

CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE OVINO INFECTADO CON SCRAPIE

Hernaiz¹, A., Sentre¹, S., Bolea², R., López-Pérez^{1,2}, O., Sanz¹, A., Zaragoza¹, P., Badiola², J.J., Toivonen¹, J.M., Filali², H. y Martín-Burriel^{1,2}, I.

¹LAGENGIO, Facultad de Veterinaria, IA2, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza. ²CIEETE, Facultad de Veterinaria, IA2, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza.; minma@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas son trastornos neurodegenerativos que afectan a los animales y al hombre. Están producidas por el mal plegamiento de la proteína celular PrP^C (codificada por el gen *PRNP*) hacia una conformación infecciosa y patológica (PrP^{Sc}). El scrapie ovino se considera un buen modelo animal para el estudio de muchos aspectos de estas enfermedades, incluidos la patogenia, la transmisión o el diagnóstico. Las herramientas genómicas pueden ayudar a comprender los mecanismos moleculares asociados a estas patologías y permitir la identificación de dianas terapéuticas o moléculas diagnósticas (biomarcadores).

En los últimos años se ha puesto en evidencia la importancia de mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA, en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas. La actividad neuronal en el cerebro está regulada epigenéticamente (Mehler, 2008) y la metilación del DNA parece ser importante en la formación de la memoria y en el deterioro cognitivo relacionado con el envejecimiento (Miller et al., 2007). Estudios genómicos dirigidos a identificar cambios epigenéticos en pacientes han demostrado la regulación por metilación del DNA de genes específicos en la enfermedad de Alzheimer (EA) (de Jager et al., 2014) y en la de Parkinson (EP) (Kaut et al., 2012). La metilación distintiva observada en pacientes con EP involucra genes previamente asociados con la enfermedad y se han encontrado alteraciones concordantes entre el cerebro y los leucocitos de sangre periférica (Masliah et al., 2013), pudiendo ser una buena fuente de biomarcadores.

Las anteriores enfermedades se consideran “prion-like” por cursar con la acumulación de proteínas mal plegadas en el sistema nervioso central y podrían tener mecanismos patogénicos comunes. Hasta el momento no se han analizado cambios de metilación en ningún modelo de enfermedad priónica. Únicamente, se ha descrito que la regulación de la expresión de PrP^C podría estar mediada por un mecanismo epigenético durante la diferenciación neuronal (Dalai et al., 2017). En este trabajo presentamos los perfiles de metilación del DNA en sistema nervioso central de ovino con scrapie obtenidos mediante secuenciación genómica de DNA transformado con bisulfito.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Para la realización de este estudio utilizamos muestras congeladas de tálamo de 8 ovejas del banco de tejidos del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CIEETE) de la Universidad de Zaragoza. Cuatro de estas muestras pertenecían a ovino infectado de forma natural con scrapie clásico y otras cuatro eran controles. Todos los animales presentaban el genotipo ARQ/ARQ para el gen *PRNP* y una edad comprendida entre 4 e 6 años. La médula oblonga de estos animales había sido utilizada previamente en estudios transcriptómicos (Filali et al., 2011).

Extracción de DNA y secuenciación

El DNA genómico se obtuvo del tálamo mediante el kit Quick DNA midiprep Plus (Zymo Research). La calidad del DNA fue analizada mediante electroforesis antes de la construcción de las librerías. Tras la adición de los adaptadores de secuenciación el DNA se transformó con bisulfito utilizando EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research). Posteriormente se realizó una secuenciación con lecturas pareadas utilizando la tecnología Illumina HiSeqTM2500. Las lecturas de calidad se alinearon al genoma de referencia Oar_v4.0 mediante el programa Bismark (Krueger y Andrews, 2011). Una vez alineadas se calculó la profundidad de cobertura para cada sitio CX (CG, CHH, CHG, siendo H=A, C o T).

Para la identificación de regiones con metilación diferencial (DMR) entre el grupo con scrapie y el grupo control, se utilizó el programa bsseq dentro del paquete bioestadístico Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/bsseq.html>). Este método se basa

en el algoritmo BSmooth. Como la variación en el grupo con scrapie puede ser mayor que en los controles, se estimó la varianza en el grupo control y se realizaron los test estadísticos t basados en cuantiles con un corte [2,5%, 97,5%]. Se aplicó un FDR < 0,05 para la identificación de DMR y se aplicó un umbral de al menos 0,1 de diferencia entre el nivel de metilación de los dos grupos y al menos 3 sitios mC en la región DMR, estando dos citosinas adyacentes a una distancia no superior a 300 pb. Además, se analizó la presencia de sitios con metilación diferencial en promotores (DMP). Los DMP se identificaron analizando cada citosina en su contexto (CG, CHG, CHH) en el fragmento de 2kb anterior al sitio de inicio de transcripción mediante test exacto de Fisher. Se aplicó un FDR < 0,05 y se tuvo en cuenta que la diferencia de metilación entre los distintos grupos tuviera un valor absoluto superior a 0,2. Finalmente se analizó el enriquecimiento en términos de ontología de genes (GO) y en rutas biológicas concretas de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Gens and Genomes*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad del DNA de las muestras del banco de tejidos fue adecuada para llevar a cabo la secuenciación. Se consiguió una transformación con bisulfito de C a T superior al 99,87%. Se obtuvieron una media de 466.639.474,3 ± 62.519.048,83 secuencias por genoma con un porcentaje de secuencias mapeadas que rondó entre 55,24 y 71,52%. Para determinar el estatus de metilación a nivel genómico, el proyecto *NIH Roadmap Epigenomics* (<http://www.roadmapepigenomics.org/protocols>) recomienda una cobertura mínima de 30x y, si existen replicas biológicas, de 20x. En nuestro estudio detectamos un total de 2.448.188.764 ± 2.450.025,179 sitios por genoma con una cobertura mínima de 25x y media de 28,5 ± 1,95.

No se observaron diferencias entre el grupo con scrapie y el control en cuanto al porcentaje de citosinas metiladas a nivel genómico (Tabla 1), si bien el DNA de ovino con scrapie mostró mayor variabilidad (5,38 ± 1,12) que el del grupo control (4,6 ± 0,15). Como era de esperar, el mayor porcentaje de 5mC a nivel genómico se encontraba en las regiones CpG (41,5 ± 1,14).

Tabla 1. Resumen del perfil de metilación a nivel genómico. Porcentaje de citosinas metiladas en todas las C del genoma (mC) o en las regiones CpG, CHG y CHH, representando H a A, C o T. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar en el grupo control (n=4), el scrapie (n=4) y el total.

Grupos	%mC	%mCpG	%mCHG	%mCHH
Control	4,60 ± 0,16	41,21 ± 0,37	2,19 ± 0,12	2,84 ± 0,21
Scrapie	5,38 ± 1,12	41,78 ± 1,64	3,02 ± 1,01	3,61 ± 1,13
Media	4,99 ± 0,85	41,50 ± 1,14	2,61 ± 0,80	3,22 ± 0,86

La existencia de DMRs podría reflejar diferencias en la regulación transcripcional entre grupos de muestras. En este estudio se han determinado un total de 8.907 DMRs, de las cuales 4.630 mostraban hipermetilación y 4.277 hipometilación en el DNA procedente de tálamo de animales con scrapie. La mayor proporción de DMRs se localizaron en intrones (7.511), seguidos por exones (2.426) y, finalmente, promotores (955).

El estudio de enriquecimiento en términos GO reveló que, mientras los genes que incluían DMR hipermetiladas estaban enriquecidos en genes involucrados con el proceso biológico de transducción de señal y adhesión celular, los que presentaban DMR hipometiladas lo hacían con la adhesión celular y el transporte transmembrana. La proteína prión celular PrP^C parece actuar como un importante regulador de la adhesión celular y la función de barrera. Esta función parece deberse a la capacidad de PrP^C de interactuar con proteínas de señalización, aunque los mecanismos por los que regula la actividad no se conocen con exactitud (Petit et al., 2013). El enriquecimiento observado en estos procesos celulares cuando PrP^C ha perdido su función por conversión a PrP^{Sc} podría ser indicativo de una regulación epigenética de este proceso.

En cuanto al enriquecimiento en rutas biológicas concretas de KEGG, una vez aplicado el método de corrección FDR de Benjamini y Hochberg (P < 0,05), la señalización del Calcio y los transportadores ABC fueron los sistemas más enriquecidos en genes con DMR hipermetiladas. PrP^{Sc} afecta a la homeostasia del calcio y estrés oxidativo (Torres et al., 2010) y la sobreexpresión del gen *ABCA1* se ha descrito en cerebros de modelos murinos infectados

por priones (Kumar et al., 2008). Estudios de expresión génica y su regulación epigenética de genes involucrados en estas rutas podrán elucidar los mecanismos moleculares por los que estas proteínas intervienen en la neuropatología de las enfermedades priónicas. Las rutas enriquecidas en genes con DMR hipometiladas estaban relacionadas con la señalización del calcio, ritmo circadiano y ruta de señalización de cAMP.

En el análisis de sitios específicos con metilación diferencial dentro de los promotores (DMP) se detectaron 15 sitios CG hipermetilados y 24 hipometilados en los tejidos con scrapie. Se confirmará el efecto de la metilación en la expresión en algunos de estos genes, así como la implicación funcional que pudieran tener los cambios de metilación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dalai, W. et al. 2017. J. Vet. Med. Sci. 79(3): 644-648.
- De Jager, P.L. et al. 2014. Nat. Neurosci. 17: 1156-1163.
- Filali, H. et al. 2011. Plos One 6(5): e19909
- Kaut, O. et al. 2012. Neurogenetics 13: 87-91.
- Krueger, F. & Andrews, S.R. 2011. Bioinformatics 27(11): 1571-2.
- Kumar, R. et al. 2008. J. Gen. Virol. 89: 1525-32.
- Masliah, E. et al. 2013. Epigenetics 8: 1030-1038.
- Mehler, M.F. 2008. Ann. Neurol. 64: 602-617.
- Miller, C.A. et al. 2007. Neuron 53: 857-869.
- Petit, C.S.V. 2013. Tissue Barriers 1: 2, e24377.
- Torres, M. et al. 2010. Plos One 5: e15658.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, el Gobierno de Aragón y Fondos FEDER con los proyectos AGL2015-67945-P, AGL2015-65560-R, Grupo A19_17R.

EPIGENETIC CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF SHEEP NATURALLY INFECTED WITH SCRAPIE

ABSTRACT: Scrapie is a Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) that affects sheep and goats and it is considered a good natural animal model to study prion diseases. Genomic DNA methylation is an epigenetic mechanism that regulates gene expression. Although changes in DNA-methylation occur in the Central Nervous System (CNS) in many neurodegenerative diseases, potential DNA-methylation alterations have not been studied in any TSE models or naturally infected cases. We present here a whole genome sequencing analysis of bisulfite treated DNA (WGBS) obtained from thalamus of four naturally scrapie infected sheep and four controls. All animals were female, carried the ARQ/ARQ genotype for the *PRNP* allele and were sacrificed with similar age (4 to 6 years old). Genomes displayed similar average methylation levels; however we identified a total of 8,907 differentially methylated regions (DMR). Gene Ontology enrichment revealed that hypomethylated DMRs were enriched in genes involved in transmembrane transport whereas hypermethylated DMRs were related with intracellular signal transduction related genes. KEGG Pathway Enrichment Analysis of DMP or DMR related genes displayed Calcium signaling and ABC transporters as the most enriched pathways in genes with hypermethylated DMR; and calcium binding, circadian entrainment and cAMP signaling pathways were enriched in genes with hypomethylated DMR.

Keywords: Whole Genome Bisulfite Sequencing, DNA methylation, prion, brain