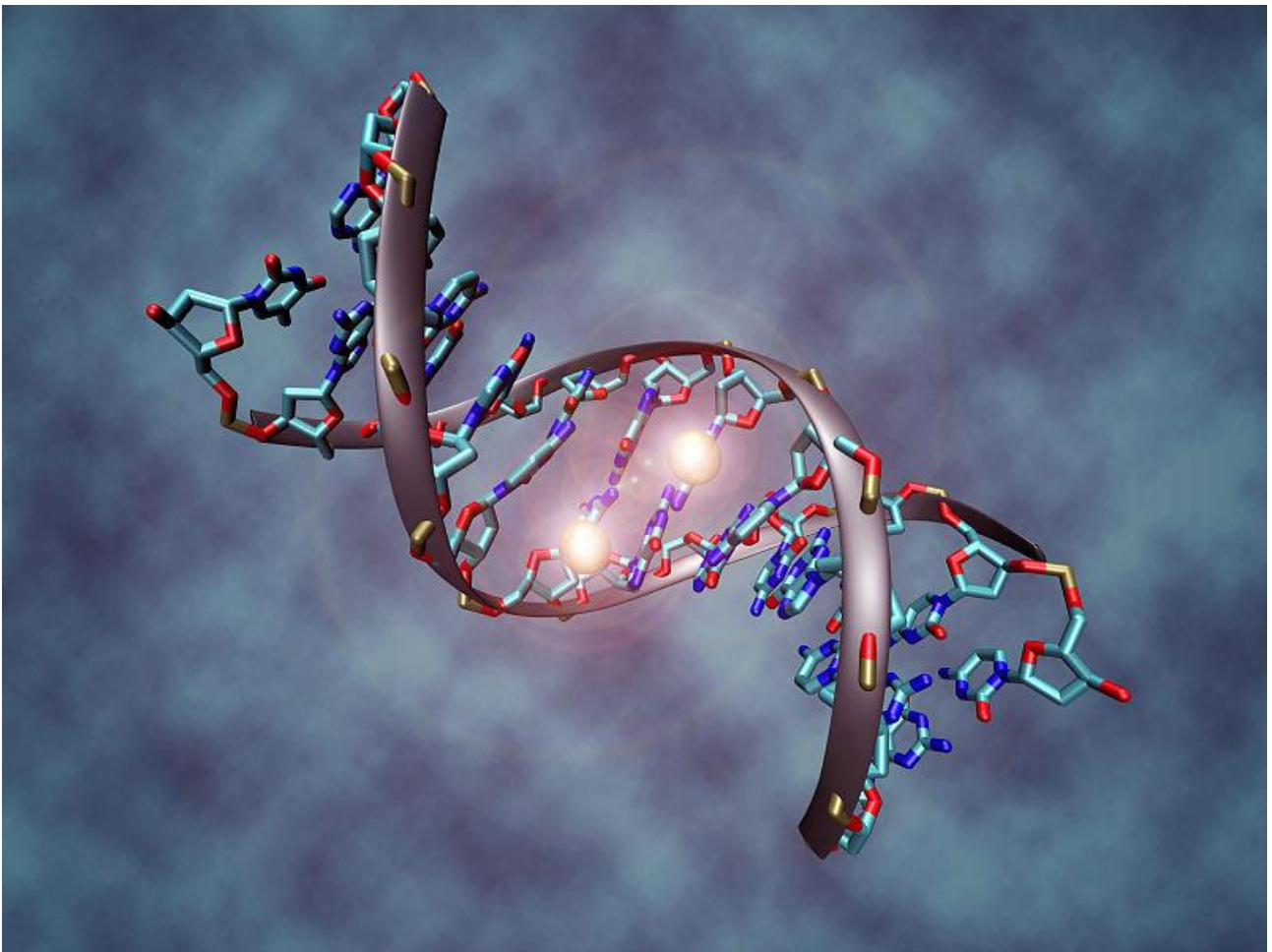


Differentiel methylering af vtRNA2-1 i Systemisk Lupus Erythematosus



Anna Hvarregaard Christensen

Aarhus Katedralskole

Sundhedsvidenskab

Projekt Forskerspirer 2015



Indhold

1 Indledning	3
2 Forskningsproblem	3
Afgrænsning	3
Formål	5
Problemformulering	5
3 Metodevalg, teori og empiri	5
DNA methylering	5
Prøver	6
Bisulfitbehandling	6
Polymerase Chain Reaction	6
Pyrosekventering	7
RT-qPCR	7
4 Projektet udførelse	8
Fremgangsmåde	8
Faser	9
Budget	10
5 Konklusion og perspektivering	10
6 Tak til	11
7 Litteraturliste	12
8 Bilag	14
Bilag 1 – Tabel: Oversigt over methylering af apoptoserelaterede gener	14
Bilag 2 – Figur: vtRNA2-1 locus	16
Bilag 3 – Baggrundprojekt: Studiedesign og prøver	17
Bilag 4 – Figur: Bisulfitkoventering	18
Bilag 5 – Figur: Pyrosekventering	19
Bilag 6 – Tabel: Petaljeret budget	20



Indledning

Systemisk Lupus Erythematosus (SLE) er en sjælden, kronisk bindevævssygdom, der er karakteriseret ved periodevise betændelsestilstande i mange forskellige bindevæv i kroppen (Liu & Davidson, 2012). Omkring 1800 danskere lider af sygdommen, som primært rammer kvinder i 25-35-årsalderen (Den danske SLE, LED og Lupus webside).

SLE er en autoimmun sygdom, hvor immunforsvaret danner antinukleære autoantistoffer (Zouali 2012). Da årsagerne til den autoimmune reaktion, der ligger bag udvikling af SLE, endnu ikke er fuldt afdækket, behandles sygdommen fortsat med symptomdæmpende og immunsupprimerende midler (Liu & Davidson 2012). De immunsupprimerende stoffer har mange ubehagelige bivirkninger; men omvendt kan mangelfuld behandling give varige skader på væv og vitale organer.

Det er netop dette, jeg finder særligt interessant ved SLE; hvis man finder årsagerne til immunreaktionen, kan man både udvikle årsagsrettede behandlingsformer, og dermed undgå bivirkninger, gribe tidligere ind i sygdomsforløbet, og i sidste ende forebygge sygdommen.

Mere viden om SLE kan give bedre livskvalitet til ramte, og måske endda bruges til klarlægning af årsagerne til andre, lignende, autoimmune sygdomme.

Forskningsproblem

Afgrænsning

Sygdomsmekanismen i SLE er kompleks, og involverer anormaliteter i både det medfødte immunsystem, det tillærte immunsystem, apoptosen og fjernelsen af postapoptotisk materiale (Liu & Davidson 2012).

Undersøgelser viser, at både genetik og miljø spiller ind på sygdomsudviklingen. Men de seneste års forskning har klarlagt, at også epigenetik spiller en væsentlig rolle i sygdomsprocessen, ikke bare for SLE, men for mange lignende autoimmune sygdomme (Zouali 2012).

Flere studier finder sammenhæng mellem afvigende epigenetisk regulering af arvematerialet, og bestemte symptomer. Især tre epigenetiske mekanismer er betydeligt involveret i patogenesen, nemlig histonmodificering, DNA methylering og mikroRNA (Liu & Davidson 2012) (Zouali 2012).

Der er bl.a. en iøjnefaldende tendens til overordnet hypomethylering af SLE-patienters DNA sammenlignet med DNA fra raske kontroller (Zouali 2012). Måske kan denne overordnede hypomethylering forklare noget af sygdomsmekanismen (Liu & Davidson 2012).



Fx kan man forestille sig, at det primært er proapoptosegener, som regulerer celledeling og celledød, der er hypometylerede. Dette kunne forklare den anormale apoptose, og manglende fjernelse af postapoptosisk materiale, som beskrevet ovenfor, idet hypometylering medfører forøget transskription af det pågældende gen. Det kendes fx fra kræft, hvor der omvendt er en stærk tendens til hypermetylering af proapoptosegener (Baylin 2005), og som følge heraf nedsat transskription.

Således kan det antages, at de selvsamme proapoptosegener, der er hypermetyleret i kræft, er hypometylerede hos SLE-patienter.

For at undersøge denne antagelse nærmere, har vi i dette projekt sammenlignet metyleringsgraden af en række apoptosrelaterede gener målt i DNA fra SLE-patienter, i forskellige publicerede EWASs (Epigenome Wide Association Studies). Generne ZNF609, ZNF644 og TRIM22 er umiddelbart mest fremtrædende i denne sammenligning, da der i disse gener observeres ensrettede tendenser i deres metyleringsmønster i flere studier (Bilag 1).

Dog viste resultaterne, fra undersøgelsen foretaget af Renauer og hans kollegaer (Renauer et al. 2015), sig at være anderledes interessante, hvis man tager antagelsen ovenfor i betragtning. I denne artikel er der hos patienter med sommerfugleudslæt observeret hypometylering af genet vtRNA2-1, et 127 bp langt gen, som er placeret på kromosom 5 (The Ensembl Genome Browser) (Bilag 2). Dette viste sig værd at undersøge nærmere, da netop dette gens indflydelse på akut myloid leukemi (AML) beskrives i en anden artikel (Treppendahl et al. 2012). Ifølge denne artikel er hypermetylering af vtRNA2-1 i immunceller medvirkende til dårlig overlevelseschance for patienter med AML.

Disse to studier tilsammen underbygger altså antagelsen om, at de samme proapoptose gener, som er hypermetylerede i kræft, findes hypometylerede i SLE. I tilfældet med vtRNA2-1 genet dog kun for en helt bestemt type kræft, ALM, og en helt bestemt gruppe SLE-patienter, som har sommerfugleudslæt.



Formål

Gennem undersøgelse af DNA og RNA fra en uafhængig gruppe SLE-patienter, med og uden en sygdomshistorie med sommerfugleudslæt, og raske kontroller vil vi i dette projekt:

1. Forsøge at bekræfte EWAS-fundet af Renauer et al., som viste hypomethylering af genet vtRNA2-1 hos SLE-patienter med sommerfugleudslæt i anamnesen.
2. Undersøge om hypomethylering af genet vtRNA2-1 er forbundet med øget transskription, og dermed forhøjet ekspresion.

På denne måde kan vi for dette gens vedkommende bekræfte, om der er hold i den antagelse, at proapoptosegener, der er hypermethylerede i kræft, bliver sygdomsfremkaldende i SLE pga. hypomethylering, og deraf følgende øget ekspresion.

Problemformulering

Med udgangspunkt i pyrosekventering af bisulfit-konverteret DNA og RT-qPCR af RNA fra modne T-celler fra patienter med Systemisk Lupus Erythematosus og raske kontroller, undersøges det:

1) om der er forskel på methylering af genet vtRNA2-1 mellem raske kontroller og SLE-patienter, 2) om der er forskel på methyleringen af samme gen hos SLE-patienter, der enten har eller har haft sommerfugleudslæt og SLE-patienter, der aldrig har haft sommerfugleudslæt og 3) hvorvidt der også er forskel på i hvilken grad vtRNA2-1 transskriberes i ovennævnte to tilfælde.

Dette gøres for at belyse hypotesen, at vtRNA2-1 er udpræget hypomethyleret hos SLE-patienter med sommerfugleudslæt i anamnesen, og at transskriptionen af genet korrelerer med methyleringsgraden.

Metodevalg, teori og empiri

DNA methylering

DNA methylering foregår, når der tilføjes en methylgruppe til nukleotidet cytosin i eukaryot DNA af enzymer kaldet DNA methyltransferase (DNMT), således at nukleotidet ændres til 5-methylcytosin. Denne ændring forhindrer RNA-polymerasen i at aflæse det nærliggende gens nukleotidrækkefølge, som altså ikke bliver transskriberet. Genet er således inaktiveret. Ligeledes kan 5-methylcytosin demethyleres af enzymer kaldet demethylaser, hvorved genet aktiveres (Phillips 2008).



Prøver

De til projektet planlagte prøver er i forvejen indsamlet af Ph.D.-studerende Constance Jensina Ulf-Møller i forbindelse med hendes igangværende Ph.D.-projekt (Bilag 3).

Fra prøverne er fire slags immunceller, granulocytter, CD14+ monocytter, CD4+ T-celler og CD19+ B-celler isoleret og sorteret. Det DNA og RNA som undersøges i dette projekt er desuden på forhånd oprenset i forbindelse med samme Ph.D.-projekt.

Af økonomiske og overskuelighedsmæssige årsager undersøges der i dette projekt kun DNA og RNA fra en enkelt celletype. Renauer et al. kiggede også kun på en enkelt celletype, nemlig naive T-celler (Renauer et al. 2015). Da det har været svært at isolere tilstrækkeligt mange naive T-celler, fra de prøver der er til rådighed, bruges i stedet DNA fra modne T-celler. Dette vurderes til at være brugbart, selvom der nok vil findes større forskelle i methyleringen prøverne i mellem, end hvis det havde været DNA fra naive T-celler (personlig kommunikation med PhD-studerende Constance Jensina Ulf-Møller).

Bisulfitbehandling

Det oprensede genomiske DNA fra prøverne klargøres til pyrosekventering ved bisulfitmodifikation. (Delaney et al. 2015) (Bilag 4). Ved denne proces behandles DNA med natriumbisulfat hvorved ikke-methyleret cytosin erstattes med nukleotiden uracil. De cytosiner, der i udgangsmaterialet er methyleret påvirkes ikke af behandlingen, og forbliver dermed 5-methylcytosin, og vil fremstå som cytosin, ved senere (pyro)sekventering.

Polymerase Chain Reaction

For at få nok DNA til pyrosekventering, amplificeres det bisulfitbehandlede DNA i en såkaldt polymerase-kædereaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). I PCR udnyttes baseparringsreglen, samt at de forskellige delprocesser, denaturering, annealing og ekstension, alle er afhængige af forskellige temperaturer. PCR kan sædvanligvis køres på mindre DNA-sekvenser, hvilket passer godt med vtRNA2-1, der består af 127 bp samt dens promoter (The Ensembl Genome Browser).

For at reaktionen kan lykkes, skal der tilsættes DNA-nukleotider, DNA-polymerase, buffer og genspecifikke primere. Den ene primer er til dette formål udover at være genspecifik for vtRNA2-1, også biotinyleret (Delaney et al. 2015). Biotinyleringen gør, at kopier af den ene streng af det oprindelige DNA kan isoleres efter PCR. Disse enkeltstregede kopier fungerer som skabeloner i



pyrosekventeringen, hvormed der kun dannes sekvensinformation fra den ene af de to oprindelige streng og dermed også kun information om methyleringen af den ene oprindelig streng.

Idet uracil (bisulfitkonverteret ikke-methyleret cytosin) under PCR'en er blevet erstattet med thymin, vil alle cytosiner i endelige sekvens have været methylerede i den oprindelige DNA-prøve (Delaney et al. 2015).

Pyrosekventering

I dette projekt benyttes pyrosekventering til at sekventere DNA'et fra prøverne, da metoden er billigere, hurtigere og teknisk mere overskuelig end fx High resolution melting (HRM) eller Sanger-sekventering (Delaney et al. 2015) (Bilag 5).

I pyrosekventering benytter man en metode, der kaldes "sequencing-by-synthesis". En sekvensprimer, enzymerne DNA-polymerase, ATP-sulfurylase, luciferase og apyrase og substraterne APS og luciferin blandes med den enkeltstrengede DNA-skabelon (fremstillet ved PCR).

Til denne blanding tilsættes de fire DNA-nukleotider skiftevis. Hvis en tilsat nukleotid passer med den første base på DNA-skabelonen, sættes den her på af DNA-polymerase under frigivelse af stoffet pyrofosfat (PPi). ATP-sulfurylase omdanner herefter PPi og APS til ATP. ATP kan sammen med luciferin, omdannes til affaldsprodukterne AMP og PPi samt oxyluciferinlys, hvilket opfanges af et kamera og omdannes til en graf. Overskydende ATP, PPi, nukleotid osv. fjernes af enzymet apyrase.

Derefter tilsættes en ny nukleotid. Sættes denne ikke på DNA-skabelonen, ses intet lyssignal, basen fjernes af apyrase og der forsøges med en anden nukleotid, indtil et nyt lyssignal registres og omdannes til en ny top på grafen. Der er proportionalitet mellem højden på grafens toppe og antallet af parrede nukleotider, der har skabt lyssignalet. Det vil sige, at hvis der er to ens baser lige efter hinanden i DNA strengen, vil toppen være dobbelt så høj, som hvis der kun er en enkelt base.

Real Time kvantitativ PCR

Real Time qPCR er en metode til bestemmelse af den relative mængde af DNA eller cDNA i en prøve (Bustin 2000). Denne metode er valgt frem for en probebaseret metode fx Taqman assay, som er mere specifik for det enkelte gen, men også væsentligt dyrere.

Først omdannes total-RNA isoleret fra prøverne til cDNA ved hjælp af enzymet *reverse transskriptase* og polydT-primere, hermed opnås cDNA dannelse specifik fra mRNA, idet mRNA har en poly-A-hale. Da cDNA er dannet fra mRNA, antages det i denne metode, at mængden af cDNA



er proportional med mængden af mRNA, og at det dermed kan bruges som mål for, hvor meget et gen i udgangspunktet er transskriberet i en given prøve.

Til kvantitativ PCR tilsættes DNA-nukleotider, genspecifikke primere, DNA-polymerase og buffer til cDNA, som ved almindelig PCR, men desuden tilsættes SYBR-green, som er et stof, der fluorescerer, når det er bundet til dobbeltstrengt DNA (dsDNA). Under den efterfølgende PCR-kørsel måles mængden af fluorescens med et fluorescenskamera, ved fasen ekstension, under hver cyklus. Produktionen af dsDNA kan således følges i reel tid (real time), gennem hele PCR-kørslen.

Da DNA-mængden ved PCR forventes at stige logistisk, forventes fluorescensen i real time qPCR ligeledes at stige logistisk. Den PCR-cyklus, hvor fluorescensmængden passerer en grænseværdi, der er defineret ved den cyklus, hvor stigningen i fluorescens er størst, bruges som et mål for mængden af cDNA i udgangsmaterialet.

For at normalisere den målte mængde af cDNA (og dermed mængden af mRNA i udgangsmaterialet), bestemmes den tilsvarende mængde af cDNA fra et eller flere referencegener, og forholdet mellem disse bestemmes.

Projektets udførelse

Fremgangsmåde

Til projektet vil der blive udvalgt prøver fra 20 SLE patienter kendt med sommerfugleudslæt i anamnesen, 20 SLE patienter uden lupusudslæt i anamnesen og 20 raske kontrolpersoner matchet efter køn, alder, rygning og etnicitet.

Pyrosekventering

Først designes et assay, til pyrosekventeringsmaskinen, på computeren.

Oprenset DNA bisulfitbehandles. Der køres elektroforese på det bisulfitbehandlede DNA for at kvalitetstjekke konverteringen.

Derefter findes en genspecifik, biotinyleret primer samt en almindelig genspecifik primer, så genet vtRNA2-1 kan amplificeres ved PCR. Når genet er amplificeret for alle prøverne kvalitetstjekkes PCR-produktet ved gelelektroforese. De enkeltstrengede DNA-skabeloner fra PCR-produktet, som er nødvendige for pyrosekventeringen, isoleres nu strepavidinkoblede sepharose beads, og klargøres til pyrosekventering.



Prøverne analyseres i en pyrosekventeringsmaskine, hvor der kan køres op til 96 prøver ad gangen. Dette tager højst et par timer, men er meget afhængigt af sekvensens længde, og variationer i nukleotidrækkefølgen.

Herefter kan resultatet analyseres, for at be- eller afkræfte hypotesen om, at hypomethylering af genet specifikt knytter sig til SLE-patienter med sommerfugleudslæt anamnesen.

Endelig kan det undersøges, om der er nogle SLEpatienter, der skiller sig ud, og om dette evt. kan forklares udfra SLE-patientens sygdomshistorien.

Real time q-PCR

Først udvælges de rette referencegener (i dette tilfælde tre), og de rette genspecifikke primere for vtRNA2-1 og referencegenerne findes eller designes. Som udgangsmateriale bruges oprenset total RNA. Dette omdannes til cDNA ved brug af RT kit (fx iScript). Efterfølgende foretages realtime qPCR med de genspecifikke primere, for vtRNA2-1 og referencegenerne. Antallet af cykler, fluorescensen i PCR-produktet har brugt på at nå grænseværdien, bruges efterfølgende i relation til referencegenerne, til at udregne i hvilket grad vtRNA2-1 var transskriberet i udgangsmaterialet.

Resultaterne analyseres, for at be- eller afkræfte hypotesen, om at transskriptionen af genet korrelerer med metyleringsgraden.

Faser

Første fase – Indledende fase (2 uger)

I denne fase skal jeg starte projektet op. Jeg skal bl.a. have fundet eller designet de genspecifikke primere, jeg skal bruge til kvantitativ PCR og almindelig PCR. Jeg skal også udvælge de rette reference gener til kvantitativ PCR, og så skal jeg have udvalgt de tre gange tyve prøver, der skal undersøges i projektet.

Anden fase –Forsøg (1-2 uger)

I denne fase udføres forsøgene (beskrevet oven for).

Tredje fase – Databehandling (2 uger)

Her analyseres resultaterne fra forsøgene i anden fase, med henblik på at be- eller afkræfte mine hypoteser.



Fjerde fase – Skrive fase (4 uger)

Her sammenfattes resultaterne og analysen fra anden og tredje fase for at videreformidle den viden, der nu er opnået.

Overordnet budget

Udgifter i alt	Pris (kr.)
Bisulfitbehandling	2.927,64
Pyrosekventering (inkl. MSP)	1.750,26
Elektroforese	1.075,00
RT-qPCR	12.696,00
Uforudsete udgifter	1.551,10
Apperatur mv. lånes	0,00
I alt	20.000,00

(se bilag 6 for detalgeret budget)

Konklusion og perspektivering

Det forventes, at projektet bekræfter hypotesen, om at genet vtRNA2-1 er hypometyleret hos SLE-patienter, der har eller har haft sommerfugleudslæt, således at EWAS-fundet af Renauer et al., som netop viste hypometylering af vtRNA2-1 i forbindelse med sommerfugleudslæt, kan bekræftes.

Derudover forventes det at finde korrelation mellem transkriptionen af vtRNA2-1 og metyleringsgraden af dette, så det kan bekræftes at hypometylering af genet vtRNA2-1 er forbundet med øget transskription, og dermed forhøjet ekspresion.

Gennem projektet opnås altså ny viden om metylerings indflydelse på SLE-patogenesisen. Viden som kan være med til at afdække mekanismerne bag udviklingen af SLE, og dermed bruges i jagten på nye, effektive og skånsomme årsagsrettede behandlingsformer.

I videre undersøgelser, kunne man for det første undersøge vtRNA2-1's funktion. Genet har fx vist sig at nedregulere PKR (RNA-dependent protein kinase), hvilket igen regulerer eIF2 α - og NF- κ B-signalveje; disse signalveje er tilsyneladende indblandet i flere andre autoimmune sygdomme.

For det andet kunne man kigge på om differentiell metylering af andre proapoptosegener knytter sig til bestemte symptomer hos SLE-patienter, ligesom det også ville være relevant at undersøge DNA fra andre celler end immunceller, fx fibroblastre, som er involverede i sygdommen.



Endelig vil være relevant at sammenligne differentiell methylering af andre apoptoserelaterede gener i SLE med methylering af de samme gener i såvel kræft, som andre autoimmune sygdomme.

Epigenetik har vist sig at have stor indflydelse på mange andre autoimmune sygdomme. Viden om methylerings indflydelse på SLE-patogenesen vil være en vigtig brik i det puslespil, forskere verden over lige nu forsøger at lægge, for at finde bedre behandling til autoimmune sygdomme, som sklerose, leddegigt og diabetes, hvis årsager endnu er ukendte.

Tak til

Jeg vil først og fremmest rette en stor tak til min forskerkontakt, Constance Jensina Ulff-Møller, Ph.D-studerende ved Københavns Universitet, for hendes hjælp med og engagement i mit projekt. Hun har formået at hjælpe mig, med præcis hvad jeg havde brug for, hvad end det var artikler, kritiske spørgsmål, gode råd eller prøver fra patienter til mit projekt.

Desuden vil jeg gerne takke professor Søren Jacobsen ved Københavns Universitet, for at formidle kontakten til Constance og stille ressourcer og laboratorieudstyr til rådighed.

Den Projekt-forskerspirer-ansvarlige lærer på Aarhus Katedralskole, Anette Gregersen, skal også have tak for at inspirere mig til at deltage i projektet, og senere at holde mig til ilden.

Medspirerne fra mit gymnasium, Arianne Brooks og Malthe Kjær Bendtsen, har været gode sparringspartnere i mit projekt.

Endelig også tak til min familie, for at støtte mig i processen, og særligt min mor for at dele ud af sin forskningserfaring, og for at forsøge at svare på alle mulige og umulige spørgsmål.



Litteraturliste

Artikler:

Absher DM, Li X, Waite LL, Gibson A, Roberts K, Edberg J, Chatham WW, Kimberly RP. Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4+ T-cell populations. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003678. doi: 10.1371/journal.pgen.1003678. Epub 2013 Aug 8.

Altork N, Tsou PS, Coit P, Khanna D, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(8):1612-20.

Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 2005, 2, S4-S11.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.

Coit P, Jeffries M, Altork N, Dozmorov MG, Koelsch KA, Wren JD, Merrill JT, McCune WJ, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poisoning of interferon-regulated genes in naïve CD4+ T cells from lupus patients. *J Autoimmun.* 2013;43:78-84.

Coit P, Renauer P, Jeffries MA, Merrill JT, McCune WJ, Maksimowicz-McKinnon K, Sawalha AH. Renal involvement in lupus is characterized by unique DNA methylation changes in naïve CD4+ T cells. *J Autoimmun.* 2015;61:29-35.

Colin Delaney, Sanjay K. Garg, Raymond Yung. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. *Methods Mol Biol.* 2015;1343:249-64.

Jeffries MA, Dozmorov M, Tang Y, Merrill JT, Wren JD, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Epigenetics.* 2011;6(5):593-601.

Lin SY(1), Hsieh SC, Lin YC, Lee CN, Tsai MH, Lai LC, Chuang EY, Chen PC, Hung CC, Chen LY, Hsieh WS, Niu DM, Su YN, Ho HN. A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity. *Genes Immun.* 2012 Apr;13(3):214-20.

Liu Z & Davidson A. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med.* 2012;18(6):871-82.



Phillips, T. (2008) The role of methylation in gene expression. *Nature Education* 1(1):116

Renauer P, Coit P, Jeffries MA, Merrill JT, McCune WJ, Maksimowicz-McKinnon K, Sawalha AH. DNA methylation patterns in naïve CD4+ T cells identify epigenetic susceptibility loci for malar rash and discoid rash in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med.* 2015;2(1):e000101. doi: 10.1136/lupus-2015-000101. eCollection 2015.

Treppendahl MB, Qiu X, Søgaaard A, Yang X, Nandrup-Bus C, Hother C, Andersen MK, Kjeldsen L, Möllgård L, Hellström-Lindberg E, Jendholm J, Porse BT, Jones PA, Liang G, Grønbæk K. Allelic methylation levels of the noncoding VTRNA2-1 located on chromosome 5q31.1 predict outcome in AML. *Blood.* 2012;119(1):206-16.

Zouali M. Epigenetics in lupus. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1217:154-65.

Internetsider:

Den danske SLE, LED og Lupus webside. Besøgt d. 25/10/15.

[http://www.sle.dk/article/vidensbank/systemisk-lupus-erythematosus-\(sle\).aspx](http://www.sle.dk/article/vidensbank/systemisk-lupus-erythematosus-(sle).aspx)

The Ensembl Genome Browser. Besøgt d. 23/10/15.

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene

Forsidebillede:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_methylation.jpg



Bilag 1 – Tabel: Oversigt over methylering af apoptoserelaterede gener

Artikel nr.	1	2	3			4			5		6	7	
Gennavn	Hvide blodlegmer	CD4+	T-cells	B-cells	Monocyt.	Malarrash	Discoid	Alm. SLE	Nephritis	Alm. SLE	T-celler	DSSc	ISSc
Casp 1	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	hypo	0
Card15	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
FasLG	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
KNDC1	.	0	0	0	0	.	hypo	.	0	0	0	0	0
MIR 16	hypo	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
MIR886/vtRNA2-1	.	0	0	0	0	hypo	.	.	0	0	0	0	0
PDCD 5	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
PDCD10	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
RHOJ	.	0	0	0	0	.	hypo	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 10	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 10A	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 10B	.	0	hypo	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 10C	.	hyper	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 10D	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 19	.	0	hyper	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 1A (1) ^g	.	0	hyper	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 1A (2) ^h	.	0	hyper	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 1A (3) ⁱ	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 1A (4) ^j	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hypo	0
TNFRSF 1A (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hypo	0
TNFRSF 1B	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 25	.	hyper	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 8	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TNFRSF 9	hypo	0	hypo	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TP 53	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	hypo(AIP1)	hypo (I13)
TP 53RK	hypo	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
TP 73	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
Trim 14 (1) ^a	.	0	hyper	hyper	hyper	.	.	.	0	0	0	0	0
Trim 14 (2) ^b	.	0	hypo	0	hypo	.	.	.	0	0	0	0	0
Trim 22 (1) ^c	.	0	hypo	hypo	0	.	.	.	0	0	0	0	0
Trim 22 (2) ^d	.	0	hypo	hypo	hypo	.	.	.	0	0	hypo	0	0
Trim 25	.	0	hypo	hypo	0	.	.	.	0	0	0	hyper	0
Trim 29	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
Trim 31	.	0	0	0	0	.	Hyper	.	0	0	0	0	0
Trim 5	.	0	0	0	0	.	.	Hypo	0	0	0	0	0
Trim 52	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
Trim 69	.	0	0	0	0	hypo	.	.	0	0	0	0	0
Trim 71	.	0	hyper	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 148	.	0	hypo	hypo	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 207	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 210	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 264	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 276	.	0	hyper	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 281	.	0	hypo	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 282	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 296	.	0	hypo	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 3	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 322 B	.	hyper	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 343	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 385A	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 559	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 575	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 581	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 609 (1) ^e	.	0	hyper	0	0	.	.	.	hyper	0	0	0	0
ZNF 609 (2) ^f	.	0	hyper	hyper	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 622	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 644	.	0	hyper	0	0	.	.	.	hyper	0	0	0	0
ZNF 668	.	0	hyper	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 692	.	0	hyper	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF 714	.	0	0	0	0	.	Hyper	.	0	0	0	hypo	0
ZNF 8	.	hypo	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF N1A1	.	0	0	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0
ZNF X1	.	0	hypo	0	0	.	.	.	0	0	0	0	0

0: ikke differentielt methyleret

.: ikke tilstede i tilgængeligt materiale

Kolonne A indeholder forskellige proapoptotiske gener

a) cg11317199, b) cg01765174, c) cg12461141, d) cg26724018, e) cg04192168, f) cg08462055, g) cg08418872, h) cg00973289, i) cg09043214, j) cg23752651.



Artikel 1: Lin et al. 2012: 12 x SLE og 12 x kontroller, følges op med 66 x SLE og 112 x kontroller. DNA fra hvide blodlegmer. Man fandt 2165 differentielt methylerede gener. Der er søgt i top 250.

Artikel 2: Jeffries et al. 2011: 12 x SLE og 12 x kontrol. DNA fra CD4+ T-celle. Man fandt 341 differentielt methylerede gener (236 hypo og 105 hyper).

Artikel 3: Absher et al. 2013: 49x SLE og 58 kontroller, DNA fra 3 forskellige celletyper (CD4+ T-celler, CD19+ B-celler og CD14+monocyttter). Der blev fundet 1033 differentielt methylerede T-celler, 166 B-celler og 97 monocytter.

Artikel 4: Renauer et al. 2015: 3 SLE-grupper (malarrash, discoid rash og alm. SLE) og kontroller. DNA fra CD4+ T-celler. Fra dette studie er alle resultaterne tilsyneladende ikke offentliggjort endnu. I en tabel over de mest markant differentielt methylerede gener, fandt jeg RHOJ, som mener også kan have indflydelse på apoptose.

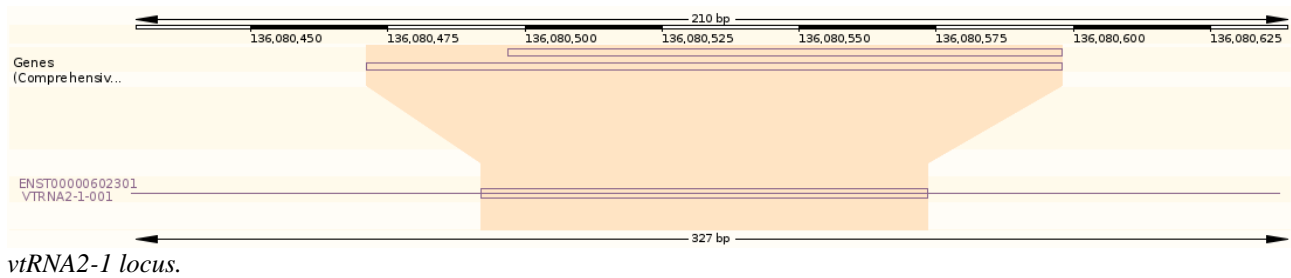
Artikel 5: Coit et al. 2015: 28xSLE uden nephritis-historie + 28xSLE med nephritis-historie + 56 alders-, køns og etnisitets-matchedde kontroller. DNA fra CD4+ T-celler. Der blev fundet 191 CG-steder og 121 gener der kun var differentielt methyleret for tidligere eller nuværende nephritis patienter.

Artikel 6: Coit et al. 2013: 18x SLE (kvinder) og 18xkontrol (kvinder). DNA fra CD+ T-celler. 86 differentielt methylerede steder, 60x hypo + 26x hyper.

Artikel 7: Altorok et al. 2015: 6xbegrænset sklerose, 6xdiffus sklerose, 12xkontrol. DNA fra fibroblastre.



Bilag 2 – Figur: vtRNA2-1 locus



Fra: The Ensembl Genome Browser.



Bilag 3 – Studiedesign og prøver for Constance Jensina Ulf-Møllers PhD-projekt (baggrundsprojekt)

Studiedesign

I den forbindelse er der blevet indsamlet blodprøver fra 85 SLE patienter og 27 raske kontrolpersoner og patienterne er blevet vurderet klinisk. Kun patienter som har opfyldt internationale ACR eller SLICC kriterier for SLE er blevet inkluderet, og patienter som har haft kræft eller aktiv infektion er blevet ekskluderet. SLE patienterne er matchet med kontrolpersonerne på køn, alder og rygning.

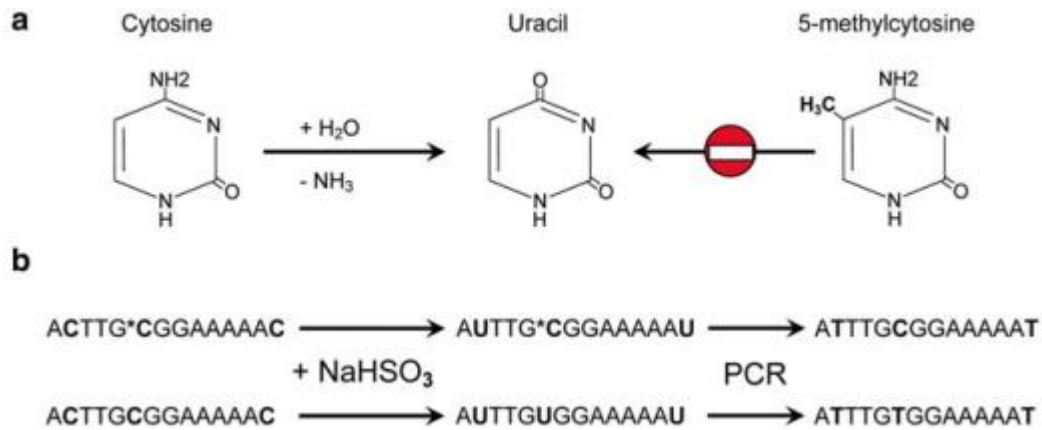
Prøver

Blodprøver fra cases og kontroller er blevet behandlet ved Ficoll densitetscentrifugering, og neutrofile granulocytter og mononukleære celler er blevet isoleret. Herefter er de mononukleære celler blevet frosset ned levende. Efter alle prøverne er blevet indsamlet er de mononukleære celler blevet tøet op igen og sorteret i CD19+ B-celler, CD14+ monocytter og CD4+ T-celler vha. en RoboSep. Efterfølgende er der ekstraheret DNA og RNA fra granulocytter, B-celler, monocytter og CD4+ T-celler vha. AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kittet (Qiagen).

Af: Constance Jensina Ulf-Møller



Bilag 4 – Figur: Bisulfitkonvertering

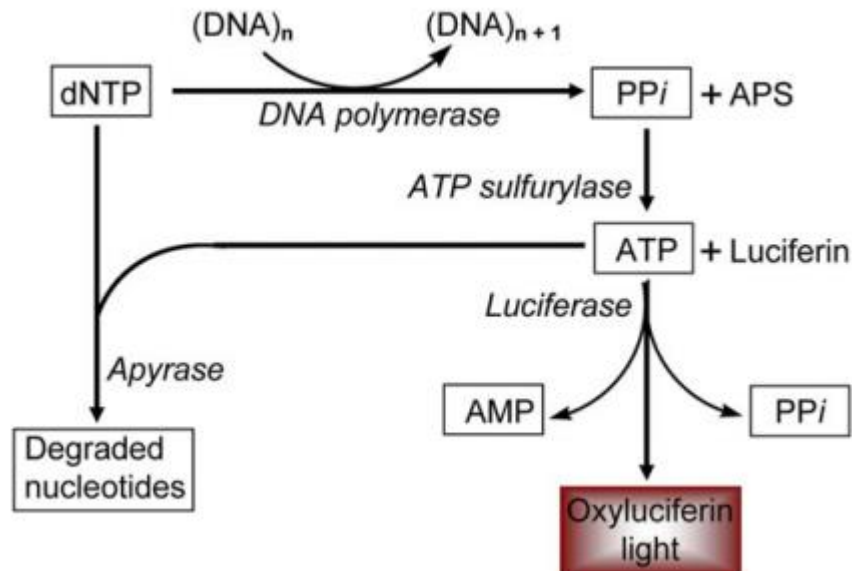


Deaminering af cytosin via natriumbisulfitkonvertering. a) Methylering af det 5 carbonatom i cytosin forhindrer deaminering af cytosin til uracil. b) Methyleret (foroven) og umethyleret (forneden) DNA bisulfitbehandles.

Fra: Delaney et al.



Bilag 5 – Figur: Pyrosekventering



Enzymkaskadesystem i pyrosekventering. Enzymer er markeret med kursiv.

Fra: Delaney et al.



Bilag 6 – Tabel: Detaljeret budget

	Bisulfitbehandling/gen/prøve	Pris (kr.)
	Bisulfitbehandlingskit (pr. 48 prøver)	975,88
	Pris for 2 kits (96 prøver)	<u>1.951,76</u>
	Pyrosekventering pr. gen pr. prøve	Pris (kr.)
	Biotinprimer og PCR primerere	3,45
	dNTPs, enzym og substrat	13,00
	Pyromark PCR kit	8,40
	Cartridge	1,30
	Plates	0,58
	Vaske-, bindings- og annealingbuffer	0,30
	Sepharose beads	1,20
	Sum	<u>28,23</u>
	Pris x prøver	I alt (kr.)
Kontrolprøver	28,23 kr. x 2 kontroller	56,46
Prøver	28,23 kr. x 60 prøver	1.693,80
Sum		<u>1.750,26</u>
	Elektroforese	Pris (kr.)
	Agarose	470,00
	Ethidium Bromide Solution	605,00
	Sum	<u>1.075,00</u>

Forsættes næste side...



	RT-qPCR pr. gen pr. prøve	Pris (kr.)
	SYBR green master mix	4,00
	PCR primers	0,10
	PCR plate	0,80
	RT kit	48,00
	Sum	<u>52,90</u>
Gen	Antal	
Referencegen	3	
vtRNA2-1	1	
Sum	4	-
	Pris x prøver x gener	I alt (kr.)
Prøver	52,9 kr.*60 prøver*4 gener	<u>12.696,00</u>
	Uforudsete udgifter	<u>1.551,10</u>
	Udgifter i alt	Pris (kr.)
	Bisulfitbehandling	2.927,64
	Pyrosekventering (inkl. MSP)	1.750,26
	Elektroforese	1.075,00
	RT-qPCR	12.696,00
	Uforudsete udgifter	1.551,10
	Apperatur mv. lånes	0,00
	I alt	<u>20.000,00</u>