

VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA NORMALIZADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA PARA LA RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO EN LA ESPECIE OVINA.

Serrano, M.¹, González, C., Moreno-Sánchez, N., Marcos-Carcavilla, A., Van Poucke, M., Calvo, J. H., Salces, J., y Carabaño, M. J.

¹INIA. Ctra. de La Coruña Km. 7,5. 28040 (Madrid) España.
E-mail: malena@inia.es

INTRODUCCIÓN

La precisión de las medidas de expresión obtenidas mediante qPCR depende del control de parámetros que generalmente son normalizados utilizando genes de referencia (GRs). La expresión de los GRs se supone que no varía en los tejidos, células o tratamientos bajo investigación, pero parece que no existen GRs universales y que todos los genes se expresan diferencialmente en al menos un contexto biológico (Lee et al., 2010). De este modo se hace necesario validar GRs para cada situación experimental. Por otro lado, el uso de modelos matemáticos adecuados para estimar la estabilidad de la expresión de los genes bajo diferentes condiciones es un punto crítico. GeNorm (Vandesompele et al., 2002) y Normfinder (Andersen et al., 2004) son dos de los programas más utilizados para determinar GRs. El primero considera que todas las muestras proceden de un solo grupo y por tanto la estima de la estabilidad de la expresión (M) se basa exclusivamente en las varianzas de la expresión entre los genes. El Normfinder permite estimar las varianzas de expresión de los genes entre y dentro de grupos y calcula la estabilidad combinando ambas fuentes de información. Los genes con mínima varianza entre y dentro de grupos son los más estables. Szabo et al. (2004) propusieron el cálculo del error cuadrático medio ($\text{sesgo}^2 + \text{varianza}$) como valor de estabilidad, y un criterio mini-max MSE para determinar el mejor grupo de GRs comunes a varios tratamientos.

Las variaciones en la temperatura ambiental son una fuente de estrés y motivan la aparición de mecanismos genéticos adaptativos de defensa contra las elevadas temperaturas. El estrés térmico conduce a cambios en la expresión génica en la mayoría, si no en todas, las células así como en una variedad de órganos y tejidos asociados a la respuesta de aclimatación. Hasta la fecha no existe literatura de GRs en el contexto de la respuesta al estrés térmico en la especie ovina. En este trabajo se propone un nuevo método mediante Máxima Verosimilitud-Modelos Mixtos para estimar la estabilidad de la expresión de 16 genes candidatos a GRs en estudios de expresión bajo condiciones de estrés térmico en la especie ovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 16 genes (Tabla 1). Se recogieron muestras de sangre de 15 machos Manchegos en la provincia de Ciudad Real bajo dos condiciones climáticas (temperatura y humedad relativa): el grupo control a 28,6°C y 52% y el grupo bajo estrés térmico a 34,4°C y 35%. El ARN total se aisló a partir de 10ml de sangre completa usando el kit LeukoLock (Ambion, Inc.). El ADNc fue sintetizado usando el ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega Corp.). Las reacciones de qPCR a un volumen de 20 μ l (50ng de ADNc, 10 μ l de Precision TM 2X qPCR Mastermix (Biomolecular Technologies, Inc.) y concentración de los oligos de 300nM) se llevaron a cabo por triplicado en un termociclador ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems). Para estimar las eficiencias (E) de la PCR, se diseñaron curvas patrón basadas en 5 diluciones seriadas de un stock de ADNc. Las eficiencias se calcularon a partir de la fórmula $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ (Bustin, 2000). Los valores $\log_E(\text{Ct})$ se utilizaron como variables dependientes. La estima de la variabilidad de la expresión génica se realizó mediante Máxima Verosimilitud con el siguiente Modelo Mixto (MLMX): $y_{ijk} = \mu + t_i + g_j + a_k + tg_{ij} + ta_{ik} + ga_{jk} + e_{ijk}$, utilizando el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (SAS, 2004), donde: tratamiento (t) y gen (g) se incluyeron como efectos fijos y

muestra (a), tratamientoXgen (tg), tratamientoXmuestra (ta) y genXmuestra (ga) como variables aleatorias. Se consideró una varianza residual heterogénea ligada al efecto tratamientoXgen (32 niveles). La estabilidad de la expresión se estableció en términos de sesgo y varianza calculando el Error Cuadrático medio $MSE = (\text{sesgo})^2 + \text{varianza}$. El criterio de clasificación de los genes fue el minimax MSE de Szabo et al. (2004). Para determinar el número óptimo de GRs se probaron todas las combinaciones posibles entre 2 y 16 (65,519 combinaciones). Para cada combinación se calculó el MSE como el promedio del sesgo y las varianzas. Para contrastar nuestros resultados se utilizaron los dos métodos más comúnmente usados, geNorm (Vandesompele et al., 2002) y Normfinder (Andersen et al., 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra las clasificaciones de los genes según los tres métodos. Aunque diferentes, hubo varios genes en común en las 5 primeras posiciones (*RPS18*, *SDHA* y *B2M*). *ACACA*, *ATP5G2* y *RPL19* fueron los genes menos estables bajo las tres aproximaciones. Las posiciones de *YWHAB* y *RPL13A* fueron muy distintas según el método usado. El par de genes más estable fue distinto en cada método. GeNorm considera que todas las muestras provienen del mismo tratamiento, asumiendo la no co-regulación de los candidatos a GRs. Este método tiende a favorecer a aquellos genes con patrones de expresión similares en vez de aquellos con mínima variación, lo que sería problemático si hubiese co-regulación entre ellos. Para comparar datos de expresión de distintas fuentes (tejidos, tratamientos, etc.) es necesario detectar GRs comunes a todos ellas. Con geNorm la mejor estrategia es realizar análisis independientes para cada grupo de datos y seleccionar los GRs comunes a las condiciones probadas, por lo que se ejecutó el geNorm para cada tratamiento de forma separada. Aunque el orden de los candidatos a GRs difería para cada tratamiento, hubo tres genes comunes en las 5 primeras posiciones de ambas clasificaciones. *SDHA*, uno de los mejores GRs detectados por nuestro MLMX, forma parte del par de genes más estables detectados por geNorm en cada tratamiento por separado. Sin embargo, es el cuarto en la clasificación de geNorm con todo el conjunto de datos. NormFinder clasifica los genes en función de la varianza de su expresión entre y dentro de tratamientos. La varianza entre grupos se estima por las diferencias en los niveles de expresión de éstos, asumiendo que el promedio de expresión de los genes es independiente del grupo y que el promedio de las variaciones entre grupos es cero. Esta última suposición requiere que se seleccionen los genes candidatos de un grupo del que a priori no se esperen diferencias de expresión entre grupos, lo cual es una incógnita en los casos donde se estudia la expresión de genes bajo nuevas circunstancias. Estas restricciones no son realistas y restan flexibilidad al modelo en el que la interacción entre genes y el ambiente se suponen parte de los mecanismos de regulación de la expresión génica.

A la hora de seleccionar los GRs además de la condición de estabilidad se deben considerar criterios biológicos y funcionales. En nuestro caso *RPS18* tiene una buena medida de estabilidad, sin embargo, algunos trabajos indican que no es un buen GR ya que la regulación de su síntesis no es representativa de los niveles de ARNm (Radonic et al., 2004). *RPS26* se mostró muy estable bajo MLMX, sin embargo, este gen tiene múltiples pseudogenes procesados (Zhang et al., 2002) que en el caso de expresarse podrían dar lugar a resultados erróneos. Al igual que en este estudio, algunos trabajos han señalado a *SDHA* como un buen GR bajo diferentes circunstancias tanto en humanos (Balogh et al., 2008) como en bovino (Kullberg et al., 2006). *B2M* ha sido utilizado como GR en numerosos trabajos científicos, sin embargo, se sabe que su expresión varía considerablemente bajo diferentes condiciones experimentales. La mayoría de trabajos científicos utilizan *ACTB* como GR. No obstante Xu y Miller (2004) determinaron que la expresión de *ACTB* se alteraba de forma espacial y temporal. Descartando *RPS18* y *RPS26* de los análisis por las

razones biológicas comentadas, el mejor grupo de dos genes resultó *SDHA/MDH1* (MSE= 0,0006) y el mejor de tres *RPL19/ACTB/SDHA* (MSE = 0,0006). Estos valores fueron similares a los de la mejor combinación *RPS26/SDHA* (MSE = 0.0005) obtenida con todos los genes. Sin embargo, *SDHA/B2M* y *SDHA/ACTB* tuvieron mayores valores (0,0011 y 0,0010, respectivamente). Los resultados indican que *SDHA/MDH1* constituyen un buen par de GRs para el estudio de la expresión génica de la respuesta al estrés térmico en ovino utilizando sangre completa como fuente biológica de material genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, C. L., J. Ledet-Jensen & T. Ørntoft. 2004. *Cancer Res.* 64: 5245-5250.
- Balogh, A., Paragh, G.Jr, Juhasz, A. et al. 2008. *J Photochem. Photobiol. B* 93: 133-139.
- Bustin, S. A. 2000. *J Mol Endocrinol.* 125: 169-193.
- Kullberg, M., Nilsson, M.A., Arnason, U., Harley, E.H. & Janke. 2006. *Mol. Biol. Evol.* 23(8):1493-1503.
- Lee, P.D., Sladek, R., Greenwood, C.M.T. & Hudson, T.J. 2010. *Genome Res.* 12:292-297.
- Radonic A., Thulke S., Mackay IM., Landt O., Siegert W. & Nitsche A. 2005. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313(4): 856-862.
- SAS Institute Inc. 2004. *SAS/STAT® 9.1 User's Guide.* Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Szabo, A. et al. 2004. *Genome Biol* 5: R59.
- Vandesompele, J. et al. 2002. *Genome Biol* 3 (7): 0034.1-0034.11.
- Xu, M. & Miller, M.S. 2004. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201: 295– 302.
- Zhang Z., Harrison P. & Gerstein M. 2002. *Genome Res.*12(10): 1466–1482.

Tabla 1. Clasificación de los genes según los distintos métodos.

ID gen	gen	ML-Mixed model	gen	Norm Finder	gen	geNorm
	RPS26/SDHA	0.0005	RPS26/YWHAB	0.008	ACTB/RPL13A	0.294
100036761	RPS18	0.0007	RPS18	0.013	YWHAB	0.782
443468	RPS26	0.0009	B2M	0.022	RPS18	0.790
100036762	SDHA	0.0011	YWHAZ	0.024	ACTB	0.796
443295	B2M	0.0015	SDHA	0.026	SDHA	0.797
443052	ACTB	0.0017	YWHAB	0.029	B2M	0.815
443091	MDH1	0.0019	RPS26	0.030	YWHAZ	0.833
780452	YWHAZ	0.0020	ACTB	0.035	RPL13A	0.839
780524	LOC780524	0.0027	Cyp1a1	0.037	RPS26	0.847
443005	GAPDH	0.0030	GAPDH	0.039	GAPDH	0.882
100036763	YWHAB	0.0033	RPL13A	0.043	RPLP0	0.899
100036764	RPLP0	0.0038	MDH1	0.048	LOC780524	1.085
100270789	RPL19	0.0039	ACACA	0.057	MDH1	1.119
443542	ATP5G2	0.0057	RPLP0	0.058	RPL19	1.140
100170113	Cyp1a1	0.0063	LOC780524	0.061	Cyp1a1	1.170
443186	ACACA	0.0069	RPL19	0.072	ATP5G2	1.308
100036760	RPL13A	0.0078	ATP5G2	0.077	ACACA	1.568

DETECTION OF REFERENCE GENES FOR THE HEAT STRESS RESPONSE IN THE OVINE SPECIES

ABSTRACT: We have tested 16 putative reference genes in peripheral whole blood of control and heat stressed ovine samples to detect stable genes for the heat-shock response. To determine gene expression stability a new approach based in Maximum Likelihood estimation of Mixed Model parameters has been tested and compared to commonly used software (NormFinder and geNorm). Differences in the stability rankings of genes were found among the three approaches. Under our approach *SDHA* and *MDH1* was the best set of genes to be normalizers of target genes in heat shock experiments in the ovine specie.

Keywords: Heat shock, reference genes, ML-Mixed model, ovine