RP, Fang G, Rozowsky J, Snyder M, Gerstein MB. Annotating non-coding regions of the genome. *Nat. Rev. Genet.* 11, 559-571 (2010).
- Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 115, 1363-1381 (2011).
- Allan, J., Harborne, N., Rau, D. C. & and Gould, H. Participation of core histone "tails" in the stabilization of the chromatin solenoid. *The Journal of Cell Biology* 93, 285-97 (1982).
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 51, 786–794

(1964).

- Allis C, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 17, 487–500 (2016).
- Almeida M, et al. PCGF3/5-PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science* 356, 1081-1084 (2017).
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990).
- Ambeskovic M, Roseboom TJ, Metz GAS. Transgenerational effects of early environmental insults on aging and disease incidence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2017).
- Ammon-Treiber S, Hollt V. Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict. Biol.* 10, 81-89 (2005).
- Amodeo AA, Jukam D, Straight AF, Skotheim JM. Histone titration against the genome sets the DNA-to-cytoplasm threshold for the *Xenopus* midblastula transition. *PNAS* 112, 1086–1095 (2015).
- An J, Rao A, Ko M. TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. *Exp Mol Med.* 49, e323 (2017).
- Andrews S. "Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data", [Bioinformatics.babraham.ac.uk](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk). (2010) [Online]. Available:<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Angelov D, et al. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* 11, 1033-1041 (2003).
- Anghel A, et al. Gene expression profiling following short-term and long-term morphine exposure in mice uncovers genes involved in food intake. *Neuroscience* 167, 554-566 (2010).
- Angst MS, Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology* 104 (3), 570–587 (2006).
- Annunziato AT. Assembling chromatin: the long and winding road. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 196-210 (2013).
- Annunziato AT. Split decision: what happens to nucleosomes during DNA replication? *J. Biol. Chem.* 280, 12065-12068 (2005).
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308, 1466-1469 (2005).
- Aoki F, Worrad DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 181, 296–307 (1997).
- Araujo LS, et al. Regulatory role of ALA-S and ALA-D in a haem-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Biol.* 44, 591-595 (1998).
- Aravin AA., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K. & Hannon, G. J. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 316, 744-747 (2007).
- Arber W, Dussoix D. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled

modification of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 5, 18-36 (1962).

- Arnaud P, Feil R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 75, 81-97 (2005).
- Arney KL, Bao S, Bannister AJ, Kouzarides T, Surani MA. Histone methylation defines epigenetic asymmetry in the mouse zygote. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 317–320 (2002).
- Arnold T. Beobachtungen über Kentheilungen in den Zellen der Geschwulste. *Virchows Arch.* 78, 279–301 (1879).
- Arya G, Maitra A, Grigoryev SA. A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27, 803-820 (2010).
- Ashburner M, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25-29 (2000). [Online]. Available: <http://geneontology.org/>
- Ashe A, et al. piRNAs Can Trigger a Multigenerational Epigenetic Memory in the Germline of *C. elegans*. *Cell* 150, 88–99 (2012).
- Atakan HB, Hof KS, Cornaglia M, et al. The Detection of Early Epigenetic Inheritance of Mitochondrial Stress in *C. Elegans* with a Microfluidic Phenotyping Platform. *Sci. Rep.* 9, 19315 (2019).
- Auclair G, Guibert S, Bender A, Weber M. Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse. *Genome Biol.* 15, 545 (2014).
- Augui S, Nora EP, Heard E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat. Rev. Genet.* 12, 429-442 (2011).
- Ausio J, Abbott DW. The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* 41, 5945-5949 (2002).

B

- Baamonde AI, Hidalgo A, Andres-Trelles F. Sex-related differences in the effects of morphine and stress on visceral pain. *Neuropharmacology* 28 (9), 967–970 (1989).
- Babenko O, Kovalchuk I, Metz GA. Epigenetic programming of neurodegenerative diseases by an adverse environment. *Brain Res.* 1444, 96-111 (2012).
- Back SE, Payne RL, Wahlquist AH, Carter RE, Stroud Z, Haynes L, Hillhouse M, Brady KT, Ling W, Comparative profiles of men and women with opioid dependence: results from a national multisite effectiveness trial. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 37 (5), 313–323 (2011).
- Bagijn MP, et al. Function, Targets, and Evolution of *Caenorhabditis elegans* piRNAs. *Science* 337, 574–578 (2012).
- Bali KK, Kuner R. Noncoding RNAs: key molecules in understanding and treating pain. *Trends Mol. Med.* 20, 437-448 (2014).
- Bao S, et al. Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 461, 1292-1295 (2009).
- Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Herault Y, Guillou F, Bourc'his D. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity.

Science 354, 909-912 (2016).

- Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6, a018382 (2014).
- Barrow TM, Byun HM, Li X, Smart C, Wang YX, Zhang Y, et al. The effect of morphine upon DNA methylation in ten regions of the rat brain. Epigenetics 12(12), 1038-1047 (2017).
- Barton SC, Surani MA, Norris M.L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. Nature 311, 374–376 (1984).
- Baulcombe D. RNA silencing in plants. Nature 431, 356-363 (2004).
- Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome –biological and translational implications. Nat. Rev. Cancer 11 (10), 726–734 (2011).
- Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 8, a019505 (2016).
- Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. Science 336, 233-237 (2012).
- Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. Genes Dev. 9, 2325–2334 (1995).
- Becker C, Weigel D. Epigenetic variation: origin and transgenerational inheritance. Curr. Opin. Plant Biol. 15, 562-567 (2012).
- Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature 405, 482–485 (2000).
- Bell JT, Spector TD. A twin approach to unraveling epigenetics. Trends Genet. 27, 116-125 (2011).
- Belmont AS. Mitotic chromosome structure and condensation. Curr. Opin. Cell Biol. 18, 632-638 (2006).
- Benedetti C, Brock C, Cleeland C, et al. NCCN practice guidelines for cancer pain. Oncology. 14, 135–50 (2000).
- Benetti N, Gouil Q, Tapia del Fierro A, Beck T, Breslin K, Keniry A, McGlenn E, Blewitt M. Maternal SMCHD1 regulates Hox gene expression and patterning in the mouse embryo. BioRxiv, 459528 (2021).
- Benito E, et al. RNA-Dependent Intergenerational Inheritance of Enhanced Synaptic Plasticity after Environmental Enrichment. Cell. Rep. 23, 546-554 (2018).
- Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature 447, 407-412 (2007).
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. Genes Dev. 23, 781–783 (2009).
- Bernstein, B. E., Meissner, A. & Lander, E. S. The mammalian epigenome. Cell 128, 669-681 (2007).
- Bertani G, Weigle JJ. Host controlled variation in bacterial viruses. J. Bacteriol. 65, 113-21

(1953).

- Bestor TH, Bourc'his D. Transposon silencing and imprint establishment in mammalian germ cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 69, 381-387 (2004).
- Bestor TH, Ingram VM. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80, 5559–5563 (1983).
- Bestor TH, Ingram VM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 5559–5563 (1983).
- Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1008-1016 (2007).
- Bhutani N, et al. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463, 1042–1047 (2010).
- Biliya S, Bulla LA. Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 235, 139-147 (2010).
- Billen D. Methylation of the bacterial chromosome: an event at the "replication point"? *J. Mol. Biol.* 31, 477-486 (1968).
- Binizskiewicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* 22(7), 2124–2135 (2002).
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6-21 (2002).
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396-398 (2007).
- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40, 91–99 (1985).
- Bird AP, Southern EM. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* 118, 27-47 (1978).
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209–213 (1986).
- Blewitt ME, et al. An N-ethyl-N-nitrosourea screen for genes involved in variegation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7629-7634 (2005).
- Blewitt ME, et al. SmcHD1, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. *Nat. Genet.* 40, 663-669 (2008).
- Blomen VA, Boonstra J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 27-44 (2011).
- Blower MD, Karpen GH. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat. Cell Biol.* 3, 730-739 (2001).
- Bodnar RJ. Endogenous Opiates and Behavior: 2018. *Peptides* 132, 170348 (2020).
- Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2016. *Peptides* 101, 167–212 (2018).
- Bogdanović O, Veenstra GJC. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549–565 (2009).

- Bohacek J, Mansuy IM. Epigenetic inheritance of disease and disease risk. *Neuropsychopharmacology* 38, 220-236 (2013).
- Bohacek J, Mansuy IM. Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours. *Nat. Rev. Genet.* 16, 641-652 (2015).
- Bond DM, Finnegan EJ. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends Plant Sci.* 12, 211-216 (2007).
- Bonnet J, et al. Quantification of proteins and histone marks in *Drosophila* embryos reveals stoichiometric relationships impacting chromatin regulation. *Dev. Cell* 51, 632–644.e6 (2019).
- Booth MJ, Marsico G, Bachman M, et al. Quantitative sequencing of 5-formylcytosine in DNA at single-base resolution. *Nat. Chem.* 6, 435–440 (2014).
- Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, et al. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat. Genet.* 42, 1093–1100 (2010).
- Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317, 1760–1764 (2007).
- Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96-99 (2004).
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS., Bollman, B. & Bestor, T.H. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536-2539 (2001).
- Boyer LA, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353 (2006).
- Brannan CI, Bartolomei MS. Mechanisms of genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 164-170 (1999).
- Brennecke J, et al. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* 322, 1387-1392 (2008).
- Brennecke J, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089-1103 (2007).
- Brockdorff N. Chromosome silencing mechanisms in X-chromosome inactivation: unknown unknowns. *Development* 138, 5057–5065 (2011).
- Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(11), 5709-5712 (1997).
- Brynildsen JK, Sanchez V, Yohn NL, Carpenter MD, Blendy JA. Sex-specific transgenerational effects of morphine exposure on reward and affective behaviors. *Behav Brain Res.* 395, 112842 (2020).
- Buchwitz BJ, Ahmad K, Moore LL, Roth MB, Henikof S. A histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature* 401, 547-548 (1999).
- Buckley BA, et al. A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality. *Nature* 489, 447–451 (2012).
- Buganim Y, et al. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* 150, 1209–1222 (2012).

- Buiting K, et al. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 571–577 (2003).
- Burgess RJ, Zhang Z. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 14–22 (2013).
- Burton NO, et al. Nuclear RNAi maintains heritable gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 19683–19688 (2011).
- Bygren L O, Kaati G, Edvinsson, S. Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. *Acta Biotheor.* 49, 53-59 (2001).
- Byrnes EM. Transgenerational consequences of adolescent morphine exposure in female rats: effects on anxiety-like behaviors and morphine sensitization in adult offspring. *Psychopharmacology (Berl)* 182, 537-544 (2005).
- Byrnes JJ, Babb JA, Scanlan VF, Byrnes EM. Adolescent opioid exposure in female rats: transgenerational effects on morphine analgesia and anxiety-like behavior in adult offspring. *Behav. Brain Res.* 218, 200-205 (2011).
- Byrnes JJ, Johnson NL, Carini LM, Byrnes EM. Multigenerational effects of adolescent morphine exposure on dopamine D2 receptor function. *Psychopharmacology (Berl)* 227, 263-272 (2013).
- Byrnes JJ, Babb JA, Scanlan VF, Byrnes EM. Adolescent opioid exposure in female rats: transgenerational effects on morphine analgesia and anxiety-like behavior in adult offspring. *Behav. Brain Res.* 218(1), 200-205 (2011).

C

- Cacchiarelli D, et al. Integrative analyses of human reprogramming reveal dynamic nature of induced pluripotency. *Cell* 162, 412–424 (2015).
- Cai Y, Zhang Y, Loh YP, Tng JQ, Lim MC, Cao Z, Raju A, Lieberman Aiden E, Li S, Manikandan L, Tergaonkar V, Tucker-Kellogg G, Fullwood MJ. H3K27me3-rich genomic regions can function as silencers to repress gene expression via chromatin interactions. *Nat Commun.* 12(1), 719 (2021).
- Calabi L. On Darwin's 'metaphysical notebooks'. II: "Metaphysics" and final cause. *Riv. Biol.* 94, 277-291 (2001).
- Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK. CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6481–6486 (2000).
- Campos EI, Stafford JM, Reinberg D. Epigenetic inheritance: histone bookmarks across generations. *Trends Cell Biol.* 24, 664-674 (2014).
- Candido J, Lutfy K, Billings B, Sierra V, Duttaroy A, Inturrisi CE, Yoburn BC. Effect of adrenal and sex hormones on opioid analgesia and opioid receptor regulation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42 (4), 685–692 (1992).
- Cao R, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039-1043 (2002).
- Cao R, Tsukada Y, Zhang Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol. Cell* 20, 845-854 (2005).
- Caputi FF, Carboni L, Rullo L, Alessandrini I, Balzani E, Melotti RM, Romualdi P, Candeletti

S, Fanelli A. An Exploratory Pilot Study of Changes in Global DNA Methylation in Patients Undergoing Major Breast Surgery Under Opioid-Based General Anesthesia. *Front Pharmacol.* 12, 733577 (2021).

- Carey BW, et al. Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 9, 588–598 (2011).
- Carlone DL, Lee JH, Young SR, et al. Reduced genomic cytosine methylation and defective cellular differentiation in embryonic stem cells lacking CpG binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 25(12), 4881–4891 (2005).
- Carninci P, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563 (2005).
- Cartwright P, et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885–896 (2005).
- Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 14, 100–112 (2013).
- Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157, 77-94 (2014).
- Cecil CAM, Walton E, Viding E. DNA Methylation, Substance Use and Addiction: a Systematic Review of Recent Animal and Human Research from a Developmental Perspective. *Curr Addict Rep* 2, 331–346 (2015).
- Celeste A, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927 (2002).
- Celeste A, et al. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* 5, 675-679 (2003).
- Chakrabarti S, Liu NJ, Zadina JE, Sharma T, Gintzler AR. Pleiotropic opioid regulation of spinal endomorphin 2 release and its adaptations to opioid withdrawal are sexually dimorphic. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 340 (1), 56–63 (2012).
- Chaumeil J, Le Baccon P, Wutz, A. & Heard, E. A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes Dev.* 20, 2223-2237 (2006).
- Chedin, F. The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Progress in molecular biology and translational science* 101, 255-285 (2011).
- Chedin, F., Lieber, M.R. & Hsieh, C.L. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16916-16921 (2002).
- Chen G, Schell JP, Benitez JA, et al. Single-cell analyses of X Chromosome inactivation dynamics and pluripotency during differentiation. *Genome Res.* 26(10), 1342-1354 (2016).
- Chen D, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-2177 (1999).
- Chen K, et al. Genome-wide binding and mechanistic analyses of Smchd1-mediated epigenetic regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E3535-44 (2015).
- Chen LL, Carmichael GG. Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs. *Curr.*

- Opin. Cell Biol. 22, 357-364 (2010).
- Chen Q, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* 351, 397–400 (2016).
 - Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat. Rev. Genet.* 17, 733–743 (2016).
 - Chen T, Dent SY. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat. Rev. Genet.* 15, 93-106 (2014).
 - Chen T, Li E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol* 60, 55-89 (2004).
 - Chen, T., Hevi, S., Gay, F. et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 39, 391-396 (2007).
 - Chen T, Ueda Y, Dodge JE, et al. Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5594–5605 (2003).
 - Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem* 277, 38746-38754 (2002).
 - Chen Y, Pal B, Visvader JE, Smyth GK. Differential methylation analysis of reduced representation bisulfite sequencing experiments using edgeR Version 2. *F1000Res.* 6, 2055 (2017). Published online 2018 Oct 8. doi: 10.12688/f1000research.13196.1. [Online]. Available: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>
 - Chen Z, Riggs AD. DNA Methylation and Demethylation in Mammals. *J. Biol. Chem.* 286, 18347–18353 (2011).
 - Cheng J, Guo S, Chen S, et al. An extensive network of TET2-targeting MicroRNAs regulates malignant hematopoiesis. *Cell Rep.* 5 (2), 471–481 (2013).
 - Chestier A, Yaniv M. Rapid turnover of acetyl groups in the four core histones of simian virus 40 minichromosomes. *PNAS* 76, 46-50 (1979).
 - Chim CS, Wan TS, Fung TK, et al. Methylation of TET2, CBL and CEBPA in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Pathol.* 63 (10), 942–946 (2010).
 - Cho S, Park JS, Kang YK. AGO2 and SETDB1 cooperate in promoter-targeted transcriptional silencing of the androgen receptor gene. *Nucleic Acids Res.* 42, 13545-13556 (2014).
 - Chorbov VM, Todorov AA, Lynskey MT, Cicero TJ. Elevated levels of DNA methylation at the OPRM1 promoter in blood and sperm from male opioid addicts. *J. Opioid Manag.* 7, 258-264 (2011).
 - Chow J, Heard E. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 359-366 (2009).
 - Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277, 1996-2000 (1997).

- Chuva de Sousa Lopes, SM, et al. X chromosome activity in mouse XX primordial germ cells. *PLoS Genet.* 4, e30 (2008).
- Cicero TJ, et al. Influence of morphine exposure during adolescence on the sexual maturation of male rats and the development of their offspring. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 1086-1093 (1991).
- Cicero TJ, Nock B, Meyer ER. Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 279 (2), 767–773 (1996).
- Cimmino L, Abdel-Wahab O, Levine RL, et al. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell* 9 (3), 193–204 (2011).
- Cleaton MA, Edwards CA, Ferguson-Smith AC. Phenotypic outcomes of imprinted gene models in mice: elucidation of pre- and postnatal functions of imprinted genes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 15, 93–126 (2014).
- Cogoni C, et al. Transgene silencing of the *ai-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 15, 3153-3163 (1996).
- Cokus SJ, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452, 215–219 (2008).
- Coleman RT, Struhl G. Causal role for inheritance of H3K27me3 in maintaining the OFF state of a *Drosophila* HOX gene. *Science* 356, eaai8236 (2017).
- Collins FS. What we do and don't know about 'race', 'ethnicity', genetics and health at the dawn of the genome era. *Nat. Genet.* 36, S13-5 (2004).
- Comb M, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L, Herbert E. Primary structure of the human Metand Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295, 663-666 (1982).
- Conine CC, Sun F, Song L, Rivera-Pérez JA, Rando OJ. Small RNAs gained during epididymal transit of sperm are essential for embryonic development in mice. *Dev. Cell* 46, 470–480.e3 (2018).
- Cooper S, et al. Jarid2 binds mono-ubiquitylated H2A lysine 119 to mediate crosstalk between Polycomb complexes PRC1 and PRC2. *Nature communications* 7, 13661, doi:10.1038/ncomms13661 (2016).
- Cooper DN, Taggart MH, Bird AP. Unmethylated domains in vertebrate DNA. *Nucleic Acids Res.* 11, 647–658 (1983).
- Cortessis VK, et al. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum. Genet.* 131, 1565-1589 (2012).
- Cosgrove MS, Wolberger C. How does the histone code work? *Biochem. Cell Biol.* 83, 468-476(2005).
- Crain SM, Shen KF. Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10540-10544 (1995).
- Crémisi C, Chestier A, Yaniv M. Assembly of SV40 and polyoma minichromosomes during replication. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42, 409–416 (1978).

- Cross SH, Bird AP. CpG islands and genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 309-314 (1995).
- Culp LA, Dore E, Brown GM. Methylated bases in DNA of animal origin. *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 73-79 (1970).
- Cusick ME, DePamphilis ML, Wassarman PM. Dispersive segregation of nucleosomes during replication of simian virus 40 chromosomes. *J. Mol. Biol.* 178, 249–271 (1984).
- Cuthbert GL, et al. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553 (2004).

D

- Darwin C, Burkhardt F, Secord J, & The Editors of the Darwin Correspondence Project, Eds.). *The Correspondence of Charles Darwin (The Correspondence of Charles Darwin)*. Cambridge: Cambridge University Press (1985).
- Davis TL, Trasler JM, Moss SB, Yang GJ, Bartolomei MS. Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* 58, 18-28 (1999).
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150, 12-27 (2012).
- Daxinger L, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers. *Genome Res.* 20, 1623-1628 (2010).
- De Castro Barbosa T, et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol. Metab.* 5, 184-197 (2015).
- de Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutierrez E, Llorente-Cortes V. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed)* 70, 763-769 (2017).
- De Koning L, Corpet A, Haber JE, Almouzni G. Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 997-1007 (2007).
- de la Cruz CC, et al. Developmental regulation of Suz 12 localization. *Chromosoma* 114, 183-192 (2005).
- De Vanssay A, et al. Paramutation in *Drosophila* linked to emergence of a piRNA-producing locus. *Nature* 490, 112–115 (2012).
- Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol.* 14(1), 93-100 (2003).
- Deans C, Maggert KA. What do you mean, "epigenetic"? *Genetics* 199, 887-896 (2015).
- Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022 (2011).
- Delaval K, Feil R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 188-195 (2004).
- Delhommeau F, Dupont S, Valle VD, et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *N. Engl. J. Med.* 360, 2289–2301 (2009).

- Denissov S, Hofemeister H, Marks H, et al. Mll2 is required for H3K4 trimethylation on bivalent promoters in embryonic stem cells, whereas Mll1 is redundant. *Development* 141, 526-537 (2014).
- Dickenson TH, Kieffer BL. Opiates-basic. In: McMahon, S.B., Koltzenburg, M. (Eds.), Wall & Melzack's Textbook of Pain 5th. Elsevier, London, UK (Chapter 27) Lamarck (2005).
- Dickson DA, et al. Reduced levels of miRNAs 449 and 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress. *Transl. Psychiatry* 8, 101 (2018).
- Dimitri P, et al. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118(4), 419-35 (2009).
- Dimitri P, Corradini N, Rossi F, Verni F. The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays* 27, 29-41 (2005).
- Ding F, Chaillet JR. In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14861-14866 (2002).
- Doehring A, Oertel BG, Sittl R & Lotsch J. Chronic opioid use is associated with increased DNA methylation correlating with increased clinical pain. *Pain* 154, 15-23 (2013).
- Doi A, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 41, 1350-1353 (2009).
- Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod. Toxicol.* 23, 297-307 (2007).
- Dolinoy DC, Weidman JR., Jirtle RL. Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. *Reprod. Toxicol.* 23, 297–307 (2006).
- Donkin I, et al. Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. *Cell Metab.* 23, 369–378 (2016).
- dos Santos RL, Tosti L, Radziskeuskaya A, Caballero IM, Kaji K, Hendrich B, Silva JC. MBD3/NuRD facilitates induction of pluripotency in a context-dependent manner. *Cell Stem Cell.* 15(1), 102-110 (2014).
- Duffy MJ, O'Grady S, Tang M, Crown J. MYC as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 94, 102154 (2021).
- Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology* 150, 4999-5009 (2009).
- Duymich CE, Charlet J, Yang X, Jones PA, Liang G. DNMT3B isoforms without catalytic activity stimulate gene body methylation as accessory proteins in somatic cells. *Nat Commun* 7, 11453 (2016).

E

- Ebrahimi G, et al. Elevated levels of DNA methylation at the OPRM1 promoter region in men with opioid use disorder. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 44, 193-199 (2018).
- Eichler EE. Recent duplication, domain accretion and the dynamic mutation of the human genome. *Trends Genet.* 17, 661-669 (2001).

- Elbashir SM, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (2001).
- Ernest S, Jankowski M, Mukaddam-Daher S, Cusson J, Gutkowska J. Altered regulation of natriuretic peptides in the rat heart by prenatal exposure to morphine. *J Physiol* 506 (Pt 3), 867–874. Pt 3. (1998).
- Esteller M: CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427-5440 (2002).
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 8 (4), 286–298 (2007).
- Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 12, 861-874 (2011).
- Estomba H, et al. Expression and Localization of Opioid Receptors in Male Germ Cells and the Implication for Mouse Spermatogenesis. *PLoS One* 11, e0152162 (2016).
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156 (1981).
- Evans MJ & Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156 (1981).

F

- Fabbri A, et al. Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J. Steroid Biochem.* 32, 145-150 (1989).
- Fan XY, Shi G, He XJ, Li XY, Wan YX, Jian LY. Oxytocin prevents cue-induced reinstatement of oxycodone seeking: Involvement of DNA methylation in the hippocampus. *Addict Biol.* 26(6), e13025 (2021).
- Fan Y, et al. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4559-4572 (2003).
- Fantz DA, Hatfield WR, Horvath G, Kistler MK, Kistler WS. Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 64, 425-431 (2001).
- Farrugia MK, Vanderbilt DB, Salkeni MA, Ruppert JM. Kruppel-like Pluripotency Factors as Modulators of Cancer Cell Therapeutic Responses. *Cancer Res.* 76(7), 1677-82 (2016).
- Farthing CR, et al. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet.* 4, e1000116 (2008).
- Fatemi M, et al. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Res.* 33, e176 (2005).
- Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat. Rev. Genet.* 15, 7-21 (2014).
- Feng B, Ng JH, Heng JC, Ng HH. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 301–312 (2009).
- Feng S, et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 8689–8694 (2010).

- Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330, 622-627 (2010).
- Ferguson-Smith, A. C. & Surani, M. A. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 293, 1086-1089 (2001).
- Fernandez-Capetillo O, et al. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell.* 4, 497-508 (2003).
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3, 959-967 (2004).
- Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473, 398-402 (2011).
- Filion, et al. Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal Chromatin Types in *Drosophila* Cells. *Cell* 143, 212-224 (2010).
- Finley D, Chau V. Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 25-69 (1991).
- Fish JL, Kosodo Y, Enard W, Pääbo S, Huttner WB. Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 10438-43 (2006).
- Fisher AG, Brockdorff N. Epigenetic memory and parliamentary privilege combine to evoke discussions on inheritance. *Development* 139, 3891-3896 (2012).
- Flórez Beledo J, Armijo Simón J, Mediavilla Martínez Á. *Farmacología humana*. Elsevier Masson, 1998 (1998).
- Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J.* 272, 3231-3240 (2005).
- Fournier C, Goto Y, Ballestar E, Delaval K, Hever AM, Esteller M, Feil, R. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO Journal* 21, 6560-6570 (2002).
- Fouse SD, Shen Y, Pellegrini M, et al. Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/ Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/ K27 trimethylation. *Cell Stem Cell* 2(2), 160-169 (2008).
- Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M. Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm. Res.* 65 Suppl 3, 50-58 (2006).
- Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, Benavente R. The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp. Cell Res.* 318, 1340-1346 (2012).
- Frias-Lasserre D, Villagra CA. The Importance of ncRNAs as Epigenetic Mechanisms in Phenotypic Variation and Organic Evolution. *Front. Microbiol.* 8, 2483 (2017).
- Fritsch L, et al. A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Mol. Cell* 37, 46-56 (2010).
- Froberg, J. E., Yang, L. & Lee, J. T. Guided by RNAs: X-inactivation as a model for lncRNA function. *J. Mol. Biol.* 425, 3698-3706 (2013).
- Fu X, Jin L, Wang X, et al. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is

regulated during pancreatic cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (44), 17892–17897 (2013).

- Fujita N, Shimotake N, Ohki I, et al. Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5107-5118 (2000).
- Fukuda K, et al. Activation of phospholipase A2 by the nociceptin receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Neurochem.* 71, 2186-2192 (1998).
- Fullston T, et al. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J.* 27, 4226–4243 (2013).
- Fullston T, Ohlsson-Teague EM, Print CG, Sandeman LY, Lane M. Sperm microRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of microRNAs Are Not Altered in Offspring's Sperm. *PLoS One* 11, e0166076 (2016).

G

- Gan H, et al. piRNA profiling during specific stages of mouse spermatogenesis. *Rna* 17, 1191–1203 (2011).
- Gangisetty O, Palagani A, Sarkar DK. Transgenerational inheritance of fetal alcohol exposure adverse effects on immune gene interferon- γ . *Clin Epigenetics* 12(1), 70 (2020).
- Gapp K, et al. Alterations in sperm long RNA contribute to the epigenetic inheritance of the effects of postnatal trauma. *Mol. Psychiatry* (2018).
- Gapp K, et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* 17, 667-669 (2014).
- Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* 17(5), 667-669 (2014).
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261–282. (1987).
- Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 36–47 (2011).
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of Tumors in Mice by Genomic Hypomethylation. *Science* 300, 489–492 (2003).
- Gautier F, Bunemann H, Grotjahn L. Analysis of calf-thymus satellite DNA: evidence for specific methylation of cytosine in C-G sequences. *Eur. J. Biochem.* 80, 175-183 (1977).
- Gdula MR, Nesterova TB, Pintacuda G, Godwin J, et al. The non-canonical SMC protein SmcHD1 antagonises TAD formation and compartmentalisation on the inactive X chromosome. *Nat Commun.* 10(1), 30 (2019).
- Gendrel AV, Heard E. Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 561-580 (2014).
- Gendrel AV, et al. Epigenetic functions of smchd1 repress gene clusters on the inactive X chromosome and on autosomes. *Mol. Cell. Biol.* 33, 3150-3165 (2013).
- Gendrel AV, et al. Smchd1-dependent and -independent pathways determine

developmental dynamics of CpG island methylation on the inactive X chromosome. *Dev. Cell.* 23, 265-279 (2012).

- Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94-108 (2009).
- Gilardi F, Augsburg M, Thomas A. Will Widespread Synthetic Opioid Consumption Induce Epigenetic Consequences in Future Generations? *Front. Pharmacol.* 9, 702 (2018).
- Gill ME, Erkek S, Peters AH. Parental epigenetic control of embryogenesis: a balance between inheritance and reprogramming? *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 387-396 (2012).
- Glanzmann C, Frey B, Vonbach P, Meier CR. Drugs as risk factors of acute kidney injury in critically ill children. *Pediatr. Nephrol.* 31 (1), 145–151 (2016).
- Gold M, Hurwitz J. The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. V. Purification and properties of the deoxyribonucleic acid-methylating activity of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239, 3858-65 (1964).
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635-638 (2007).
- Goodier JL, Kazazian HH. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 135, 23-35 (2008).
- Govorko, D., Bekdash, R. A., Zhang, C. & Sarkar, D. K. Male germline transmits fetal alcohol adverse effect on hypothalamic proopiomelanocortin gene across generations. *Biol. Psychiatry* 72, 378-388 (2012).
- Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A. Mechanism of Stimulation of Catalytic Activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem*, 280, 13341-13348 (2005).
- Grandjean V, et al. RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci. Rep.* 5, 18193 (2015).
- Grandjean V, et al. The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. *Development* 136, 3647–3655 (2009).
- Greer EL, Beese-Sims SE, Brookes E., Spadafora R, et al. A histone methylation network regulates transgenerational epigenetic memory in *C. elegans*. *Cell Rep.* 7(1), 113-26 (2014).
- Grentzinger T, et al. piRNA-mediated transgenerational inheritance of an acquired trait. *Genome Res.* 22, 1877–1888 (2012).
- Griffith J, Mahler H. DNA Ticketing Theory of Memory. *Nature* 223, 580–582 (1969).
- Gu SG, et al. Amplification of siRNA in *Caenorhabditis elegans* generates a transgenerational sequence-targeted histone H3 lysine 9 methylation footprint. *Nat Genet.* 44, 157–164 (2012).
- Gu TP, Elgin SC. Maternal depletion of Piwi, a component of the RNAi system, impacts heterochromatin formation in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 9, e1003780 (2013).
- Gu TP. et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 477, 606–610 (2011).

- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, et al. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77–88 (2007).
- Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 3-8 (2012).
- Guibert S, Forné T, Weber M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res.* 22, 633–641 (2012).
- Gunawardane LS, et al. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315, 1587-1590 (2007).
- Guo X, Wang L, Li J, Ding Z, et al. Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A. *Nature* 517, 640-644 (2015).

H

- Hackett JA, et al. Promoter DNA methylation couples genome-defence mechanisms to epigenetic reprogramming in the mouse germline. *Development* 139, 3623-3632 (2012).
- Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ, Murakami K, Lee C, et al. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* 339, 448–452 (2013).
- Hahn MA, Wu X, Li AX, Hahn T, Pfeifer GP. Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PLoS ONE* 6, e18844 (2011).
- Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, Lee C, Almouzni G, Schneider R, Surani MA. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*. 452(7189), 877-81 (2008).
- Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev.* 117(1-2), 15-23 (2002).
- Hall J, Guo G, Wray J, Eyres I, Nichols J, Grotewold L, Morfopoulou S, Humphreys P, Mansfield W, Walker R, et al. Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5, 597-609 (2009).
- Halley-Stott RP, Gurdon JB. Epigenetic memory in the context of nuclear reprogramming and cancer. *Brief Funct. Genomics* 12, 164-173 (2013).
- Hamidi T, Singh AK, Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics* 7, 247-265 (2015).
- Hammoud SS. et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473-478 (2009).
- Han H, et al. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4299–4310 (2011).
- Hanna CW, Taudt A, Huang J, Gahurova L, Kranz A, et al. MLL2 conveys transcription independent H3K4 trimethylation in oocytes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 73–82 (2018).
- Hannon GJ, Rivas FV, Murchison EP, Steitz JA. The expanding universe of noncoding RNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 551-564 (2006).
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, et al. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-

blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405, 486–489 (2000).

- Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, et al. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res.* 40, 4841–4849. (2012).
- Hashimoto H, Pais JE, Zhang X, et al. Structure of a *Naegleria* Tet-like dioxygenase in complex with 5-methylcytosine DNA. *Nature* 506, 391–395 (2014).
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 789-829(2006).
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129, 1983–1993 (2002).
- Haussecker D, et al. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA* 16, 673–695 (2010).
- Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell.* 146(4), 519-32 (2011).
- Hayashi K, Saitou M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 8(8), 1513-24 (2013).
- Hayashi K, Saitou M. Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. *Methods. Mol. Biol.* 1074, 175-83 (2013).
- He S, Sun H, Lin L, Zhang Y, Chen J, Liang L, Li Y, Zhang M, Yang X, Wang X, Wang F, Zhu F, Chen J, Pei D, Zheng H. Passive DNA demethylation preferentially up-regulates pluripotency-related genes and facilitates the generation of induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem.* 292(45), 18542-18555 (2017).
- He XJ, Chen T, Zhu JK. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res.* 21, 442-465 (2011).
- Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157, 95-109 (2014).
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* 7, 1395-402 (1988).
- Heitz E. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Botanik* 69, 762–818 (1928).
- Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 315, 1141–1143 (2007).
- Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6538-6547 (1998).
- Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, et al. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401, 301-304 (1999).
- Hendzel MJ, Lever MA, Crawford E, Th'ng JP. The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 20028-20034 (2004).

- Henikoff S, Ahmad K. Assembly of variant histones into chromatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 133-153 (2005).
- Henikoff S, Gready JM. Epigenetics, cellular memory and gene regulation. *Curr. Biol.* 26, R644- 8 (2016).
- Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA- (cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* 279, 48350–48359 (2004).
- Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M. et al. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev* 22, 1607-1616 (2008).
- Ho MK, et al. Breaking barriers in the genomics and pharmacogenetics of drug addiction. *Clin. Pharmacol. Ther.* 88, 779-791 (2010).
- Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226-232 (1975).
- Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 1, 76-80 (2006).
- Holtz NA, Carroll ME. Animal models of addiction: genetic influences. In: Gewirtz J., Kim YK. (eds) *Animal Models of Behavior Genetics. Advances in Behavior Genetics.* Springer, New York, NY (2016).
- Hon GC, Rajagopal N, Shen Y, et al. Epigenetic memory at embryonic enhancers identified in DNA methylation maps from adult mouse tissues. *Nat. Genet.* 45, 1198–1206 (2013).
- Hosseini F, Mohamad Soltani B, Baharvand H, Hosseinkhani S. Investigation of the Expression and the Effect of SPTBN4-miR1 in Process of Nerve Differentiation of NT2 Cells. *JMBS.* 10 (4), 609-615. (2019).
- Hotchkiss RD. The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 175, 315-332 (1948).
- Howman EV, et al. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1148-1153 (2000).
- Hsieh CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 19, 8211-8218 (1999).
- Hu JL, Zhou BO, Zhang RR, et al. The N terminus of histone H3 is required for de novo DNA methylation in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22187-22192 (2009).
- Hu L, Lu J, Cheng J, Rao Q, et al. Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nature* 527, 118–122 (2015).
- Hu S, Wan J, Su Y, et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife* 2, e00726 (2013).
- Huang C, Albon J, Ljubimov VA, Grant MB. Stem cells in the eye. *Principles of Tissue Engineering*, 1115-1133 (2020).
- Huang Z, Yu J, Cui W, Johnson BK, Kim K, Pfeifer GP. The chromosomal protein SMCHD1 regulates DNA methylation and the 2c-like state of embryonic stem cells by antagonizing TET proteins. *Sci Adv.* 7(4), eabb9149 (2021).

- Huang H, Jiang X, Li Z, et al. TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (29), 11994–11999 (2013).
- Huang X, Fejes Toth K, Aravin AA. piRNA biogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Trends Genet.* 33, 882–894 (2017).
- Huangfu D, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by smallmolecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26, 795–797 (2008).
- Hutter B, Helms V, Paulsen M. Tandem repeats in the CpG islands of imprinted genes. *Genomics* 88, 323-332 (2006).

I

- Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS. Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat. Res.* 647, 77-85 (2008).
- Illingworth RS, Bird AP. CpG islands “a rough guide”. *FEBS Lett.* 583, 1713–1720 (2009).
- Ingouff M, Hamamura Y, Gourgues M, Higashiyama T, Berger F. Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. *Curr. Biol.* 17, 1032–1037 (2007).
- Inoue A, Zhang Y. Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 609–616 (2014).
- Inoue A, Jiang L, Lu F, Suzuki T, Zhang Y. Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. *Nature* 547(7664), 419-424 (2017).
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* 41, 178–186 (2009).
- Islam AK, Cooper ML, Bodnar RJ. Interactions among aging, gender, and gonadectomy effects upon morphine antinociception in rats. *Physiol. Behav.* 54 (1), 45–53 (1993).
- Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 249, 101- 118 (2000).
- Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303 (2011).
- Iurlaro M, von Meyenn F, Reik W. DNA methylation homeostasis in human and mouse development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 43, 101–109 (2017).
- Iversen LL. Overview: peptides in the nervous system. In *Neuropeptides and Their Peptidases* (ed. Turner AJ). pp. 3–8. Chichester: Ellis Horwood Ltd (1987).
- Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1698–1710 (2009).

J

- Jablonka E, Raz G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.* 84(2), 131-76 (2009).

- Jackson M, Krassowska A, Gilbert N, et al. Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 24(20), 8862–8871 (2004).
- Jackson V, Chalkley R. Histone segregation on replicating chromatin. *Biochemistry* 24, 6930–6938 (1985).
- Jackson V, Granner DK, Chalkley R. Deposition of histones onto replicating chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 72, 4440–4444 (1975).
- Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, et al. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genet.* 27, 31–39 (2001).
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33 Suppl, 245-254 (2003).
- Jaffer S, Goh P, Abbasian M, Nathwani AC. Mbd3 Promotes Reprogramming of Primary Human Fibroblasts. *Int J Stem Cells.* 11(2):235-241 (2018).
- Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes (Basel)* 8(6), 148 (2017).
- Jansz N, et al. Smchd1 regulates long-range chromatin interactions on the inactive X chromosome and at Hox clusters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 766-777 (2018).935-6-19 (2013).
- Jason LJ, Moore SC, Lewis JD, Lindsey G, Ausio J. Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* 24, 166-174 (2002).
- Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem. Sci.* 39, 310-318 (2014).
- Jeltsch A, Jurkowska RZ. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res.* 44, 8556-8575 (2016).
- Jennissen HP. Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. *Eur. J. Biochem.* 231, 1-30 (1995).
- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 449, 248-251 (2007).
- Jiang FZ, Zheng W, Wu C, Li Y, Shen F, Liang J, Li M, Zhang JJ, Sui N. Double dissociation of inhibitory effects between the hippocampal TET1 and TET3 in the acquisition of morphine self-administration in rats. *Addict Biol.* 26(1), e12875 (2021).
- Jiang J, et al. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 353–360 (2008).
- Jin J, et al. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 30, 680-687 (2005).
- Johnson LM, Bostick M, Zhang X, et al. The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr. Biol.* 17, 379-84 (2007).
- Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* 15, 34–37 (1999).
- Jones P. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13, 484–492 (2012). DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg3230>

- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187-191 (1998).
- Jonkers I, et al. Xist RNA is confined to the nuclear territory of the silenced X chromosome throughout the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5583-5594 (2008).
- Jørgensen HF, Ben-Porath I, Bird AP. Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3387-3395 (2004).

K

- Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 682-688 (2002).
- Kaji K, Caballero IM, MacLeod R, Nichols J, Wilson VA, Hendrich B. The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 8(3), 285-92 (2006).
- Kakidani H, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298, 245-249 (1982).
- Kamakaka RT, Biggins S. Histone variants: deviants? *Genes Dev.* 19, 295-310 (2005).
- Kaneda M, Okano M, Hata K, et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429, 900-903 (2004).
- Kaneko S, Bonasio R, Saldaña-Meyer R, Yoshida T, Son J, Nishino K, Umezawa A, Reinberg D. Interactions between JARID2 and noncoding RNAs regulate PRC2 recruitment to chromatin. *Mol. Cell.* 53, 290-300 (2014).
- Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet.* 13, 444-449 (1997).
- Wreczycka K, Gosdschan A, Yusuf D, Gruning B, Assenov Y, Akalin A. Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. *Journal of Biotechnology*, Volume 261, Pages 105-115 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.007> [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617315936>
- Kato Y, Kaneda M, Hata K, et al. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2272-2280 (2007).
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40 (2000).
- Kazazian HH. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632 (2004).
- Kellermann NP. Epigenetic transmission of Holocaust trauma: can nightmares be inherited? *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 50, 33-39 (2013).
- Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14(6), 629-40 (1997).
- Kelsey AD, et al. Impact of flanking chromosomal sequences on localization and silencing by the human non-coding RNA XIST. *Genome Biol.* 16, 208-015-0774-2 (2015).

- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12, 996-1006 (2002).
- Kest B, Sarton E, Dahan A. Gender differences in opioid-mediated analgesia: animal and human studies. *Anesthesiology* 93 (2), 539–547 (2000).
- Ketting RF, et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654-2659 (2001).
- Kiefer JC. Epigenetics in development. *Dev. Dyn.* 236, 1144-1156 (2007).
- Kim YH, Pierscianek D, Mittelbronn M, et al. TET2 promoter methylation in low-grade diffuse gliomas lacking IDH1/2 mutations. *J. Clin. Pathol.* 64 (10), 850–852 (2011).
- Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434, 583-589 (2005).
- Kimura A, Matsubara K, Horikoshi M. A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J. Biochem.* 138, 647-662 (2005).
- Klein HU, Hebestreit, K. An evaluation of methods to test predefined genomic regions for differential methylation in bisulfite sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, 17(5), 796–807. (2015).
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31, 89-97 (2006).
- Klose RJ, Cooper S, Farcas AM. et al. Chromatin sampling. An emerging perspective on targeting polycomb repressor proteins. *PLoS Genet.* 9, e1003717 (2013).
- Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, et al. DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol. Cell* 19, 667-678 (2005).
- Ko M, An J, Bandukwala HS, Chavez L, et al. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature* 497, 122–126 (2013).
- Koch T, Hollt V. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol. Ther.* 117, 199-206 (2008).
- Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289-1291 (2007).
- Kornberg A, Zimmerman SB, Kornberg SR, Josse J. Ezymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. Influence of bacteriophage T2 on the synthetic pathway in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 45, 772-776 (1959).
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705 (2007).
- Kozlenkov A, Jaffe AE, Timashpolsky A, Apontes P, Rudchenko S, Barbu M, Byne W, Hurd YL., Horvath S, Dracheva S. DNA Methylation Profiling of Human Prefrontal Cortex Neurons in Heroin Users Shows Significant Difference between Genomic Contexts of Hyper- and Hypomethylation and a Younger Epigenetic Age. *Genes (Basel)*. 8(6), 152 (2017).
- Kreek MJ, LaForge KS, Butelman E. Pharmacotherapy of addictions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 710–726 (2002).
- Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in

Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929-30 (2009).

- Krishnamurti C, Rao SC. The isolation of morphine by Serturmer. *Indian J. Anaesth.* 60, 861-862 (2016).
- Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 27(11), 1571-2 (2011). doi: 10.1093/bioinformatics/btr167. [Online]. Available: https://rawgit.com/FelixKrueger/Bismark/master/Docs/Bismark_User_Guide.html#bismark-bisulfite-mapper
- Krueger F. Trim Galore!: a wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files. (2015). [Online]. Available: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
- Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, et al. Genome wide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* 4, e1000242 (2008).
- Kuramochi-Miyagawa S, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131, 839-849 (2004).

L

- Lalande M. Parental imprinting and human disease. *Annu. Rev. Genet.* 30, 173–195 (1996).
- Lamarck J. *Recherches sur l'organisation des corps vivans.* Paris Chez L'auteur, Maillard (1802).
- Lande-Diner L, Cedar H. Silence of the genes--mechanisms of long-term repression. *Nat. Rev. Genet.* 6, 648-654 (2005).
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921 (2001).
- Landolin JM, Johnson DS, Trinklein ND, et al. Sequence features that drive human promoter function and tissue specificity. *Genome Res.* 20, 890–898 (2010).
- Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, Reik W. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis.* Feb;35(2):88-93 (2003).
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357-359 (2012). [Online]. Available: <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>
- Langmead B, Wilks C, Antonescu V, Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics* 35, 421-432 (2019). [Online]. Available: <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>
- Lark C. Studies on the in vivo methylation of DNA in *Escherichia coli* 15T. *J. Mol. Biol.* 31, 389-399 (1968).
- Latham KE. Stage-specific and cell type-specific aspects of genomic imprinting effects in mammals. *Differentiation* 59, 269-282 (1995).
- Laurent L, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation.

Genome Res. 20, 320–331 (2010).

- Law BK, et al. Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and downregulation of c-myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 275, 38261- 38267 (2000).
- Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11, 204-220 (2010).
- Law PY, Loh HH, Wei LN. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 300-311 (2004).
- Le T, Kim KP, Fan G, Faull KF. A Sensitive Mass Spectrometry Method for Simultaneous Quantification of DNA Methylation and Hydroxymethylation Levels in Biological Samples. *Anal. Biochem.* 412, 203–209 (2011).
- Lee HC, et al. *C. elegans* piRNAs Mediate the Genome-wide Surveillance of Germline Transcripts. *Cell* 150, 78–87 (2012.)
- Lee J, et al. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129, 1807-1817 (2002).
- Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science* 338, 1435-1439 (2012).
- Lee JT. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 815-826 (2011).
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat. Genet.* 21, 400-404 (1999).
- Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 284-295 (2007).
- Lei H, Oh SP, Okano M, et al. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122, 3195-3205 (1996).
- Leitch HG, McEwen KR, Turp A, Encheva V, Carroll T, Grabole N, Mansfield W, Nashun B, Knezovich JG, Smith A, Surani MA, Hajkova P. Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat Struct Mol Biol.* 20(3), 311-6 (2013).
- Leitch HG, McEwen KR, Turp A, et al. Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 311–316 (2013).
- Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 863-868 (2009).
- Leong HS, et al. Epigenetic regulator Smchd1 functions as a tumor suppressor. *Cancer Res.* 73, 1591-1599 (2013).
- Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865-873 (1992).
- Lewis JD, et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69, 905-914 (1992).
- Li Y, Li H, Zhou L. EZH2-mediated H3K27me3 inhibits ACE2 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 526(4), 947-952 (2020).

- Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a019133 (2014).
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662-673 (2002).
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926 (1992).
- Li H, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079 (2009). [Online]. Available: <http://samtools.sourceforge.net/>
- Li Z, Zhu WG. Targeting histone deacetylases for cancer therapy: from molecular mechanisms to clinical implications. *Int. J. Biol. Sci.* 10, 757–770 (2014).
- Liang L, Chen J, Li Y, Lai X, Sun H, Li C, Zhang M, Yang T, Meng F, Law PY, Loh HH, Zheng H. Morphine and Naloxone Facilitate Neural Stem Cells Proliferation via a TET1-Dependent and Receptor-Independent Pathway. *Cell Rep.* 30(11), 3625-3631.e6 (2020).
- Liang, G., Taranova, O., Xia, K. & Zhang, Y. Butyrate promotes induced pluripotent stem cell generation. *J. Biol. Chem.* 285, 25516–25521 (2010).
- Liao J, Karnik R, Gu H, et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* (2015).
- Lin H, et al. Dosage compensation in the mouse balances up-regulation and silencing of X-linked genes. *PLoS Biol.* 5, e326 (2007).
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715 (1993).
- Lintern-Moore S, Supasri Y, Pavasuthipaisit K, Sobhon P. Acute and chronic morphine sulfate treatment alters ovarian development in prepuberal rats. *Biol. Reprod.* 21, 379-383 (1979).
- Lister R, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322 (2009).
- Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. *Chin J Cancer.* 32(9), 483-7 (2013).
- Liu J, Yu C, Doherty TM, Akbari O, Allard P, Rehan VK. Perinatal nicotine exposure-induced transgenerational asthma: Effects of reexposure in F1 gestation. *FASEB J.* 34(9), 11444-11459 (2020).
- Liu L, Luo T, Dong H, et al. Genome-Wide DNA Methylation Analysis in Male Methamphetamine Users With Different Addiction Qualities. *Front Psychiatry* 11, 588229 (2020).
- Liu P, Liang J, Jiang F, Cai W, Shen F, Liang J, Zhang J, Sun Z, Sui N. Gnas Promoter Hypermethylation in the Basolateral Amygdala Regulates Reconsolidation of Morphine Reward Memory in Rats. *Genes (Basel).* 13(3), 553 (2022).
- Liu HY, et al. The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *EMBO J.* 17, 1096-106 (1998).
- Liu X, Gao Q, Li P, Zhao Q, Zhang J, Li J, Koseki H, Wong J. UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9.

Nat. Commun. 4, 1563 (2013).

- Liu Y, Han Y, Zhou L, Pan X, Sun X, Liu Y, Lu Y. A comprehensive evaluation of computational tools to identify differential methylation regions using RRBS data. *Genomics* (2020).
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408 (2001).
- Lock LF, Takagi N, Martin GR. Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell* 48, 39-46 (1987).
- Loguinov AV, Anderson LM, Crosby GJ, Yukhananov RY. Gene expression following acute morphine administration. *Physiol. Genomics* 6, 169-181 (2001).
- Loh CH, van Genesen S, Perino M, Bark MR, Veenstra GJC. Loss of PRC2 subunits primes lineage choice during exit of pluripotency. *Nat Commun.* 12(1):6985 (2021).
- Loh YH, Ng JH, Ng HH. Molecular framework underlying pluripotency. *Cell Cycle.* 7(7), 885-91 (2008).
- Long HK, Blackledge NP, Klose RJ. ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 727-740 (2013).
- Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br. J. Cancer* 98, 1881-1885 (2008).
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495-499 (1977).
- Lorenzo P, Ladero JM, Leza JC, Lizasoain I. Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación. Madrid: Editorial Panamericana (1999).
- Lou LG, Zhang Z, Ma L, Pei G. Nociceptin/orphanin FQ activates mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells expressing opioid receptor-like receptor. *J. Neurochem.* 70, 1316- 1322 (1998).
- Loyola A, Bonaldi T, Roche D, Imhof A, Almouzni G. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol. Cell* 24, 309-316 (2006).
- Lu F, Liu Y, Jiang L, Yamaguchi S, Zhang Y. Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation. *Genes Dev.* 28, 2103-2119 (2014).
- Lucifero D, et al. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.* 75, 531-538 (2006).
- Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, Bestor TH, Trasler JM. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 79, 530-538 (2002).
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260 (1997).
- Lumey LH, Stein AD, Susser E. Prenatal famine and adult health. *Annu. Rev. Public Health* 32, 237-262 (2011).
- Luria SE, Human ML. A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J. Bacteriol.* 64, 557-69 (1952).
- Lutz BM, Bekker A, Tao YX. Noncoding RNAs: new players in chronic pain. *Anesthesiology*

121, 409-417 (2014).

- Lyko F, Ramsahoye BH, Kashevsky H, Tudor M, et al. Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. *Nat Genet* 23, 363-366 (1999).
- Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372- 373 (1961).
- Lyst MJ, Ekiert R, Ebert DH, et al. Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor. *Nature neuroscience* 16, 898–902 (2013).

M

- Maatouk DM, Kellam LD, Mann MRW, et al. DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development* 133, 3411–3418 (2006).
- MacAlpine DM, Almouzni G. Chromatin and DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5, a010207 (2013).
- Maclary E, et al. Differentiation-dependent requirement of Tsix long non-coding RNA in imprinted X-chromosome inactivation. *Nat. Commun.* 5, 4209 (2014).
- Mafra F, D’Angelo GC, Torres S, Amaro da Silva V. Opioid system manipulation during testicular development: Results on sperm production and sertoli cells population May 2011. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 33(2) (2011).
- Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine POTENTIAL IMPLICATIONS FOR ACTIVE DEMETHYLATION OF CpG SITES. *J. Biol. Chem.* 286, 35334–35338 (2011).
- Mak W, et al. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303, 666-669 (2004).
- Malik HS, Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* 10, 882-891 (2003).
- Mang T, Kleinschmidt-Doerr K, Ploeger F, Schoenemann A, Lindemann S, Gigout A. BMPR1A is necessary for chondrogenesis and osteogenesis, whereas BMPR1B prevents hypertrophic differentiation. *J Cell Sci.* 133(16), jcs246934 (2020).
- Mao YS, Sunwoo H, Zhang B, Spector DL. Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* 13, 95-101 (2011).
- Marahrens Y, Panning B, Dausman J, Strauss W, Jaenisch R. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev.* 11, 156-166 (1997).
- Margot JB, Ehrenhofer-Murray AE, Leonhardt H. Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Mol. Biol.* 4, 7 (2003).
- Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-349 (2011).
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 163-176 (2005).

- Martianov I, et al. Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2808-2813 (2005).
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7634–7638 (1981).
- Mastrototaro G, Zaghi M, Sessa A. Epigenetic Mistakes in Neurodevelopmental Disorders. *J. Mol. Neurosci.* 61, 590-602 (2017).
- Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 14 Spec No 1, R121-32 (2005).
- Maute RL, et al. tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 1404–1409 (2013).
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501–502 (2000).
- Maze I, et al. Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3035-3040 (2011).
- McCarrey JR, Dilworth DD. Expression of Xist in mouse germ cells correlates with Xchromosome inactivation. *Nat. Genet.* 2, 200-203 (1992).
- McClung CA, Nestler EJ, Zachariou V. Regulation of gene expression by chronic morphine and morphine withdrawal in the locus ceruleus and ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 25, 6005-6015 (2005).
- McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37, 179–183 (1984).
- McHugh RK, Devito EE, Dodd D, Carroll KM, Potter JS, Greenfield SF, Connery HS, Weiss RD. Gender differences in a clinical trial for prescription opioid dependence. *J. Subst. Abuse Treat.* 45 (1), 38–43 (2013).
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454(7205), 766–770 (2008).
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10, 155-159 (2009).
- Mersfelder EL, Parthun MR. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Res.* 34, 2653-2662 (2006).
- Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 28, 812–828 (2014).
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553–560 (2007).
- Minami M, Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* 23, 121-145 (1995).
- Mirouze M. The small RNA-based odyssey of epigenetic information in plants: from cells

to species. *DNA Cell Biol.* 31, 1650-1656 (2012).

- Mohn F, Weber M, Rebhan M, et al. Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors. *Mol. Cell* 30, 755–766 (2008).
- Mollereau C, et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 341, 33-38 (1994).
- Monk D, et al. Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6623-6628 (2006).
- Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99, 371–382 (1987).
- Moosavi A, Motevalizadeh Ardekani A. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran. Biomed. J.* 20, 246-258 (2016).
- Morgan CP, Bale TL. Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in second-generation offspring via the paternal lineage. *J. Neurosci.* 31, 11748-11755 (2011).
- Morgan MM, Christie MJ. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br. J. Pharmacol.* 164 (4), 1322–1334 (2011).
- Moris N, Pina C, Arias AM. Transition states and cell fate decisions in epigenetic landscapes. *Nat Rev Genet.* 17, 693-703 (2016).
- Morita S, Horii T, Kimura M, et al. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (7), 14647–14658 (2013).
- Mould AW, et al. *Smchd1* regulates a subset of autosomal genes subject to monoallelic expression in addition to being critical for X inactivation. *Epigenetics Chromatin* 6, 19-8935-6-19 (2013).
- Mraheil MA, et al. Comparative genome-wide analysis of small RNAs of major Gram-positive pathogens: from identification to application. *Microb. Biotechnol.* 3, 658-676 (2010).
- Mraz M, et al. MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119, 2110-2113 (2012).
- Muka T, et al. The role of epigenetic modifications in cardiovascular disease: A systematic review. *Int. J. Cardiol.* 212, 174-183 (2016).
- Muñoa I, Urizar I, Casis L, Irazusta J, Subirán N. The epigenetic regulation of the opioid system: new individualized prompt prevention and treatment strategies. *J Cell Biochem.* 116(11), 2419-26 (2015).
- Muñoa-Hoyos I, Halsall JA, Araolaza M, Ward C, Garcia I, Urizar-Arenaza I, Gianzo M, Garcia P, Turner B, Subirán N. Morphine leads to global genome changes in H3K27me3 levels via a Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) self-regulatory mechanism in mESCs. *Clin Epigenetics.* 12(1), 170 (2020).
- Musialik E, Bujko M, Wypych A, et al. TET2 promoter DNA methylation and expression analysis in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Rep.* 6 (1), 5333 (2014).

- Muto M, Kanari Y, Kubo E, et al. Targeted disruption of Np95 gene renders murine embryonic stem cells hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks. *J Biol Chem* 277, 34549-34555 (2002).

N

- Nafee TM, Farrell WE, Carroll WD, Fryer AA, Ismail KM. Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG* 115, 158-168 (2008).
- Nagarajan P, et al. Histone acetyl transferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4. *PLoS Genet.* 9, e1003518 (2013).
- di M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106 (2008).
- Nakamura K, et al. H4K20me0 recognition by BRCA1-BARD1 directs homologous recombination to sister chromatids. *Nat. Cell Biol.* 21, 311–318 (2019).
- Nakamura T, et al. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486, 415-419 (2012).
- Nakanishi S, et al. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278, 423-427 (1979).
- Nakatani T. Opioid therapy and management of side effects associated with opioids. *Gan To Kagaku Ryoho* 44 (4), 294–297 (2017).
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389 (1998).
- Nathan D, et al. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.* 20, 966-976 (2006).
- Navarro P, Chambers I, Karwacki-Neisius V, Chureau C, Morey C, Rougeulle C, Avner P. Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science.* 321(5896):1693-5 (2008).
- Nesterova TB, Senner CE, Schneider J, et al. Pluripotency factor binding and Tsix expression act synergistically to repress Xist in undifferentiated embryonic stem cells. *Epigenetics Chromatin.* 4(1), 17 (2011).
- Nesterova TB, et al. Dicer regulates Xist promoter methylation in ES cells indirectly through transcriptional control of Dnmt3a. *Epigenetics Chromatin* 1, 2-8935-1-2 (2008).
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* 23, 58-61 (1999).
- Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell. Cycle* 7, 1173-1177 (2008).
- Ng SF, et al. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467, 963-966 (2010).
- Nguyen CT, Gonzales FA, Jones PA. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 4598–4606 (2001).

- Nichols J, Smith A. Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(8), a008128 (2012).
- Nielsen DA, et al. Ethnic diversity of DNA methylation in the OPRM1 promoter region in lymphocytes of heroin addicts. *Hum. Genet.* 127, 639-649 (2010).
- Nielsen DA, et al. Increased OPRM1 DNA methylation in lymphocytes of methadone-maintained former heroin addicts. *Neuropsychopharmacology* 34, 867-873 (2009).
- Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, et al. Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature* 502, 249-253 (2013).
- Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 460, 118–122 (2009).
- Novikova SI, He F, Bai J, Cutrufello NJ, Lidow MS, Undieh AS. Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring. *PLoS One.* 3(4), e1919 (2008).
- Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.* 20, 214-220 (2004).
- Nozawa RS, Nagao K, Igami KT, Shibata S, Shirai N, et al. Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 566–573 (2013).

O

- Oertel BG, et al. Genetic-epigenetic interaction modulates mu-opioid receptor regulation. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4751-4760 (2012).
- Ohsawa R, Seol JH, Tyler JK. At the intersection of non-coding transcription, DNA repair, chromatin structure, and cellular senescence. *Front. Genet.* 4, 136 (2013).
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303, 644-649 (2004).
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257 (1999).
- Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19, 219-220 (1998).
- Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280, 5307–5317 (2005).
- Olins AL, Olins DE. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-332 (1974).
- Oliveros JC. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams (2007-2015). [Online]. Available: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Olivieri D, Senti KA, Subramanian S, Sachidanandam R, Brennecke J. The cochaperone shutdown defines a group of biogenesis factors essential for all piRNA populations in *Drosophila*. *Mol. Cell* 47, 954-969 (2012).
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448, 714-717 (2007).

- Ooi SL, Henikoff S. Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 257–65 (2007).
- Osley MA. Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation. *Brief Funct. Genomic Proteomic* 5, 179-189 (2006).
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol.* 10, 475–478 (2000).
- Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, et al. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX/DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep* 10, 1235-1241 (2009).
- Ottiger HP, Hübscher U. Mammalian DNA polymerase alpha holoenzymes with possible functions at the leading and lagging strand of the replication fork. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3993-3997 (1984).

P

- Painter RC, et al. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG* 115, 1243-1249 (2008).
- Painter TS. A Comparison of the Chromosomes of the Rat and Mouse with Reference to the Question of Chromosome Homology in Mammals. *Genetics* 13: 180-189 (1928).
- Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9630-9645 (2004).
- Palmer DK, O'Day K, Trong HL, Charbonneau H, Margolis RL. Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3734-3738 (1991).
- Palmer DK, O'Day K, Wener MH, Andrews BS Margolis RL. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J. Cell Biol.* 104, 805-815 (1987).
- Pang TYC, Short AK, Bredy TW, Hannan AJ. Transgenerational paternal transmission of acquired traits: Stress-induced modification of the sperm regulatory transcriptome and offspring phenotypes. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 14, 140-147 (2017).
- Panning B, Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev.* 10(16), 1991-2002 (1996)
- Paoloni-Giacobino A, D'Aiuto L, Cirio MC, Reinhart B, Chaillet JR. Conserved features of imprinted differentially methylated domains. *Gene* 399, 33-45 (2007).
- Papapetrou EP, et al. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 12759–12764 (2009).
- Papp B, Plath K. Epigenetics of Reprogramming to Induced Pluripotency. *Cell* 152, 1324-1343 (2013).
- Parveen P, Brundavani K, Mahathi K, Bhavani M, Sultana S. Gene Silencing and DNA Methylation. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* (ISSN 2321)

2748, 544-555 (2014).

- Pasque V, Plath K. X chromosome reactivation in reprogramming and in development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 37, 75-83 (2015).
- Pasternak GW. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin. Neuropharmacol.* 16 (1), 1–18 (1993).
- Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 341–356 (2013).
- Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics* 9, 823-828 (2014).
- Payer B, Lee JT. Coupling of X-chromosome reactivation with the pluripotent stem cell state. *RNA Biol.* 11, 798-807 (2014).
- Payer B, et al. Tsix RNA and the germline factor, PRDM14, link X reactivation and stem cell reprogramming. *Mol. Cell* 52, 805-818 (2013).
- Payer B, Lee JT, Namekawa SH. X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. *Hum. Genet.* 130, 265-280 (2011).
- Pellegrino S, Michelena J, Teloni F, Imhof R, Altmeyer M. Replication-coupled dilution of H4K20me2 guides 53BP1 to pre-replicate chromatin. *Cell Reports* 19, 1819-1831 (2017).
- Peng H, et al. A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm. *Cell Res.* 22, 1609–1612 (2012).
- Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature.* 379(6561), 131-7 (1996).
- Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379, 131-137 (1996).
- Pereira L, Yi F, Merrill BJ. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol.* 26(20), 7479-91 (2006).
- Perneger TV, Klag MJ, Whelton PK. Recreational drug use: a neglected risk factor for end-stage renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 38 (1), 49–56 (2001).
- Pesavento JJ, Yang H, Kelleher NL, Mizzen CA. Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 28, 468–486 (2008).
- Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14, R546-51 (2004).
- Pfaffeneder T, Hackner B, Truss M, et al. The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50, 7008–7012 (2011).
- Pintacuda G, Cerase A. X Inactivation Lessons from Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell. Rev.* 11, 699-705 (2015).
- Plath K, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300, 131-135 (2003).
- Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 136, 629-641 (2009).

- Popp C, et al. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101–1105 (2010).
- Pospelov V, Russev G, Vassilev L, Tsanev R. Nucleosome segregation in chromatin replicated in the presence of cycloheximide. *J. Mol. Biol.* 156, 79–91 (1982).
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts R.J. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol. Chem.* 274, 33002-33010 (1999).
- Prak ET, Kazazian HH. Mobile elements and the human genome. *Nat. Rev. Genet.* 1, 134-144 (2000).
- Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 192-206 (2009).
- Przewlocki R. Opioid abuse and brain gene expression. *Eur. J. Pharmacol.* 500 (1–3), 331–349 (2004).
- Ptashne M. Epigenetics: core misconception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7101-7103 (2013).

Q

- Qin W, Wolf P, Liu N, Link S, et al. DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Res* 25, 911-929 (2015).
- Quintero-Ronderos P, Montoya-Ortiz G. Epigenetics and autoimmune diseases. *Autoimmune Dis.* 2012, 593720 (2012).

R

- Raiber EA, Beraldi D, Ficiz G, et al. Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase. *Genome Biol.* 13, R69 (2012).
- Rajakumara E, Wang Z, Ma H, et al. PHD finger recognition of unmodified histone H3R2 links UHRF1 to regulation of euchromatic gene expression. *Mol Cell* 43, 275-284 (2011).
- Ramsahoye BH, et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5237-5242 (2000).
- Rassoulzadegan M, et al. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441, 469–474 (2006).
- Rathke C, Baarends W M, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 155-168 (2014).
- Rawluszko-Wieczorek AA, Siera A, Horbacka K, et al. Clinical significance of DNA methylation mRNA levels of TET family members in colorectal cancer. *J.Cancer Res. Clin. Oncol.* 141 (8), 1379–1392 (2015).
- Raychaudhuri N, Dubruielle R, Orsi GA, Bagheri HC, Loppin B, Lehner CF. Transgenerational propagation and quantitative maintenance of paternal centromeres depends on Cid/Cenp-A presence in *Drosophila* sperm. *PLOS Biol.* 10, e1001434 (2012).
- Reamon-Buettner SM, Mutschler V, Borlak J. The next innovation cycle in toxicogenomics:

environmental epigenetics. *Mutat. Res.* 659, 158-165 (2008).

- Rechavi O, et al. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in *C. elegans*. *Cell* 147, 1248–1256 (2011).
- Redon C, et al. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 162-169 (2002).
- Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 6, 403-410 (2005).
- Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2, 21-32 (2001).
- Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447, 425-432 (2007).
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089-1093 (2001).
- Reverón-Gómez N, et al. Accurate recycling of parental histones reproduces the histone modification landscape during DNA replication. *Mol. Cell* 72, 239–249.e5 (2018).
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416, 552–556 (2002).
- Rhodes, J. S. & Crabbe, J. C. Gene expression induced by drugs of abuse. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 26-33 (2005).
- Rhodes JS, Crabbe JC. Gene expression induced by drugs of abuse. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (1), 26–33 (2005).
- Rice JC, Allis CD. Code of silence. *Nature* 414, 258-261 (2001).
- Rideout III WM, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5 Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249, 1288–1290 (1990).
- Riggs AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. vol. 32. Cold Spring Harbor; 1996 (1996).
- Riggs AD, Porter TN. Overview of epigenetic mechanisms. In *Epigenetic mechanisms of gene regulation*, 29 (1996).
- Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* 14, 9–25 (1975).
- Rinn JL. et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311-1323 (2007).
- Ripoll N, Hascoet M, Bourin M. The four-plates test: anxiolytic or analgesic paradigm? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 873-880 (2006).
- Rivera C, Gurard-Levin ZA, Almouzni G, Loyola A. Histone lysine methylation and chromatin replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 1433-1439 (2014).
- Robert MF, Morin S, Beaulieu N, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat. Genet.* 33, 61–65 (2003).
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential

expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140 (2010).

- Rodgers AB, Morgan CP, Bronson SL, Revello S, Bale TL. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J. Neurosci.* 33, 9003-9012 (2013).
- Romani M, Pistillo MP, Banelli B. Environmental Epigenetics: Crossroad between Public Health, Lifestyle, and Cancer Prevention. *Biomed. Res. Int.* 2015, 587983 (2015).
- Rothbart SB, Dickson BM, Ong MS, et al. Multivalent histone engagement by the linked tandem Tudor and PHD domains of UHRF1 is required for the epigenetic inheritance of DNA methylation. *Genes Dev* 27, 1288-1298 (2013).
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* 25, 269-277 (2000).
- Rozenberg JM, Shlyakhtenko A, Glass K, et al. All and only CpG containing sequences are enriched in promoters abundantly bound by RNA polymerase II in multiple tissues. *BMC Genomics* 9, 67 (2008).
- Russev G, Hancock R. Assembly of new histones into nucleosomes and their distribution in replicating chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 3143–3147 (1982).

S

- Sado T, et al. X inactivation in the mouse embryo deficient for *Dnmt1*: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev. Biol.* 225, 294-303 (2000).
- Sado T, Okano M, Li E, Sasaki H. De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. *Development* 131, 975–982 (2004).
- Saito M, Ishikawa F. The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J. Biol. Chem.* 277, 35434-35439 (2002).
- Sakakibara Y, et al. Role of SmcHD1 in establishment of epigenetic states required for the maintenance of the X-inactivated state in mice. *Development* 145, 10.1242/dev.166462 (2018).
- Sandberg K, Samson WK, Ji H. Decoding noncoding RNA: da Vinci redux? *Circ. Res.* 113, 240-241 (2013).
- Sandoval-Sierra JV, Salgado García FI, Brooks JH, Derefinco KJ, Mozhui K. Effect of short-term prescription opioids on DNA methylation of the *OPRM1* promoter. *Clin Epigenetics* 12(1), 76 (2020).
- Santenard A, Ziegler-Birling C, Koch M, Tora L, Bannister AJ, Torres-Padilla ME. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat. Cell Biol.* 12, 853–62 (2010).
- Santos, F.; Hendrich, B.; Reik, W.; Dean, W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 241, 172–182 (2002).
- Saredi G, et al. H4K20me0 marks post-replicative chromatin and recruits the TONSL–MMS22L DNA repair complex. *Nature* 534, 714–718 (2016).
- Sarkaki A, Assaei R, Motamedi F, Badavi M, Pajouhi N. Effect of parental morphine addiction on hippocampal long-term potentiation in rats offspring. *Behav. Brain Res.* 186,

72-77 (2008).

- Sarma K, Reinberg D. Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 139-149 (2005).
- Sarraf SA, Stancheva I. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol. Cell* 15, 595-605 (2004).
- Scharf AND, et al. Monomethylation of lysine 20 on histone H4 facilitates chromatin maturation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 57–67 (2009).
- Schorn AJ, Gutbrod MJ, LeBlanc C, Martienssen R. LTR retrotransposon control by tRNA-derived small RNAs. *Cell* 170, 61–71.e11 (2017).
- Schug SA, Zech D, Dorr U. Cancer pain management according to WHO analgesic guidelines. *J Pain Symptom Manage.* 5, 27–32 (1990).
- Schulz EG, Meisig J, Nakamura T, Okamoto I, Sieber A, Picard C, Borensztein M, Saitou M, Blüthgen N, Heard E. The two active X chromosomes in female ESCs block exit from the pluripotent state by modulating the ESC signaling network. *Cell Stem Cell.* 14(2), 203-16 (2014).
- Schulz EG. X-chromosome dosage as a modulator of pluripotency, signalling and differentiation? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 372(1733), 20160366 (2017).
- Schuster A, Skinner MK, Yan W. Ancestral vinclozolin exposure alters the epigenetic transgenerational inheritance of sperm small noncoding RNAs. *Environ. Epigenet.* 2 (2016).
- Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, et al. The Dynamics of Genome-wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells. *Mol. Cell* 48, 849–862 (2012).
- Senner CE, Brockdorff N. Xist gene regulation at the onset of X inactivation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 122-126 (2009).
- Shanak S, Helms V. DNA methylation and the core pluripotency network. *Dev Biol.* 2020 Aug 15;464(2):145-160. doi: 10.1016/j.ydbio.2020.06.001. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32562758.
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S, et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450, 908-912 (2007).
- Sharma U, Rando OJ. Metabolic Inputs into the Epigenome. *Cell. Metab.* 25, 544-558 (2017).
- Sharma U, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* 351, 391–396 (2015).
- Sharp AJ, Stathaki E, Migliavacca E, et al. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Res.* 21, 1592–1600 (2011).
- Sheng J, Lv Z, Wang L, Zhou Y, Hui B. Histone H3 phosphoacetylation is critical for heroin-induced place preference. *Neuroreport* 22, 575-580 (2011).
- Shi Y, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953 (2004).

- Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 243-269 (2006).
- Shirayama M, et al. piRNAs Initiate an Epigenetic Memory of Nonself RNA in the *C. elegans* Germline. *Cell* 150, 65–77 (2012). [PubMed: 22738726]
- Short AK. et al. Elevated paternal glucocorticoid exposure alters the small noncoding RNA profile in sperm and modifies anxiety and depressive phenotypes in the offspring. *Transl. Psychiatry* 6, e837 (2016).
- Shukla S, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479, 74–79 (2011).
- Siegel G, Agranoff B, Albers R, Molinoff P. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. New York, NY, USA: Raven Press (1993).
- Silber R, Berman E, Goldstein B, Stein H, Farnham G, Bertino JR. Methylation of nucleic acids in normal and leukemic leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 123, 638-640 (1966).
- Silva J, et al. Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev. Cell.* 4, 481-495 (2003).
- Sim YJ, Kim MS, Nayfeh A, Yun YJ, Kim SJ, Park KT, Kim CH, Kim KS. Zi Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. *Stem Cell Reports.* 8(5), 1312-1328 (2017).
- Simon J. Locking in stable states of genes expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr. Biol.* 7, 373-385 (1995).
- Singer J, Stellwagen RH, Roberts-Ems J, Riggs AD. 5-Methylcytosine content of rat hepatoma DNA substituted with bromodeoxyuridine. *J. Biol. Chem.* 252, 5509-5513 (1977).
- Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin A. A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 246-258 (2011).
- Skinner MK. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 398, 4-12 (2014).
- Skinner MK. Environmental stress and epigenetic transgenerational inheritance. *BMC Med.* 12, 153-014-0153-y (2014).
- Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 214-222 (2010).
- Sleutels F, Barlow DP. The origins of genomic imprinting in mammals. *Adv. Genet.* 46, 119-163 (2002).
- Smith PK, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85 (1985).
- Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 14, 204-220 (2013).
- Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, et al. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484, 339–344 (2012).

- Sneider T, Methylation of mammalian deoxyribonucleic acid. 3. Terminal versus internal location of 5-methylcytosine in oligodeoxyribonucleotides from Novikoff hepatoma cell deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 247, 2872- 2875 (1972).
- Song SJ, Ito K, Ala U, et al. The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation. *Cell Stem Cell* 13 (1), 87–101 (2013).
- Song SJ, Poliseno L, Song MS, et al. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell* 154 (2), 311–324 (2013).
- Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 151, 994–1004 (2012).
- Srinivasan PR, Borek E. Enzymatic alteration of nucleic acid structure. *Science* 145, 548-53 (1964).
- Stadler MB, Murr R, Burger L, et al. DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* 480, 490–495 (2011).
- Stein C, Schafer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat. Med.* 9 (8), 1003–1008 (2003).
- Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 435-459 (2000).
- Stoler S, Keith KC, Curnick KE, Fitzgerald-Hayes M. A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.* 9, 573-586 (1995).
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45 (2000).
- Straussman R, Nejman D, Roberts D, et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(5), 564–571 (2009).
- Stroynowska-Czerwinska A, Fiszer A, Krzyzosiak, WJ. The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell Mol. Life Sci.* 71, 2253-2270 (2014).
- Stuwe E, Toth KF, Aravin AA. Small but sturdy: small RNAs in cellular memory and epigenetics. *Genes Dev.* 28, 423-431 (2014).
- Subiran N, Casis L, Irazusta J. Regulation of male fertility by the opioid system. *Mol. Med.* 17, 846-853 (2011).
- Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J. Biol. Chem.* 279, 27816-27823 (2004).
- Sugimoto M, Abe K. X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS Genet.* 3, e116 (2007).
- Sultan FA, Day JJ. Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function. *Epigenomics* 3, 157-181 (2011).
- Sun H, et al. Morphine epigenomically regulates behavior through alterations in histone H3 lysine 9 dimethylation in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 32, 17454-17464 (2012).

- Sun Y, Zhang H. A unified mode of epigenetic gene silencing: RNA meets polycomb group proteins. *RNA Biol.* 2, 8-10 (2005).
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548–550 (1984).
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128, 747-62 (2007).
- Surprenant A, Shen KZ, North RA, Tatsumi H. Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J. Physiol.* 431, 585-608 (1990).
- Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, Takumi S, Sano T, Michikawa T, Nohara K. Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors. *Canc. Sci.* 104 (12), 1575–1585 (2013).
- Sweet SMM, Li M, Thomas PM, Durbin KR, Kelleher NL. Kinetics of re-establishing H3K79 methylation marks in global human chromatin. *J. Biol. Chem.* 285, 32778–32786 (2010).
- Szyf M. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends Mol. Med.* 21, 134-144 (2015).

T

- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51-61 (2004).
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935 (2009).
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (4), 663–676 (2006).
- Takahashi K, et al. Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. *Nat. Commun.* 5, 3678 (2014).
- Takeshita K, Suetake I, Yamashita E, et al. Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9055-9059 (2011).
- Tamanaha E, Guan S, Marks K, Saleh L. Distributive processing by the iron(II)/alpha-ketoglutarate-dependent catalytic domains of the TET enzymes is consistent with epigenetic roles for oxidized 5 methylcytosine bases. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 9345–9348 (2016).
- Tang WWC, Dietmann S, Irie N, et al. A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell* 161, 1453–1467 (2015).
- Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 226–231 (1993).
- Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 23 (5), 905–911 (2009).

- The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* 47, D330-D338 (2019). [Online]. Available: <http://geneontology.org/>
- Thoma F, Koller T, Klug A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403-427 (1979).
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145–1147.
- Thorvaldsen JL, Verona RI, Bartolomei MS. X-tra! X-tra! News from the mouse X chromosome. *Dev. Biol.* 298, 344-353 (2006).
- Thorvaldsen JL, Verona RI, Bartolomei MS. X-tra! X-tra! News from the mouse X chromosome. *Dev. Biol.* 298, 344-353 (2006).
- Tian F, Tang Z, Song G, Pan Y, He B, Bao Q, Wang S. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypomethylation of the H19 differentially methylated region in the tumor tissue of colorectal cancer patients. *Mol. Med. Rep.* 5(6), 1536-40 (2012).
- Tian W, et al. Reversal of cocaine-conditioned place preference through methyl supplementation in mice: altering global DNA methylation in the prefrontal cortex. *PLoS One* 7, e33435 (2012).
- Toh TB, Lim JJ, Chow EK. Epigenetics in cancer stem cells. *Mol. Cancer.* 16, 29-017-0596-9 (2017).
- Tokuzawa Y, et al. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2699–2708 (2003).
- Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 19, 517-529 (2005).
- Tomioka M, et al. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4–Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res.* 30, 3202–3213 (2002).
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149 (1992).
- Toyama K, Kiyosawa N, Watanabe K, Ishizuka H. Identification of Circulating miRNAs Differentially Regulated by Opioid Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 10.3390/ijms18091991 (2017).
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8681–8686 (1999).
- Tremblay KD, Duran KL, Bartolomei MS. A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4322-4329 (1997).
- Trivedi M, Shah J, Hodgson N, Byun HM, Deth R. Morphine induces redox-based changes in global DNA methylation and retrotransposon transcription by inhibition of excitatory amino acid transporter type 3-mediated cysteine uptake. *Mol. Pharmacol.* 85, 747-757 (2014).
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. Direct neural fate

specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 30, 65-78 (2001).

- Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4629-4638 (1998).
- Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, et al. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells* 11, 805–814 (2006).
- Tucci V, Isles AR, Kelsey G, Ferguson-Smith AC & Erice Imprinting Group. Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. *Cell* 176, 952-965 (2019).
- Tucker KL, Beard C, Dausmann J, et al. Germ-line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of non imprinted genes. *Genes Dev.* 10(8), 1008–1020 (1996).
- Turner BM. Environmental sensing by chromatin: an epigenetic contribution to evolutionary change. *FEBS Lett.* 585, 2032-2040 (2011).
- Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836-845 (2000).
- Turner BM. Histone acetylation and control of gene expression. *J Cell Sci.* 99, 13–20 (1991).
- Tzschentke TM, et al. (-)-(1R,2R)-3-(3-dimethylamino-1-ethyl-2-methyl-propyl)-phenol hydrochloride (tapentadol HCl): a novel mu-opioid receptor agonist/norepinephrine reuptake inhibitor with broad-spectrum analgesic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 265-276 (2007).

U

- Ueda T, et al. The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells* 5, 649-659 (2000).
- Umlauf D, et al. Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat. Genet.* 36, 1296-1300 (2004).
- Untergasser A, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115 (2012).

V

- Vaage AB, et al. Paternal predictors of the mental health of children of Vietnamese refugees. *Child. Adolesc. Psychiatry. Ment. Health.* 5, 2-2000-5-2 (2011).
- van Der Lee, S. & Boot, L. M. Spontaneous pseudopregnancy in mice. II. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 5, 213-215 (1956).
- Van Oosten MJ, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ, Chinnusamy V. The Role of the Epigenome in Gene Expression Control and the Epimark Changes in Response to the Environment. *Critical Reviews in Plant Science.* 33(1), 64–87 (2014).
- van Otterdijk SD, Michels KB. Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence? *FASEB J.* 2016 Jul;30(7):2457-65. doi: 10.1096/fj.201500083. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27037350.

- Varlakhanova NV, Cotterman RF, deVries WN, Morgan J, Donahue LR, Murray S, Knowles BB, Knoepfler PS. *myc* maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation*. 2010 Jul;80(1):9-19. doi: 10.1016/j.diff.2010.05.001. Epub 2010 May 27. PMID: 20537458; PMCID: PMC2916696.
- Varley KE, Gertz J, Bowling KM, et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res*. 23, 555–567 (2013).
- Vassoler FM, Byrnes EM, Pierce RC. The impact of exposure to addictive drugs on future generations: Physiological and behavioral effects. *Neuropharmacology* 76 Pt B, 269-275 (2014).
- Veenendaal MV, et al. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG* 120, 548-553 (2013).
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351 (2001).
- Vertino PM, Sekowski JA, Coll JM, et al. DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex. *Cell Cycle* 1, 416–423 (2002).
- Verzillo V, Madia PA, Liu NJ, Chakrabarti S, Gintzler AR. Mu-opioid receptor splice variants: sex-dependent regulation by chronic morphine. *J. Neurochem.* 130 (6), 790–796 (2014).
- Vu TH, Jirtle RL, Hoffman AR. Cross-species clues of an epigenetic imprinting regulatory code for the IGF2R gene. *Cytogenet. Genome Res.* 113, 202-208 (2006).
- Vyssotski DL. Transgenerational epigenetic compensation. *Evolocus*, 1, 1–6. 2011. (2011).

W

- Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* 41, 10-13 (2012).
- Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1, 18–20 (1942).
- Wade PA, Geggion A, Jones PL, et al. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* 23, 62-66 (1999).
- Wagner KD, et al. RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Dev. Cell* 14, 962–969 (2008).
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 953-990 (2004).
- Wang CY, Colognori D, Sunwoo H, Wang D, Lee JT. PRC1 collaborates with SMCHD1 to fold the X-chromosome and spread Xist RNA between chromosome compartments. *Nat Commun.* 10(1), 2950 (2019).
- Wang CY, Jégu T, Chu HP, Oh HJ, Lee JT. SMCHD1 Merges Chromosome Compartments and Assists Formation of Super-Structures on the Inactive X. *Cell.* 174(2), 406-421.e25 (2018).
- Wang F, Wang H, Wu H, Qiu H, Zeng C, Sun L, Liu B. TEAD1 controls C2C12 cell proliferation and differentiation and regulates three novel target genes. *Cell Signal.* 25(3), 674-81 (2013).
- Wang H, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878 (2004).

- Wang X, Moazed D. DNA sequence-dependent epigenetic inheritance of gene silencing and histone H3K9 methylation. *Science* 356, 88–91 (2017).
- Wang Y, et al. Inhibition of histone deacetylase in the basolateral amygdala facilitates morphine context-associated memory formation in rats. *J. Mol. Neurosci.* 55, 269-278 (2015).
- Wang Z, Yan P, Hui T, Zhang J. Epigenetic upregulation of PSD-95 contributes to the rewarding behavior by morphine conditioning. *Eur. J. Pharmacol.* 732, 123-129 (2014).
- Watanabe T, et al. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev.* 20, 1732-1743 (2006).
- Watson CT, et al. Genome-Wide DNA Methylation Profiling Reveals Epigenetic Changes in the Rat Nucleus Accumbens Associated With Cross-Generational Effects of Adolescent THC Exposure. *Neuropsychopharmacology* 40, 2993-3005 (2015).
- Weake VM, Workman JL. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol. Cell* 29, 653- 663 (2008).
- Weaver JR, Bartolomei MS. Chromatin regulators of genomic imprinting. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 169-177 (2014).
- Whitelaw NC, Whitelaw E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum. Mol. Genet.* 15 Spec No 2, R131-7 (2006).
- Whitten, W. K. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J. Endocrinol.* 13, 399-404 (1956).
- Whitten, M. K. Effect of exteroceptive factors on the oestrous cycle of mice. *Nature* 180, 1436 (1957).
- Wick MJ, et al. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27, 37-44 (1994).
- Widom J. Physicochemical studies of the folding of the 100 A nucleosome filament into the 300 A filament. Cation dependence. *J. Mol. Biol.* 190, 411-424 (1986).
- Wilkins C, Dishongh R, Moore SC, et al. RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 436, 1044-7 (2005).
- Williams K, Christensen J, Pedersen MT, et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 473, 343–348 (2011).
- Williams N, Clouet DH. The effect of acute opioid administration on the phosphorylation of rat striatal synaptic membrane proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220, 278-286 (1982).
- Wilson PR, Caplan RA, Connis RT, et al. Practice guidelines for chronic pain management: a report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Pain Management, Chronic Pain Section. *Anesthesiology.* 86, 995–1004 (1997).
- Wilusz JE, Freier SM, Spector DL. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell* 135, 919-932 (2008).

- Wolf SF, Jolly DJ, Lunnen KD, Friedmann T, Migeon BR. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X chromosome inactivation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81, 2806–2810 (1984).
- Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* 18(9), 517-534 (2017).
- Wu CT, Morris JR. Genes, genetics and epigenetics: A correspondence. *Science* 293, 1103-1105 (2001). DOI: 10.1126/science.293.5532.1103
- Wu H, Zhang Y. Charting oxidized methylcytosines at base resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 656–661 (2015).
- Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* 25 (23), 2436–2452 (2011).
- Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 156, 45-68 (2014).
- Wutz A, Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell.* 5(4), 695-705 (2000).
- Wutz A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nat. Rev. Genet.* 12, 542-553 (2011).
- Wyatt GR. Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochem. J.* 48, 581-584 (1951).

X

- Xu J, Wang T, Su Z, Zhou X, Xiang Y, He L, Li C, Yang Z, Zhao X. Opioid Exposure is Associated with Aberrant DNA Methylation of OPRM1 Promoter Region in a Chinese Han Population. *Biochem Genet.* 56(5), 451-458 (2018).
- Xu Y, Xu C, Kato A, Tempel W, Abreu JG, Bian C et al. Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell* 151, 1200–1213. (2012).
- Xu M, Wang W, Chen S, Zhu B. A model for mitotic inheritance of histone lysine methylation. *EMBO Rep.* 13, 60–67 (2011).

Y

- Yale AR, Nourse JL, Lee KR, Ahmed SN, Arulmoli J, Jiang AYL, McDonnell LP, Botten GA, Lee AP, Monuki ES, Demetriou M, Flanagan LA. Cell Surface N-Glycans Influence Electrophysiological Properties and Fate Potential of Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 11(4), 869-882 (2018).
- Yamaguchi S, Hirano K, Nagata S, Tada T. Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. *Stem Cell Res.* 6, 177–186 (2010).
- Yang H, Sun J, Chen H, Wang F, Li Y, Wang H, Qu T. Mesenchymal stem cells from bone marrow attenuated the chronic morphine-induced cAMP accumulation in vitro. *Neurosci Lett.* 698, 76–80 (2019).
- Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 26(4), 577-590 (2014).

- Yang AY, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in UVB- and DMBA/TPA-induced mouse skin cancer models. *Life Sci.* 113, 45-54 (2014).
- Yang HY, Pu XP. Chronic morphine administration induces over-expression of aldolase C with reduction of CREB phosphorylation in the mouse hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 609 (1–3), 51–57 (2009).
- Yang HY, Pu XP, Liu Y. Chronic morphine treatment induces over-expression of HSP70 in mice striatum related with abnormal ubiquitin-proteasome degradation. *Drug Alcohol Depend.* 139, 53–59 (2014).
- Yang X, Shao X, Gao L, et al. Systematic DNA methylation analysis of multiple cell lines reveals common and specific patterns within and across tissues of origin. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4374–4384 (2015).
- Yeo JC, Ng HH. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res.* 23(1):20-32 (2013).
- Yeo JC, Jiang J, Tan ZY, Yim GR, Ng JH, Gö ke J, Kraus P, Liang H, Gonzales KAU, Chong, HC, et al. Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell Stem Cell* 14, 864-872 (2014).
- Yeshurun S, Hannan AJ. Transgenerational epigenetic influences of paternal environmental exposures on brain function and predisposition to psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 24, 536-548 (2019).
- Yi F, Pereira L, Merrill BJ. Tcf3 functions as a steady-state limiter of transcriptional programs of mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells.* 26(8):1951-60 (2008).
- Yilmaz B, et al. Influence of chronic morphine exposure on serum LH, FSH, testosterone levels, and body and testicular weights in the developing male rat. *Arch. Androl.* 43, 189-196 (1999).
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell selfrenewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292 (2003a).
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* 21, 183-186 (2003b).
- Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J. Mol. Biol.* 270, 385-395 (1997).
- Yohn NL, Bartolomei MS, Blendy JA. Multigenerational and transgenerational inheritance of drug exposure: The effects of alcohol, opiates, cocaine, marijuana, and nicotine. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 118, 21-33 (2015).
- Yong WS, Hsu FM, Chen PY. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics & chromatin*, 9, 26 (2016).
- Yoon A, Tammen SA, Park S, Han SN, Choi SW. Genome-wide hepatic DNA methylation changes in high-fat diet-induced obese mice. *Nutr. Res. Pract.* 11, 105 113 (2017).
- Yu R, Wang X, Moazed D. Epigenetic inheritance mediated by coupling of RNAi and histone H3K9 methylation. *Nature* 558, 615-619 (2018).

- Yu X, Sun S. Comparing five statistical methods of differential methylation identification using bisulfite sequencing data. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 15(2) (2016).

Z

- Zalensky AO, et al. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 43474-43480 (2002).
- Zamore PD, Haley B. Ribo-genome: the big world of small RNAs. *Science* 309, 1519-1524 (2005).
- Zee BM, Levin RS, DiMaggio PA, Garcia BA. Global turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells. *Epigenetics Chromatin* 3, 22 (2010).
- Zhang L, Zhang L, Zhou K, Ye X, Zhang J, Xie A, Chen L, Kang JX, Cai C. Simultaneous determination of global DNA methylation and hydroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Biomol Screen.* 17(7):877-84 (2012).
- Zhang L, Zheng Y, Sun Y, Zhang Y, Yan J, Chen Z, Jiang H. MiR-134-Mbd3 axis regulates the induction of pluripotency. *J Cell Mol Med.* 20(6), 1150-8 (2016).
- Zhang H, et al. Hypermethylation of OPRM1 promoter region in European Americans with alcohol dependence. *J. Hum. Genet.* 57, 670-675 (2012).
- Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, et al. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res.* 20, 1390–1393 (2010).
- Zhang L, Lu X, Lu J, et al. Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat. Chem. Biol.* 8, 328–330 (2012).
- Zhang X, Su J, Jeong M, et al. DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *Nat. Genet.* 48, 1014–1023 (2016).
- Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343-2360 (2001).
- Zhang Y, et al. Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. *Nat. Cell Biol.* 20, 535–540 (2018).
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, et al. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* 13, 1924-1935 (1999).
- Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science.* 322(5902):750-6 (2008).
- Zhao H, Chen T. Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development. *J Hum Genet* 58, 421-427 (2013).
- Zheng H, Huang B, Zhang B, Xiang Y, Du Z, Xu Q, Li Y, Wang Q, Ma J, Peng X, Xu F, Xie W. Resetting Epigenetic Memory by Reprogramming of Histone Modifications in Mammals.

Mol Cell. 63(6):1066-79 (2016).

- Zheng H, Law PY, Loh HH. Non-Coding RNAs Regulating Morphine Function: With Emphasis on the In vivo and In vitro Functions of miR-190. *Front. Genet.* 3, 113 (2012).
- Zhou H, Hu H, Lai M. Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biol. Cell* 102, 645-655 (2010).
- Zhou W, et al. Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol. Cell* 29, 69-80 (2008).
- Zhou W, Wang X, Rosenfeld MG. Histone H2A ubiquitination in transcriptional regulation and DNA damage repair. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 12-15 (2009).
- Zhu D, Fang J, Li Y, Zhang J. Mbd3, a component of NuRD/Mi-2 complex, helps maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells by repressing trophectoderm differentiation. *PLoS One.* 4(11):e7684 (2009).
- Zhu J, Zhu F, Zhao N, Mu X, Li P, Wang W, Liu J, Ma X. Methylation of glucocorticoid receptor gene promoter modulates morphine dependence and accompanied hypothalamus-pituitary-adrenal axis dysfunction. *J Neurosci Res.* 95(7), 1459-1473 (2017).
- Zhu J, et al. Prenatal nicotine exposure mouse model showing hyperactivity, reduced cingulate cortex volume, reduced dopamine turnover, and responsiveness to oral methylphenidate treatment. *J. Neurosci.* 32, 9410-9418 (2012).
- Zierhut C, Jenness C, Kimura H, Funabiki H. Nucleosomal regulation of chromatin composition and nuclear assembly revealed by histone depletion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 617–625 (2014).
- Ziller MJ, Gu H, Müller F, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500, 477–481 (2013).
- Ziolkowska B, Korostynski M, Piechota M, Kubik J, Przewlocki R. Effects of morphine on immediate-early gene expression in the striatum of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Pharmacol. Rep.* 64, 1091-1104 (2012).
- Zollner C, Stein C. Opioids. *Handb. Exp. Pharmacol.* (177), 31-63 (2007).
- Żylicz JJ, Bousard A, Žumer K, Dossin F, Mohammad E, da Rocha ST, Schwalb B, Syx L, Dingli F, Loew D, Cramer P, Heard E. The Implication of Early Chromatin Changes in X Chromosome Inactivation. *Cell.* 176(1-2):182-197.e23 (2019).