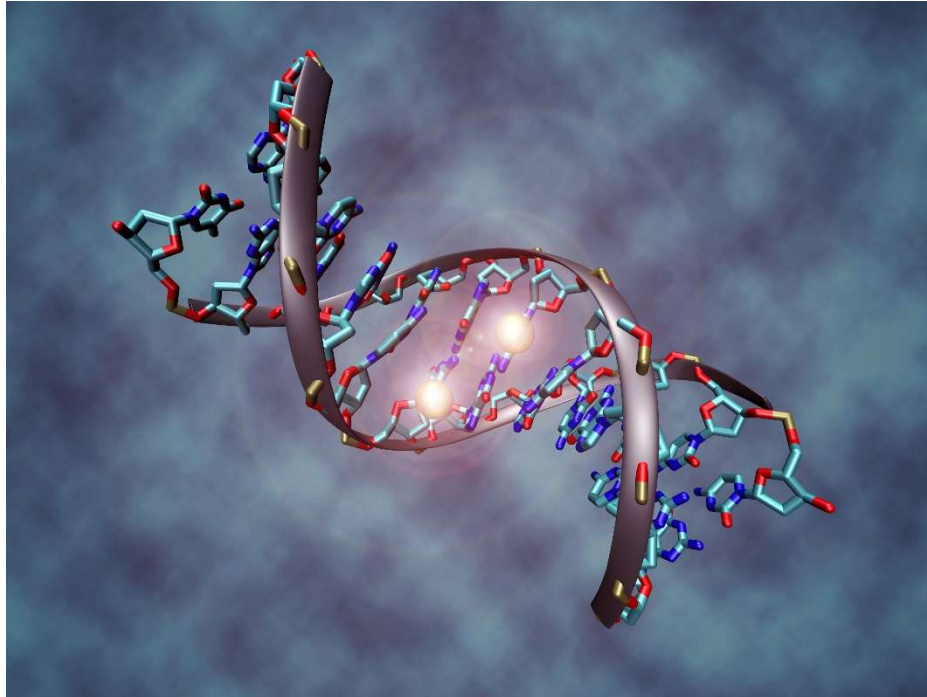


DNA methylering i GNAS1-genet



Mia Rauff

Vejle Tekniske Gymnasium

Projekt forskerspirer 2017

Sundhedsvidenskab

Indhold

Indledning.....	3
Afgrænsning og problemformulering.....	3
Metodevalg og teori.....	4
DNA-methylering.....	4
Metodevalg.....	4
Projektets udførelse.....	4
Fase 1 Indledende fase:.....	4
Fase 2 Metode:.....	4
Fase 3 analyse:.....	5
Fase 4 databehandling og skrivefase:.....	5
Budget.....	5
Perspektivering.....	6
Tak.....	6
Litteraturliste.....	7

Indledning

Min ide til at lave det her projekt kommer fra, at min far som har en sygdom kaldet fibrøs dysplasi på dansk og på engelsk hedder den "fibrous dysplasia". Fibrøs dysplasi er en medfødt dysplastisk knoglelidelse. Dysplasi: forstyrrelse af cellers normale vækst, hvorved der optræder forandringer i cellernes udvikling, størrelse, udseende og organisering i væv eller organer). Tilstanden er kendetegnet ved ovennævnte dysplastiske knogleforandringer. Tilstanden skyldes en genmutation (fejl i dnakode på GNAS1-genet) og er præget af knogledeformiteter, som skyldes, at knogle omdannes til bindevæv hvilket gør knoglerne både skrøbelige og deforme. Sygdommen rammer enten en (monostotisk) eller flere knogler (polyostotisk), hvoraf ribbenene (hyppigst bliver ramt), knoglerne i kraniet, benene, overarmene samt bækkenet. Hvis knogler i kraniet ramt, kan der opstå nedsat hørelse og påvirket syn. Sygdommen forekommer 10 gange hyppigere hos kvinder end hos mænd og er normalt ikke arvelig. Fibrøs dysplasi er sygdom som i min fars tilfælde gør at hans ene kæbeknogle bliver ved med at vokse, hvilket har gjort han hele liv har set anderledes ud i forhold til andre. I de senere år er jeg blevet mere interesseret i hvad der forårsager sygdommen. I den forbindelse fandt jeg ud af at fibrøs dysplasi stammer fra en genmutation i GNAS1-genet. Studier har vist at genet GNAS1 er blandt en af de mest komplekse eukaryote gener i mennesker og mus (Mantovani, Lania, & Spada, 2010). En genmutation GNAS1-genet kan medføre til forskellige sygdomme, som fibrøs dysplasi (Lee m.fl., 2012), Albright-McCune syndrom (Hayward m.fl., 2001) og Albright hereditary osteodystrophy (Rickard & Wilson, 2003).

Afgrænsning og problemformulering

GNAS1-gent er et kompleks gen, i GNAS1-genet er der 3 muligheder for forskellige genvarianter og dermed forskellige proteiner. Jeg har valgt at jeg vil gå ind og kigge på de personer som har en sygdom som stammer fra et ikke funktionelt GNAS1-gen, men hvor der ikke kan findes den ansvarlige genmutation (Lee m.fl., 2012). Dette kan skyldes, at GNAS1-genet ikke er åbnet/aktivt men lukket ned via den epigenetiske mekaniske, det kaldes DNA methylering og ikke via mutationer i selve genet. De forskellige varianter af GNAS1-genet har alle en CpGø, som er et område i genomet, hvor der er en høj koncentration af CG dinukleotider. Det er i disse områder, der kan måles, om der er methylgrupper på cytosiner (DNA methylering), som kan lukke genet ned ved at forhindre gen transskription.

I denne synopsis vil jeg beskrive et forskningsprojekt, der vil forsøge at besvare Problemformuleringen:

"Med udgangspunkt i forsøg med forskelligt patientvæv vil jeg undersøge hvilken af de 3 CpGø der er methyleret (inaktiv-silenced) og hvilken, umethyleret (åben/aktiv)"

Min hypotese lyder, at den ansvarlige genmutation ikke kan findes, da GNAS1-genet er lukket ned via DNA methylering i genet.

Formålet med mit projekt er at finde ud af om GNAS1-genet er lukket og det dermed er grunden til at der derfor ikke altid kan findes den ansvarlige genmutation i GNSA1-genet.

Metodevalg og teori

DNA-methylering

DNA methylering forekommer, når der tilføjes en methylgruppe til nukleotidet cytosin i eukaryot DNA af enzymer kaldet DNA methyltransferase (DNMT), sådan at nukleotidet ændres til 5-methylcytosin. Denne ændring forhindrer RNA-polymerasen i at aflæse det nærliggende gens nukleotid rækkefølge, som derfor ikke bliver transskriberet. Genet er derfor inaktivt-silenced. På samme måde kan 5-methylcytosin demethyleres af enzymer kaldet demethylaser, hvorved genet aktiveres (Phillips, 2008) .

Metodevalg

Grunden til at jeg har valgt at bruge PCR er at methylation marks fjernes fra genomic DNA af DNA polymerase og ikke bliver repliceret i løbet af PCR amplifikation. DNA template har brug for at blive kemisk modificeret med brug af sodium bisulfite til at bevare methylation informationer før PCR amplifikation. Sodium bisulfite forandrer umethyleret cytosiner til uracil hvorimod 5-methylcytosiner er resistente over for den modificering (Wojdacz, Dobrovic, & Hansen, 2008). Jeg har valgt at bruge metoden methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM), da det er den metode der er bedst af de forskellige muligheder indenfor PCR. Der findes også en metode som hedder methylation-specific PCR (MSP), den er simpel og let at udføre hvilket har gjort MSP til mest udbredte metode til at undersøge methylering i DNA. Men den metode har tilbøjelighed til at give falske positive resultater (Wojdacz & Hansen, 2006). Derfor har jeg valgt den anden metode MS-HRM. For at kunne lave forsøget vil det kræve etisk tilladelse, da jeg skal bruge patientvæv fra personer ramt af en af de forskellige sygdomme man kan få.

Projektets udførelse

Fase 1 Indledende fase:

I denne fase vil jeg starte projektet op. Jeg skal have skaffet patientvæv fra patienter, som er ramt af en af de forskellige sygdomme man kan få via genet.

Fase 2 Metode:

Procedure

Trin 1: ekstrahere DNA template ved brug af hvilken som helst metode til at ekstrahere DNA template.

Trin 2: modificere DNA ved brug af sodium bisulfite, som beskrevet i (Herman, Graff, Myöhänen, Nelkin, & Baylin, 1996).

Trin 3: forberede følgende reaktions mix til at forstærke sodium bisulfite modificeret DNA (Wojdacz m.fl., 2008).

Trin 4: forstærke DNA i thermocycler ved brug af følgende cyklus betingelser (Wojdacz m.fl., 2008)

Trin 5: give mulighed for reannealing af PCR produkterne og opnå HRM scanninger ved følgende betingelser (Wojdacz m.fl., 2008)

Fase 3 analyse:

I den her fase vil jeg analysere de resultater jeg har fået. Det kan gøres ved hjælp af noget IT-software, som er udstyret med programmer til formålet.

Fase 4 databehandling og skrivefase:

I denne fase vil jeg sammensætte resultaterne fra fase 1 og 2 og formidle den viden som nu er opnået videre.

Jeg forventer at forsøget vil tage ca. 9 uger at gennemføre.

Tidsramme

Forløb	Varighed
Indledende fase	1-2 uger
Metode	2 uger
Analyse	1 uge
Databehandling og skrivefase	4 uger

Budget

Priser for optimering af 3 essays:

Udgift	Beløb
1 stk. DNA methylation kit (Zymo)	4600 kr.
1 stk. Universal metnylated human DNA (Zymo)	1485 kr.
1 stk. Epiect control DNA (Qiagen)	1800 kr.
1 stk. LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	3862 kr.
LightCycler® 480 Multiwell Plate	2900 kr.
Pipettespidser	800 kr.
Andet plasticvare	200 kr.

	Beløb I alt
	15647 kr.

Rest beløbet vil blive brugt til uforudsete udgifter.

Perspektivering

Det forventes at projekt bekræfter min hypotese om, at den ansvarlige genmutation ikke kan findes, da GNAS1-genet er lukket ned via DNA methylering i genet. Da DNA methylering ofte er skyld i at et gen er lukket ned, men det vides ikke om det er tilfældet i GNAS1-genet. Med mit projekt ønsker jeg at bidrage til forskning inden for GNAS1-gent da der er mange muligheder inden for dette.

Med projektet ønsker jeg at bidrage til videreforskning inden for mutationer, da man ved at forske inden for dette gen kan finde årsager til andre lignende sygdomme.

Genet forbindes med forskellige tumorer, og ved at undersøge dette gen kan man finde ud af hvordan kræft kan opstå ved DNA-methylering.

Tak

Jeg vil bringe en stor tak til min forskerkontakt Lise Lotte Hansen, Århus universitet for den stor hjælp hun har givet meget til det her projekt.

Jeg vil også sige tak til forskerpriser koordinatorene på mit gymnasium Dorte Lind Damkjær og Peter Ruby Schmidt.

Også tak til mine medspirer fra mit gymnasium som har været sparingsparterne i løbet af projektet.

Til sidst vil jeg gerne takke min veninde for at læse og rette min synopsis igennem.

Litteraturliste

Hayward, B. E., Barlier, A., Korbonits, M., Grossman, A. B., Jacquet, P., Enjalbert, A., & Bonthron, D. T.

(2001). Imprinting of the Gsa gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *Journal of Clinical Investigation*, 107(6), R31–R36.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9821–9826.

Lee, S. E., Lee, E. H., Park, H., Sung, J.-Y., Lee, H. W., Kang, S. Y., ... Choi, Y.-L. (2012). The diagnostic utility of the GNAS mutation in patients with fibrous dysplasia: meta-analysis of 168 sporadic cases. *Human Pathology*, 43(8), 1234–1242. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.09.012>

Mantovani, G., Lania, A. G., & Spada, A. (2010). GNAS imprinting and pituitary tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 326(1–2), 15–18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.009>

Rickard, S. J., & Wilson, L. C. (2003). Analysis of GNAS1 and Overlapping Transcripts Identifies the Parental Origin of Mutations in Patients with Sporadic Albright Hereditary Osteodystrophy and Reveals a Model System in Which to Observe the Effects of Splicing Mutations on Translated and Untranslated Messenger RNA. *American Journal of Human Genetics*, 72(4), 961–974.

Wojdacz, T. K., Dobrovic, A., & Hansen, L. L. (2008). Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nature Protocols*, 3(12), 1903–1908. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.191>

Wojdacz, T. K., & Hansen, L. L. (2006). Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay. *BioTechniques*, 41(3), 274, 276, 278.

Internetside:

Phillips, T. (2008). *The Role of Methylation in gene Expression*. Hentet fra Scitable by natureEDUCATION: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-role-of-methylation-in-gene-expression-1070>

Besøgt den 22/10 2017

Forside billede:

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