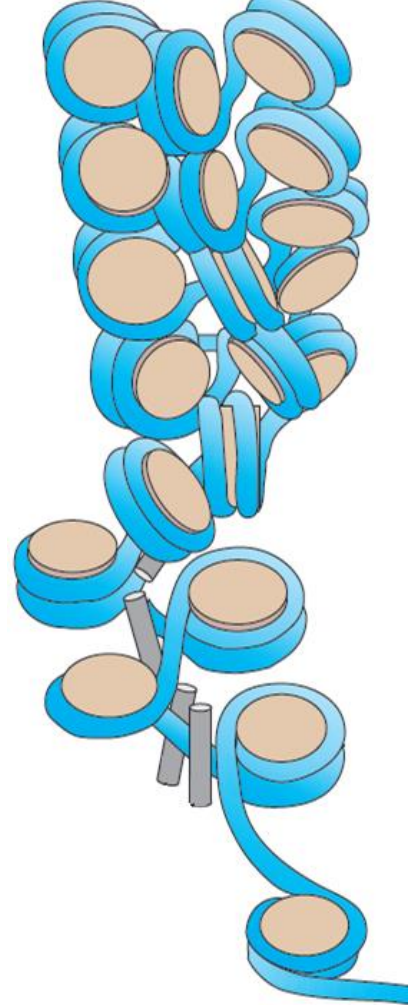
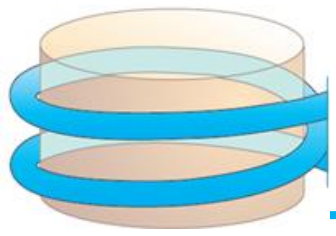


Aplicação de ferramentas de bioinformática ao estudo de metilação de DNA

Dr^a Patrícia Natália Silva

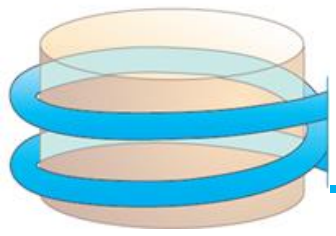
Curso de Introdução à análise bioinformática aplicada à genética





Sumário

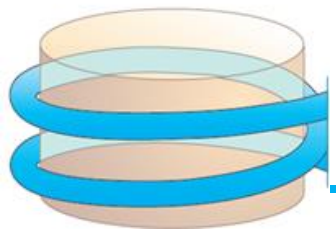
- Conceito de Epigenética
- Mecanismo de metilação de DNA
- Métodos de obtenção DNA metilado:
 - Precipitação com anticorpos
 - Conversão com bissulfito de sódio
- Metodologias para estudo da metilação:
 - Métodos para avaliação de metilação global: *LUMA* e Pirosequenciamento.
 - *Methylation Specific PCR (MSP)*, *High Resolution Melting (HRM)*, Pirosequenciamento, MALDI-TOF, Sequenciamentos de Sanger, NGS e microarray.



Regulação Epigenética

- Epigenética:

“Alterações herdadas, mitoticamente ou meioticamente, na expressão gênica, que não resultaram de modificações na sequência de DNA”



Regulação Epigenética

PROCESSOS NORMAIS FISIOLÓGICOS:

- Desenvolvimento embrionário (embriogênese);
 - Imprinting Genômico
 - Inativação do X
 - Na regulação da expressão gênica
 - Estabilidade dos cromossomos
-
- Modificações estáveis e reversíveis
-
- Presente em plantas, Drosophilas e mamíferos



genome.gov

National Human Genome Research Institute

National Institutes of Health

Google™ Search

SEARCH

Research Funding

Research at NHGRI

Health

Education

Issues in Genetics

Newsroom

Careers & Training

About

For You



[Home](#) > [Research Funding](#) > [Research Funding Divisions](#) > [Division of Genome Sciences](#) > [ENCODE Project](#)

Division of Genome Sciences

[Centers of Excellence in Genomic Science](#) >

[Division Staff](#) >

[ENCODE Project](#) >

[Functional Analysis Program](#)

[Genetic Variation Program](#) >

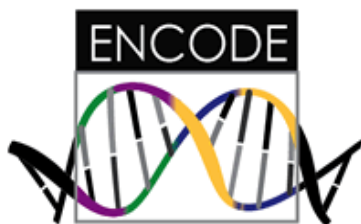
[Genome Informatics and Computational Biology Program](#) >

[Genome Technology Program](#) >

[NHGRI Genome Sequencing Program \(GSP\)](#) >

The ENCODE Project: ENCyclopedia Of DNA Elements

[+ Share](#) [Print](#)




- [Overview](#)
- [Publications, Features and Press Releases](#)
- [Consortium Membership](#)
- [Data Release Policy](#)
- [Accessing ENCODE Data](#)
- [ENCODE Tutorials](#)
- [Common Cell Types](#)
- [Requests for Application \(RFAs\)](#)
- [Program Staff](#)

Follow the ENCODE Project on:

[Facebook](#)

[Twitter](#)

See Also:

[Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project](#) 
Nature, June 13, 2007

[Major Findings from The ENCODE Pilot Project](#)
June 2007

[The modENCODE Project](#)

[Grants Home](#)

On Other Sites:

[The ENCODE \(ENCyclopedia Of DNA Elements\) Project](#),
Science, October 22, 2004

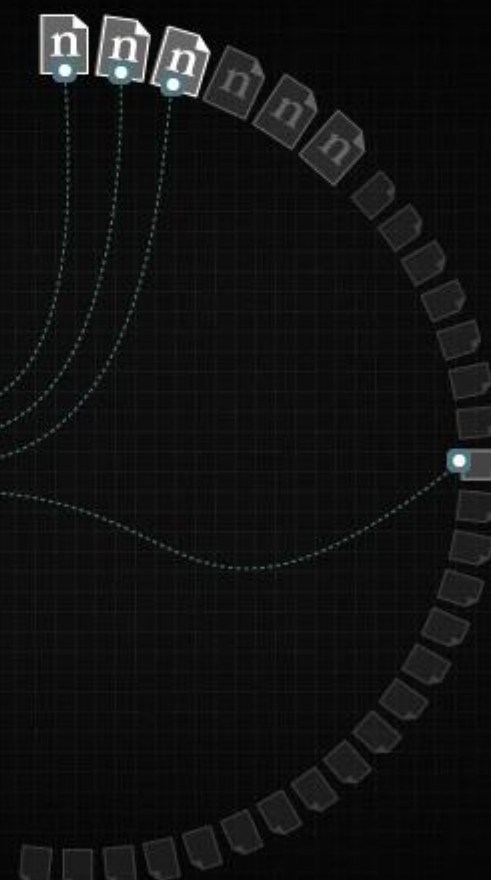


nature ENCODE explorer

THREADS

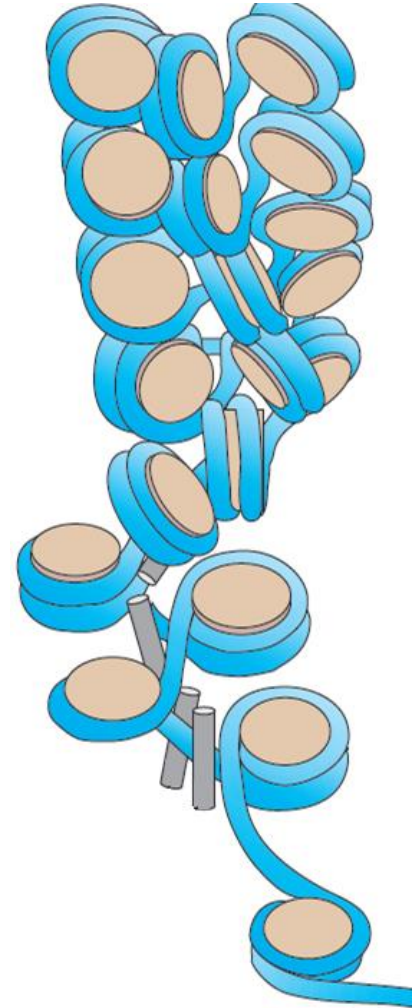


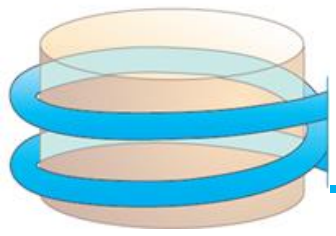
PAPERS



PRODUCED WITH
SUPPORT FROM
illumina

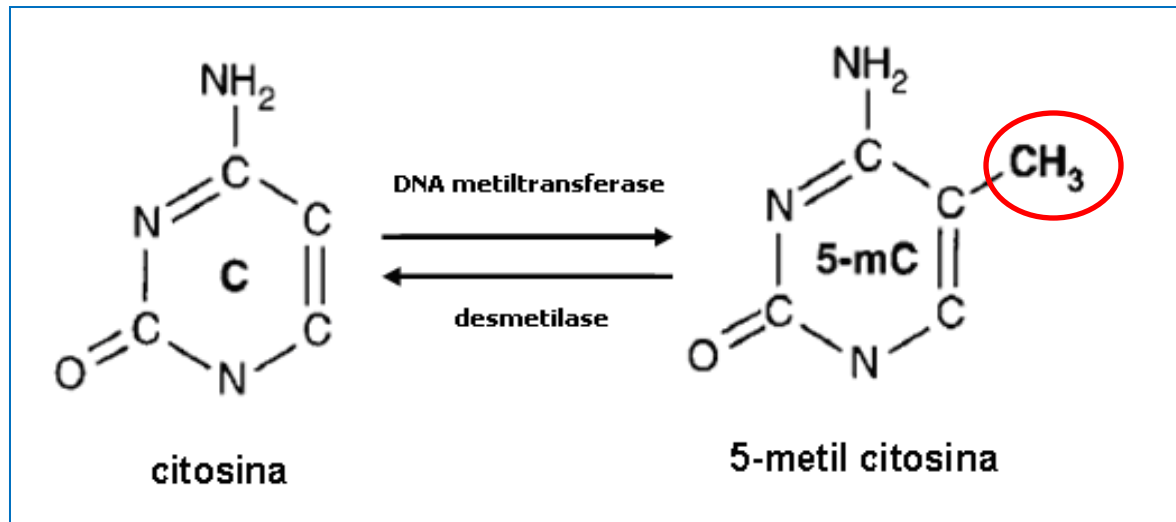
Mecanismo de metilação de DNA

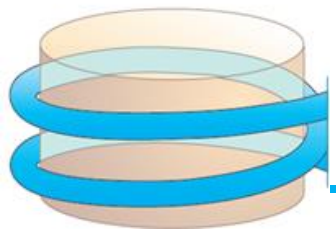




Metilação de DNA

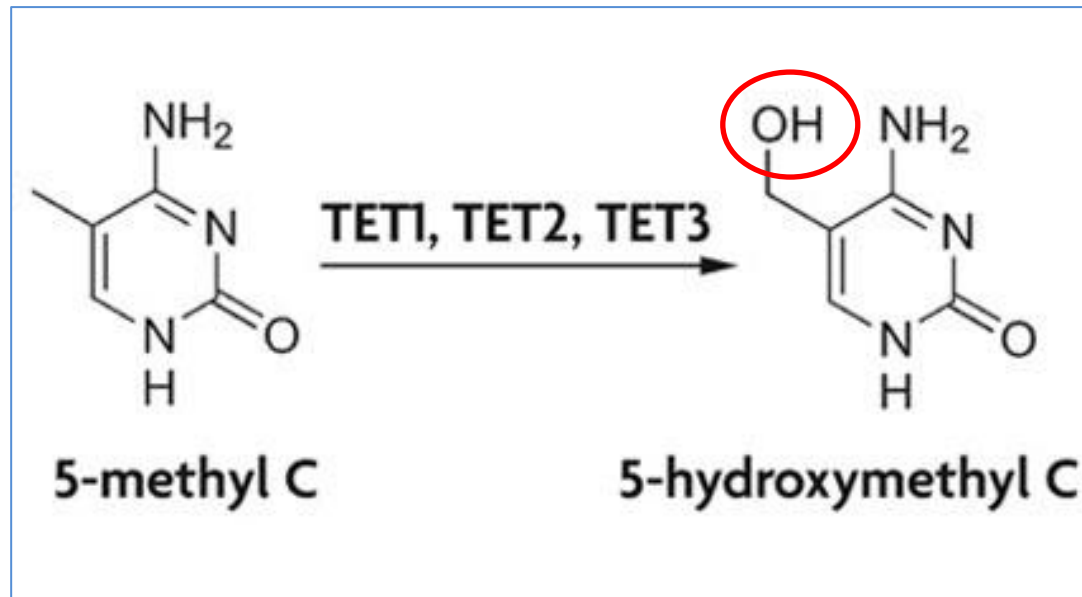
- Modificação epigenética mais estudada em humanos
- Ocorre pela adição de um grupo metil ao carbono 5' do anel pirimídico da citosina

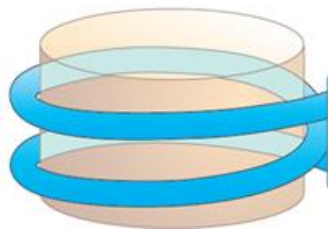




Metilação de DNA

- 5-hydroxy-methylcytosine (5hmC): Produto da oxidação de 5-methylcytosine (5mC)
- Catalizada por uma família de enzimas chamada TET





Metilação de HMC

Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain

Junjie U. Guo^{1,2}, Yijing Su^{1,3}, Chun Zhong^{1,3}, Guo-li Ming^{1,2,3}, and Hongjun Song^{1,2,3}

¹ Institute for Cell Engineering, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

² The Solomon H. Snyder Department of Neuroscience, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

³ Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

Communication

Quantification of the Sixth DNA Base Hydroxymethylcytosine in the Brain†



Martin Münzel Dipl.-Chem.^{1,‡}, Daniel Globisch Dipl.-Chem.^{1,‡}, Tobias Brückl Dipl.-Chem.¹, Mirko Wagner Dipl.-Chem.¹, Veronika Welzmler Dipl.-Chem.¹, Stylianos Michalakakis Dr.², Markus Müller Dr.¹, Martin Biel Prof. Dr.² and Thomas Carell Prof. Dr.¹

Article first published online: 25 JUN 2010

DOI: 10.1002/anie.201002033

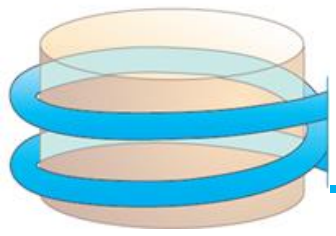
Copyright © 2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Issue



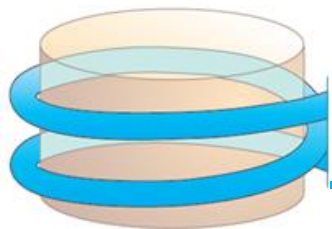
Angewandte Chemie
International Edition

Volume 49, Issue 31, pages
5375–5377, July 19, 2010



Metilação de DNA

- Ilhas CpGs - dinucleotídeos CpG em regiões do genoma ricas em GC
 - Presentes em promotores
 - Regiões do DNA com aprox. 200pb
 - Conteúdo GC maior que 50%
- Outras regiões:
 - Elementos de transposição
 - Atuaria reprimindo seqüências de DNA parasitário, como *transposons* e retrovírus endógenos
 - GpG shores

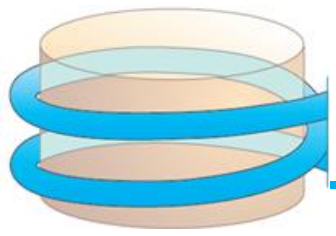


Metilação de sequências repetitivas

nature
genetics

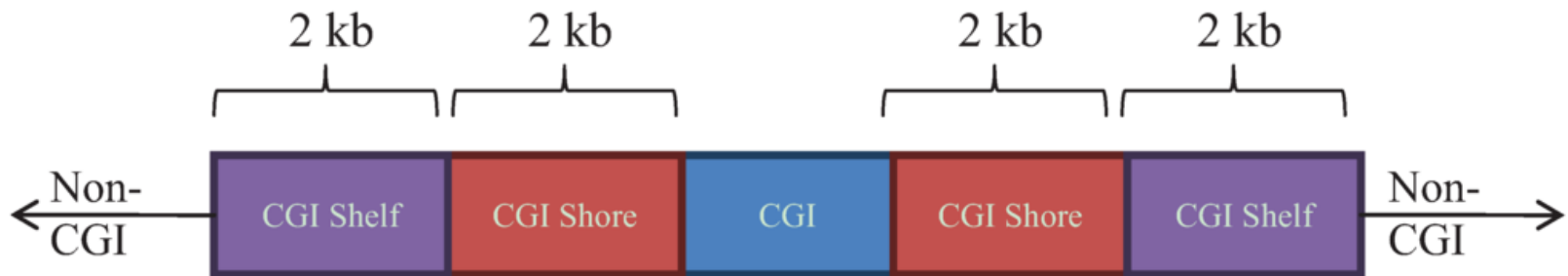
DNA hypomethylation within specific transposable element families associates with tissue-specific enhancer landscape

Mingchao Xie^{1,13}, Chibo Hong^{2,13}, Bo Zhang^{1,13}, Rebecca F Lowdon¹, Xiaoyun Xing¹, Daofeng Li¹, Xin Zhou¹, Hyung Joo Lee¹, Cecile L Maire³, Keith L Ligon^{3,4}, Philippe Gascard⁵, Mahvash Sigaroudinia⁵, Thea D Tlsty⁵, Theresa Kadlec⁶, Arthur Weiss^{6,7}, Henriette O'Geen⁸, Peggy J Farnham⁹, Pamela A F Madden¹⁰, Andrew J Mungall¹¹, Angela Tam¹¹, Baljit Kamoh¹¹, Stephanie Cho¹¹, Richard Moore¹¹, Martin Hirst^{11,12}, Marco A Marra¹¹, Joseph F Costello² & Ting Wang¹



Outos sítios de metilação

- *CpG island shores* – sequências a 2Kb das ilhas CpGs



- Artigos relatam maior quantidade de alterações nas “shores” dos que nas ilhas em si

Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores

[Rafael A. Irizarry](#),^{#1,2,*†} [Christine Ladd-Acosta](#),^{#2,3,*} [Bo Wen](#),^{2,3} [Zhijin Wu](#),⁶ [Carolina Montano](#),^{2,3} [Patrick Onyango](#),^{2,3} [Hengmi Cui](#),^{2,3} [Kevin Gabo](#),^{2,3} [Michael Rongione](#),^{2,3} [Maree Webster](#),⁷ [Hong Ji](#),^{2,3} [James Potash](#),^{2,4} [Sarven Sabuncuyan](#),^{2,5} and [Andrew P. Feinberg](#)^{#2,3,*†}

[Author information](#) ► [Copyright and License information](#) ►

Genome Biol. 2012; 13(6): R43.

Published online Jun 15, 2012. doi: [10.1186/gb-2012-13-6-r43](#)

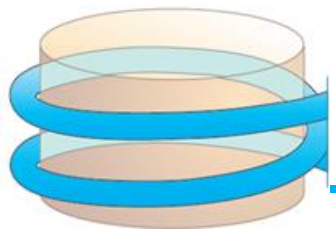
PMCID: PMC3446315

Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood

[Matthew N Davies](#),^{1,2} [Manuela Volta](#),¹ [Ruth Pidsley](#),¹ [Katie Lunnon](#),¹ [Abhishek Dixit](#),¹ [Simon Lovestone](#),¹ [Cristian Coarfa](#),³ [R Alan Harris](#),³ [Aleksandar Milosavljevic](#),³ [Claire Troakes](#),¹ [Safa Al-Sarraj](#),¹ [Richard Dobson](#),¹ [Leonard C Schalkwyk](#),¹ and [Jonathan Mill](#)^{✉1}

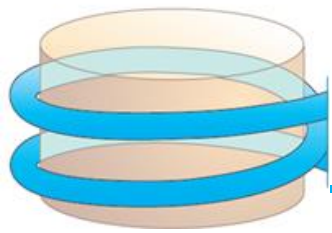
[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

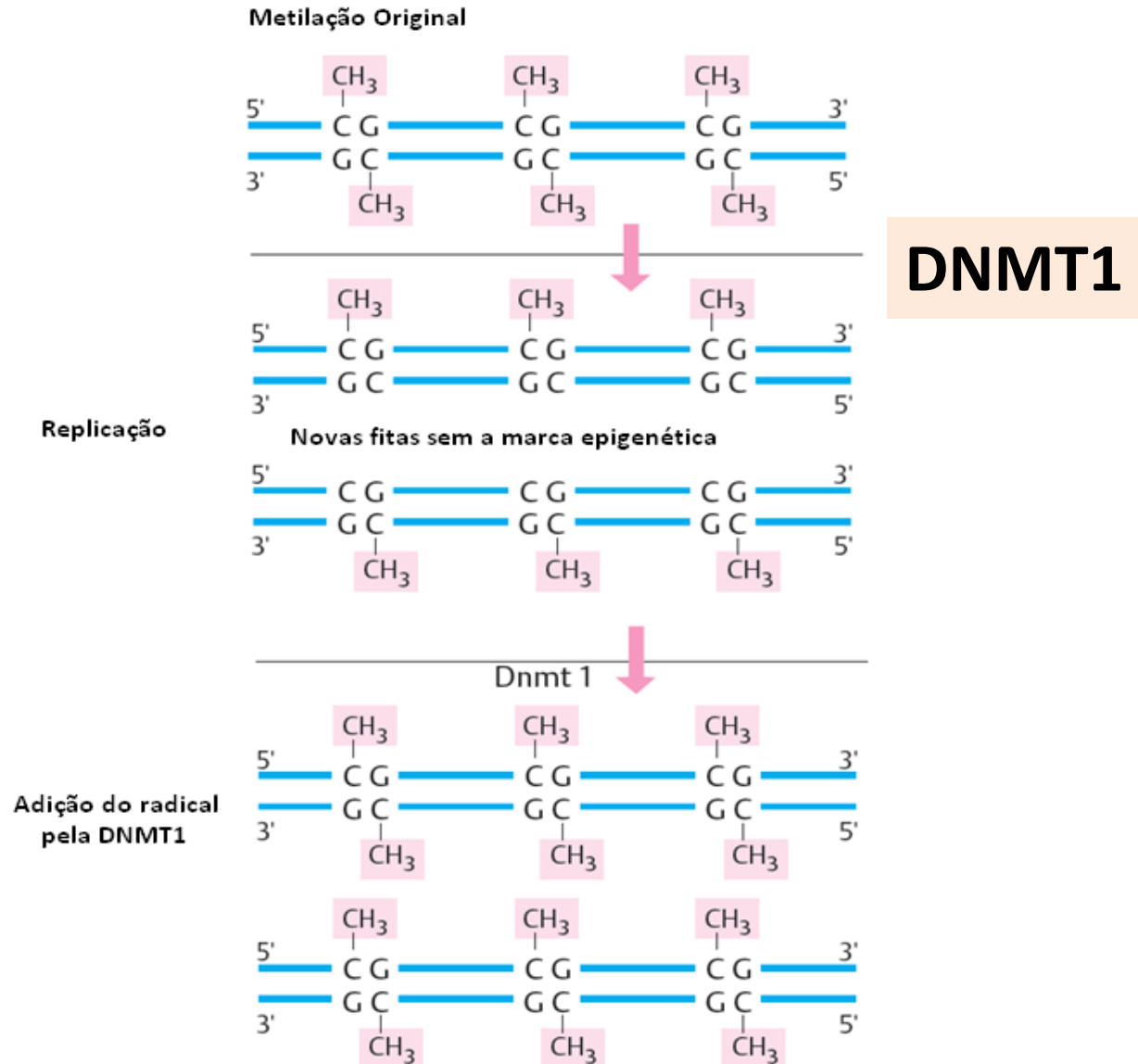


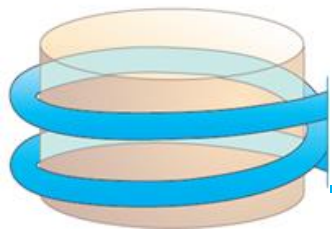
Enzimas de metilação

- Mediadas por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs);
 - DNMT1 – manutenção baseada na replicação dos padrões de metilação
 - DNMT3a e DNMT3b - capazes de promover a metilação *de novo* no DNA



Manutenção da Metilação

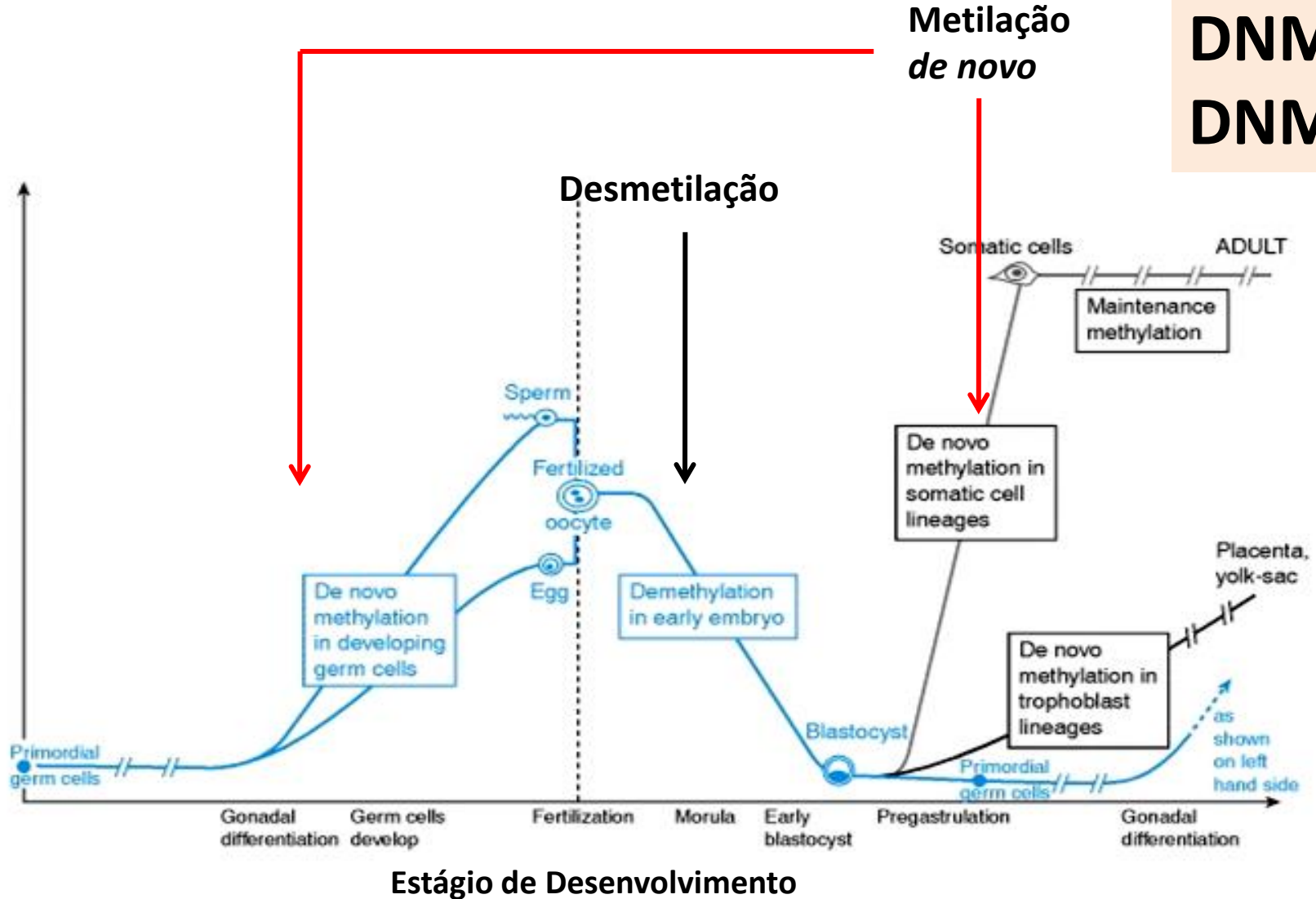


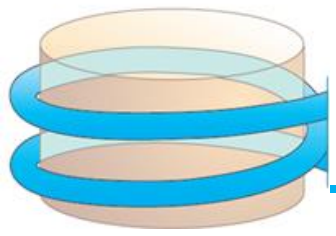


Metilação *de novo*

DNMT3a
DNMT3b

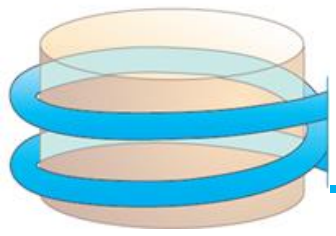
Nível de Metilação





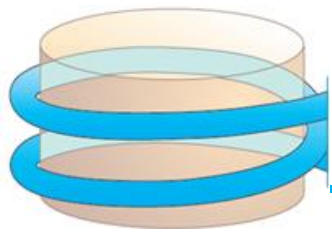
Metilação do DNA

- Distribuição no genoma:
 - Está associada a regiões não codificantes
 - Não em CpG de genes ativos
- Pode inibir a transcrição gênica de 2 maneiras:
 - Pontualmente inibindo fatores de transcrição
 - Compactando a cromatina

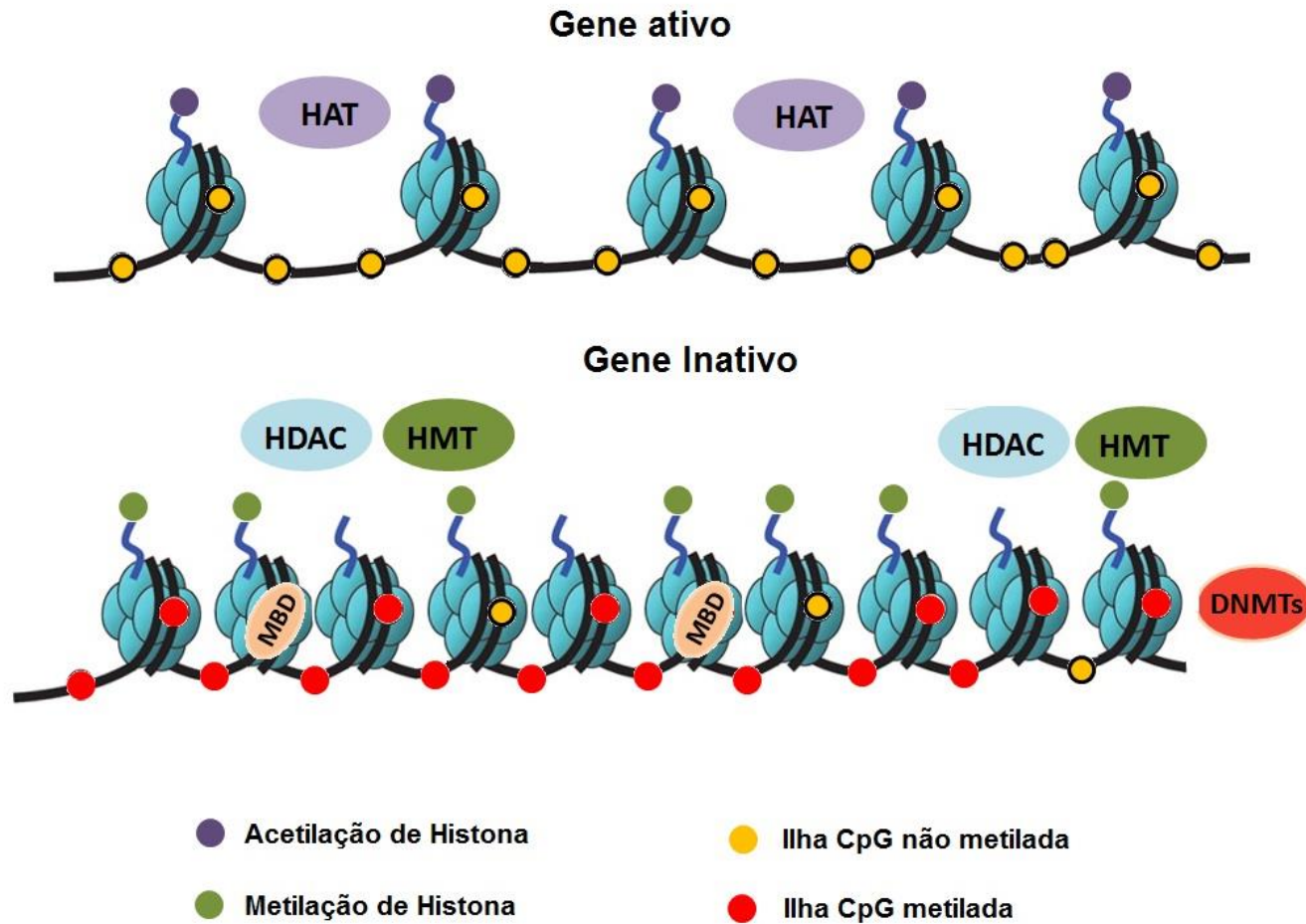


Metilação do DNA

- Pontualmente - inibe a ligação direta de fatores de transcrição ao DNA; como Sp1 (*Specificity protein 1*) e CTF (*CCAAT-binding transcription factor*)
- Além disso, atrai repressores transcrpcionais específicos ao DNA metilado
 - Família MDB (*methyl-binding domain*) - age como repressora, recrutando histonas desacetilases, histonas metiltransferases e proteínas de heterocromatina – compactação



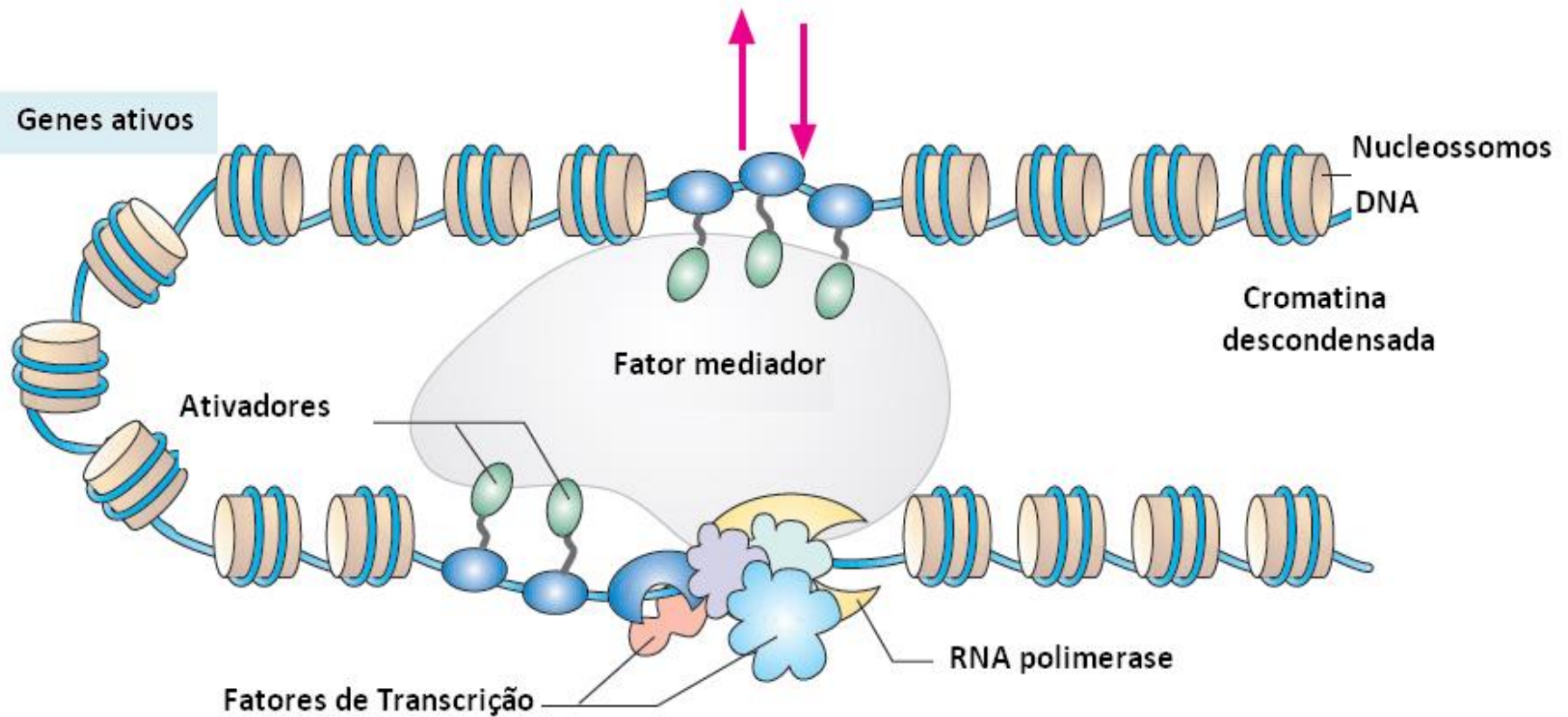
Metilação e Silenciamento Gênico

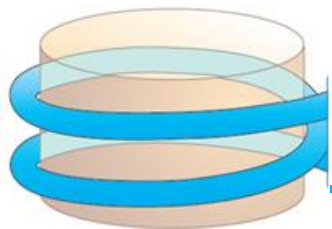


Genes Inativos

Cromatina condensada

Genes ativos





Metilação e Doenças

Gene ativo

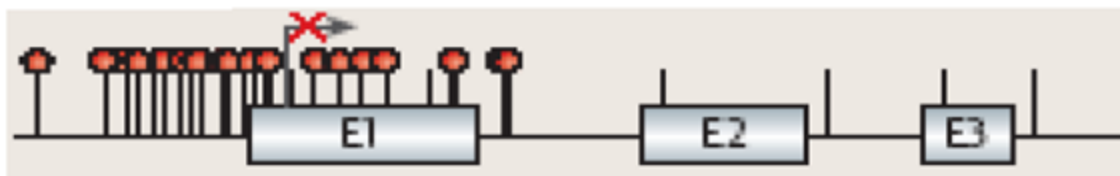


Hipometilação



Hipermetilação

Gene Inativo



| Ilha CpG não metilada

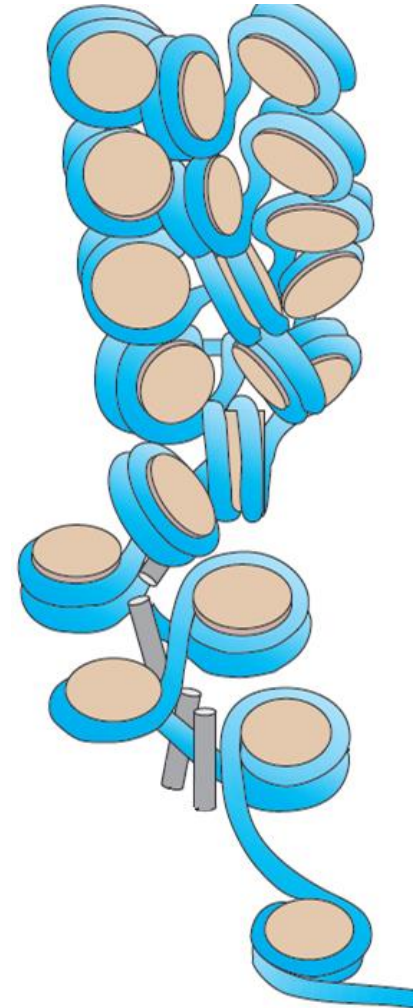
• Ilha CpG metilada

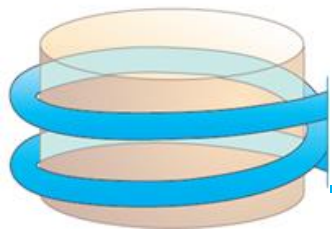
- Perda ou Ganho de função

- Genes supressores tumorais

- Proto-oncogenes = Oncogenes

Métodos de obtenção DNA metilado

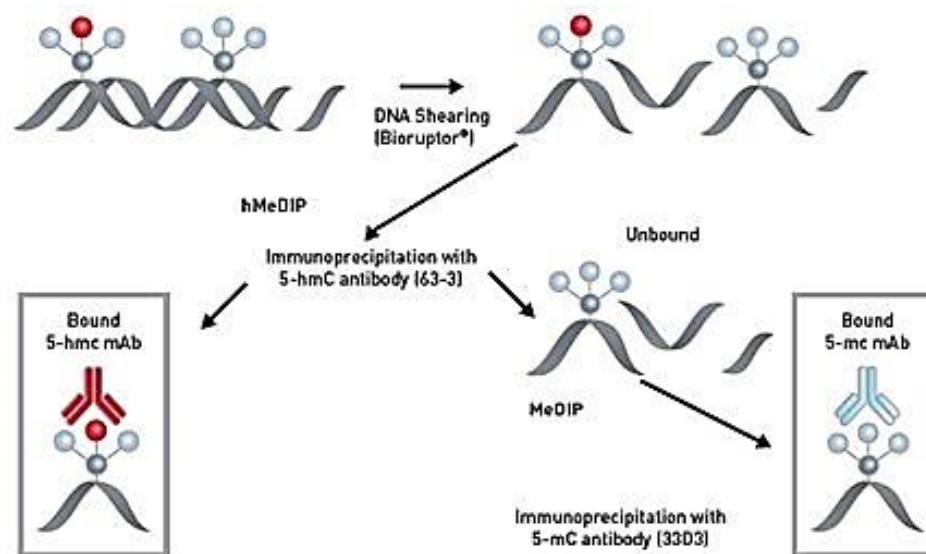


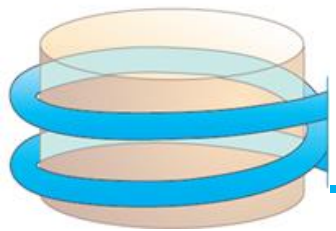


Métodos de obtenção DNA metilado

Methylated DNA immunoprecipitation - MeDIP

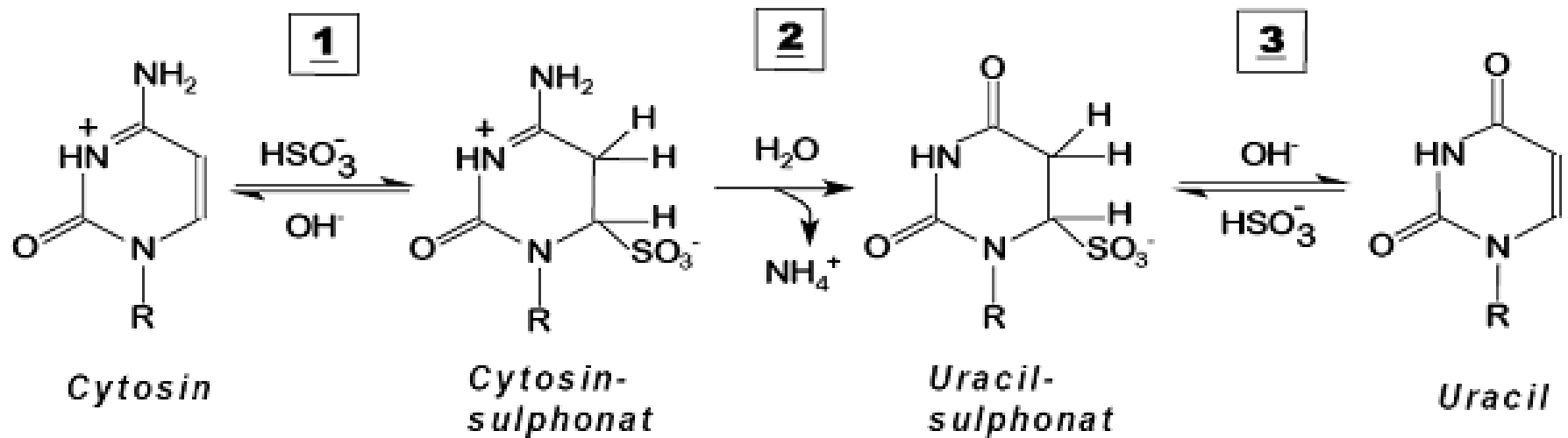
– Precipitação com anticorpos

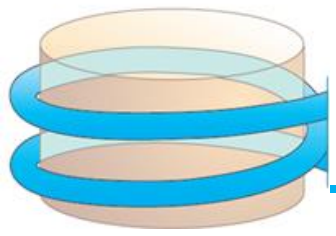




Métodos de obtenção DNA metilado

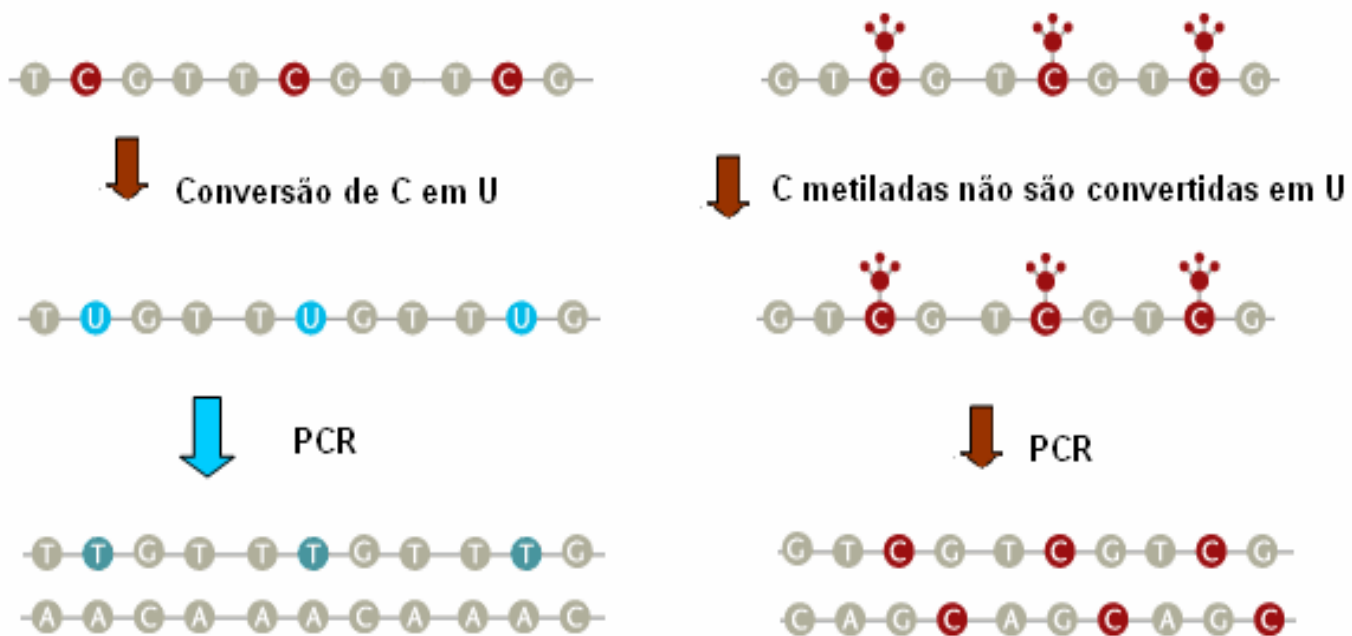
- Conversão com bissulfito de sódio
 - Desaminação



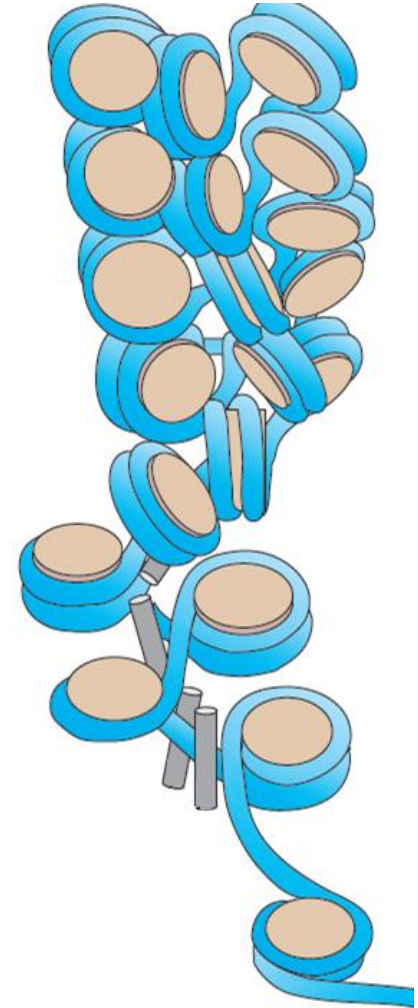


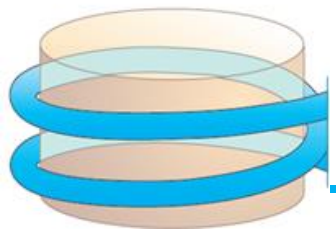
Métodos de obtenção DNA metilado

- Conversão com bissulfito de sódio
 - Desaminação



Metodologias para estudo da metilação





Métodos para avaliação de Metilação Global

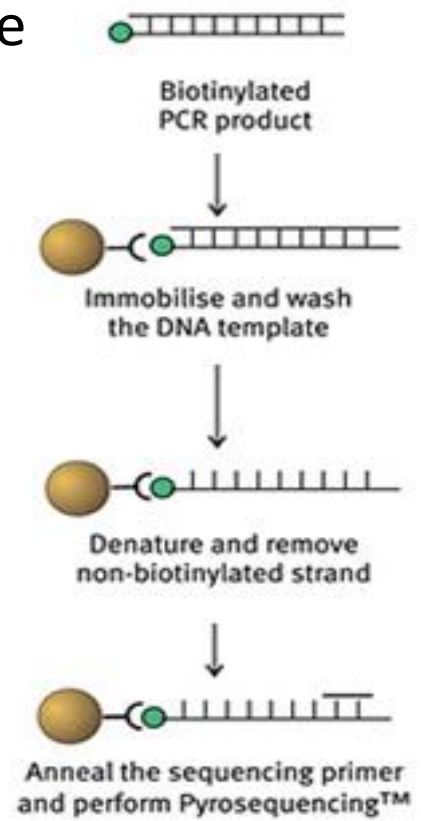
- Métodos de *screening*
- Panorama geral da situação
- Dois métodos que utilizam pirosequenciamento
 - Sequenciamento de LINE1 e Alu
 - LUMA (*Luminometric Methylation Assay*)



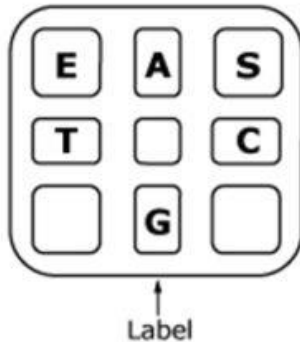
-
- The diagram illustrates the biochemical process of DNA sequencing. On the left, a DNA polymerase is shown extending a DNA strand. The template strand (3' to 5') has the sequence CGTCCGGAGGCCAAGTTCCA^S. The newly synthesized strand (5' to 3') has the sequence GCAGGCCT. A thymine (T) is being incorporated at the 3' end of the new strand. This process releases pyrophosphate (PPi). The PPi is then converted to ATP by the enzyme Sulfurylase. The ATP is then converted to ADP and light by the enzyme Luciferase. The right side of the diagram shows an electropherogram with peaks labeled C, T, G, C, TT, and AA, corresponding to the sequence AGTCAGTCAGTC.

3 ATP é convertido em luz pela luciferase

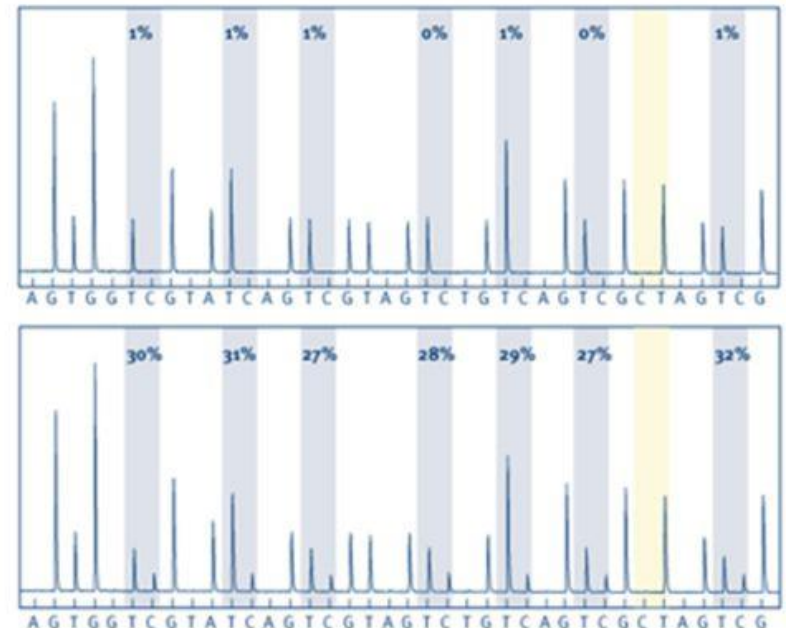
- PCR: Reação com um par de *primers* biotinilado e posteriormente um *primer* de sequenciamento;
- Isolar os produtos de PCR com beads de streptavidina
- Desnaturação e liberação das sequências sem o primer biotinilado
- Processo de lavagem – wash station
- Separar o DNA e liberar as amostras no plate com o primer de sequenciamento;

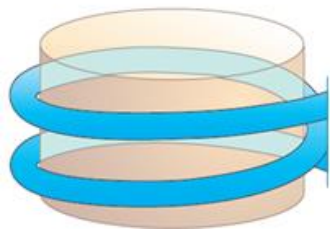


- Inserir a placa no pirosequenciador com o *dispenser* de nucleotídeos e substrato



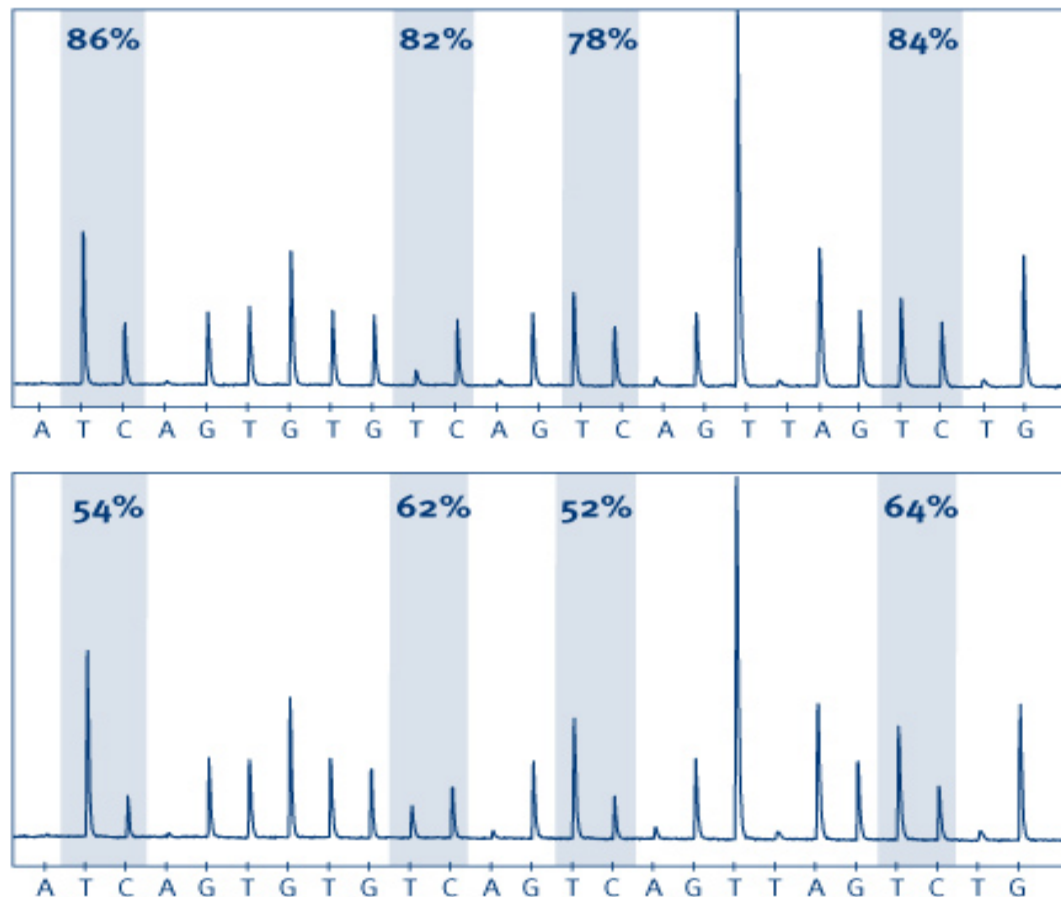
E = enzyme (90µl is usually enough for a run)
S = substrate (90µl is usually enough for a run)
A = nucleotide A (green)
C = nucleotide C (blue)
G = nucleotide G (black)
T = nucleotide T (red)

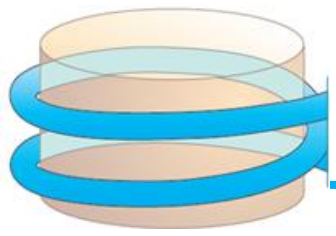




Metilação Global – LINE1 / Alu

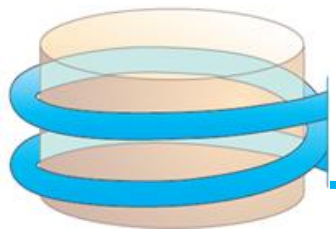
LINE-1 retrotransposable elements make up about 15% of human genome. DNA methylation within the promoter region of human LINE-1 elements is important for maintaining transcriptional inactivation and for inhibiting transposition. Genome-wide losses of DNA methylation within the promoter region of human LINE-1 elements have been regarded as a common epigenetic event in malignancies and may play crucial roles in carcinogenesis. This methylation assay amplifies a region of the LINE-1 element and serves as a marker for global methylation.





LUMA (*Luminometric Methylation Assay*)

- Clivagem por enzimas de restrição seguido de extensão de nucleotídeos individuais
- DNA: 250ng a 500ng não tratado com bissulfito
- Digestão do DNA com 2 enzimas sensíveis e insensíveis à metilação de CCGG:
 - Mix A: com EcoR1 (AATT) e HapII sensível à metilação (não corta C^mCGG)
 - Mix B: com EcoR1 (AATT) e MspI (não sensível à metilação)



LUMA (*Luminometric Methylation Assay*)

- Incubação por 37°C for 4 horas
- Amostras em duplicata, para cada tratamento, ou seja, 4 amostras de cada indivíduo;
- Qto mais dCTP incorporados, maior a quantidade de sítios clivados, e menor a metilação
- Metilação é determinada pela razão HpaII/Mspl.
0% met = 1.0
100% met = 0

Genomic DNA

Restriction cleavage

EcoRI + *HpaII*
or
EcoRI + *MspI*

Polymerase

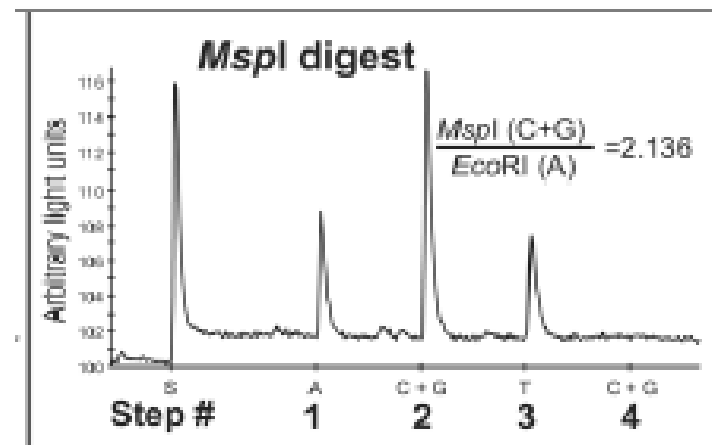
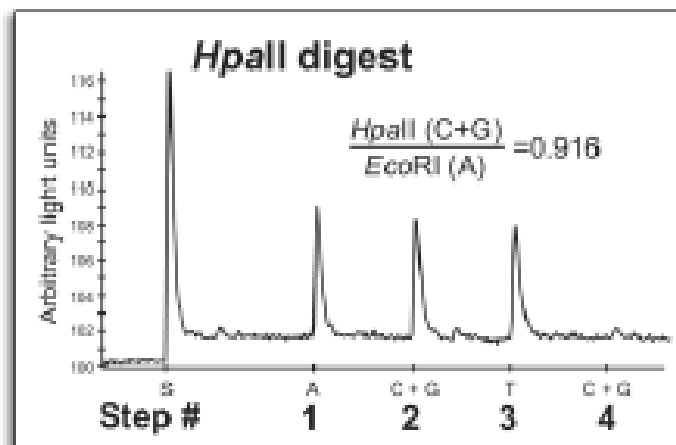
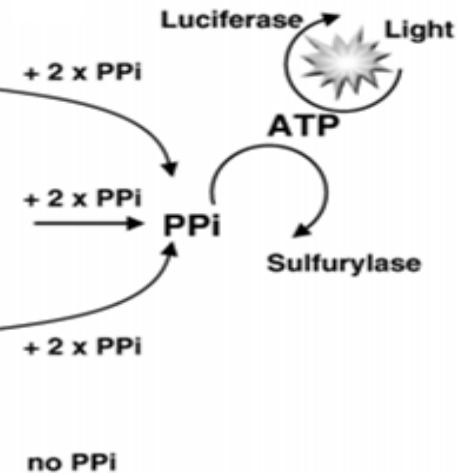
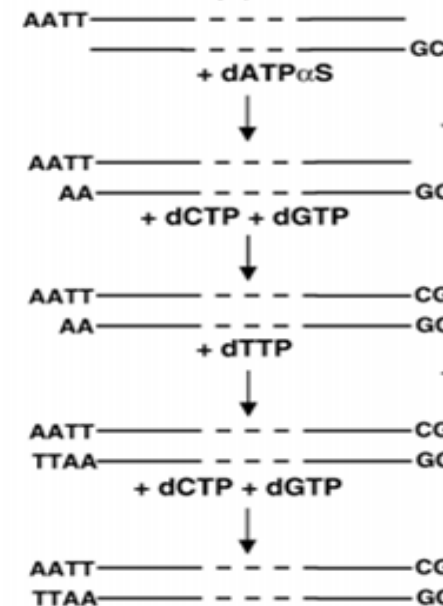
Pyrosequencing

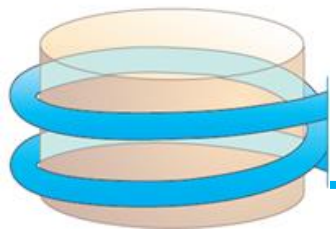
Step 1

Step 2

Step 3

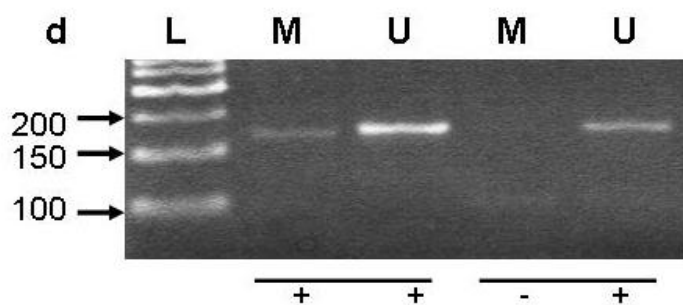
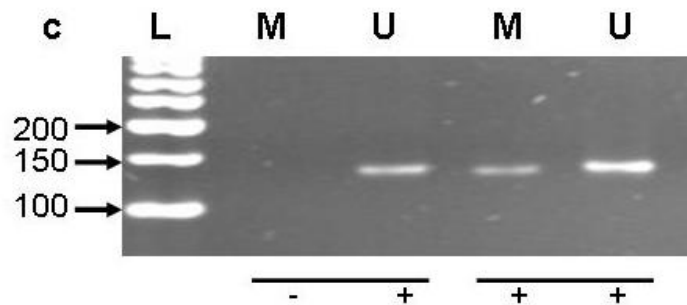
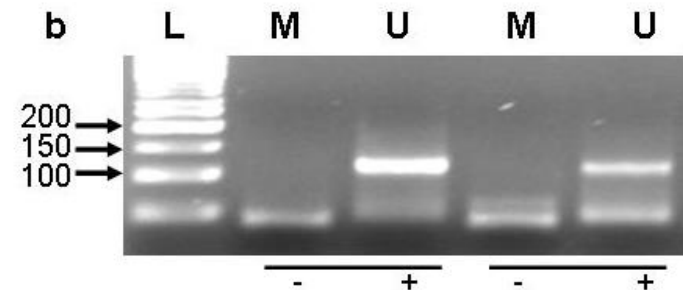
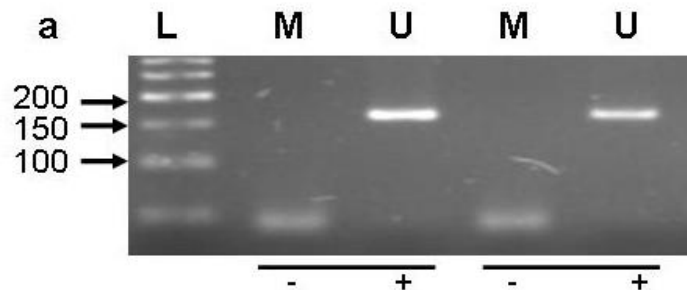
Step 4

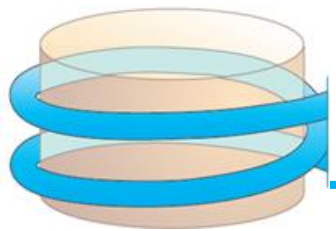




Methylation Specific PCR (MSP)

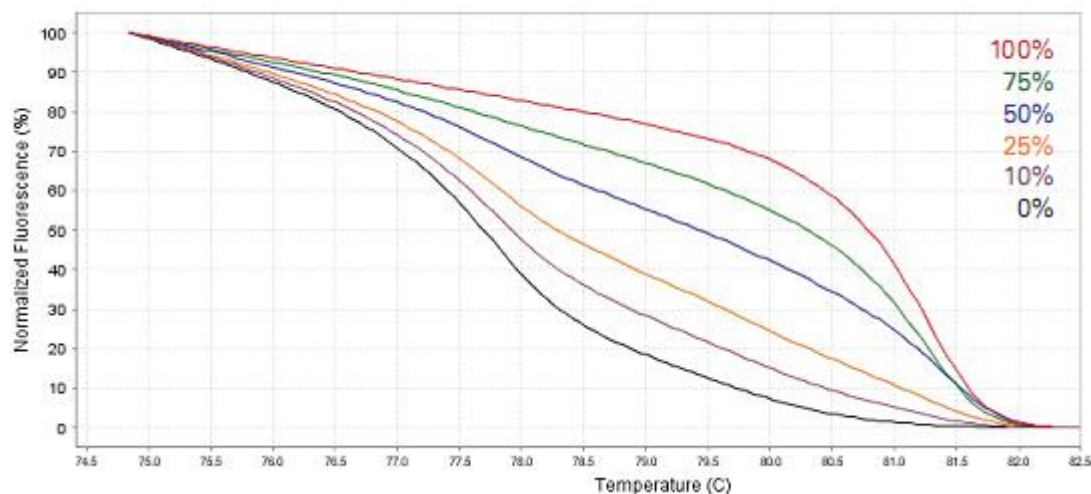
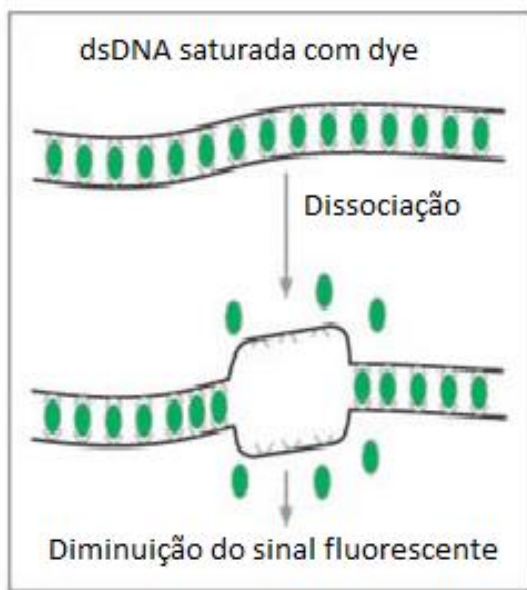
- Amplificação usando conjuntos de *primers* para as sequências metiladas e não metiladas

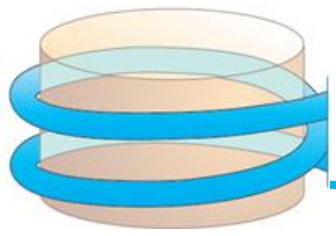




High Resolution Melting (HRM)

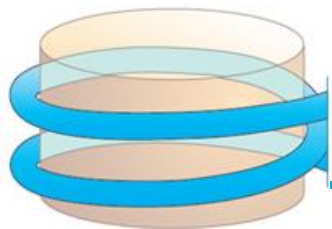
- PCR em tempo Real - análise de curva de dissociação do DNA
- Temperatura de *melting* = Temperatura onde metade do produto de PCR está dissociado (denaturado)





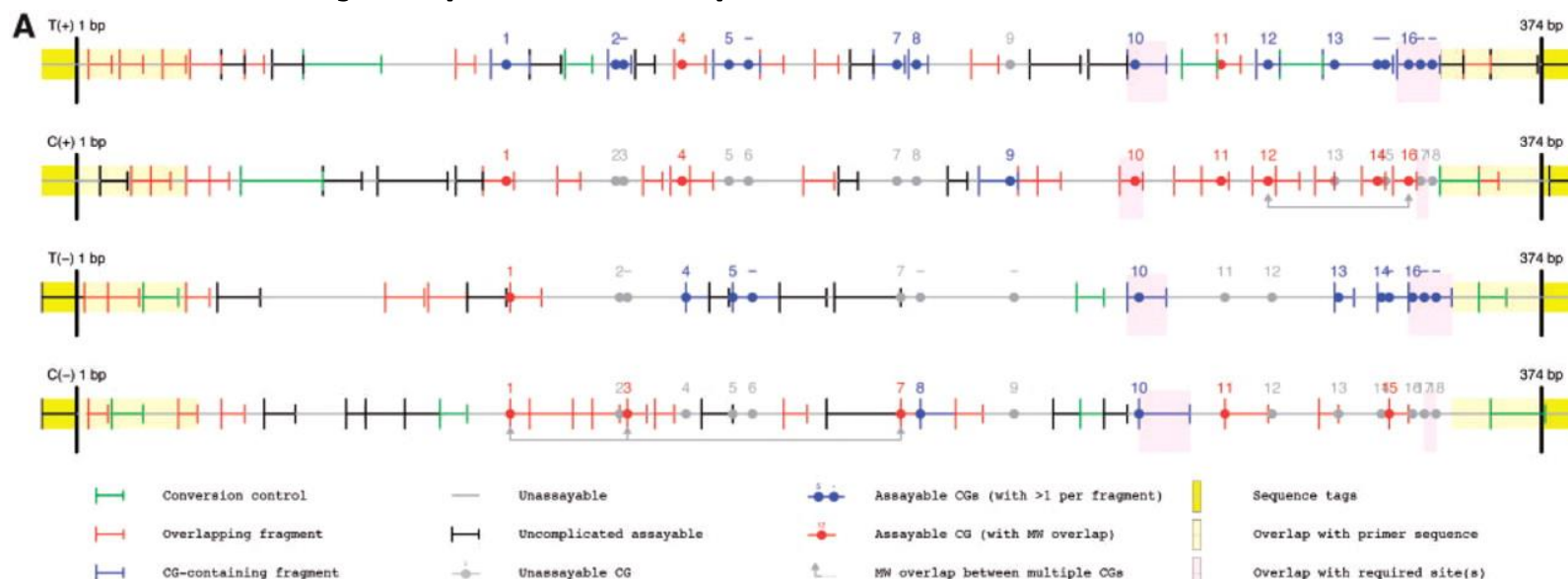
MALDI-TOF

- Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)
- Espectrometria de massa do tipo (MALDI-TOF)
- Amplificação e purificação das sequências gênicas por PCR convencional
- Transcrição *in vitro* do DNA para RNA
- Clivagem enzimática para a determinação da porcentagem de metilação baseada na massa dos fragmentos
- Diferenças na massa das moléculas



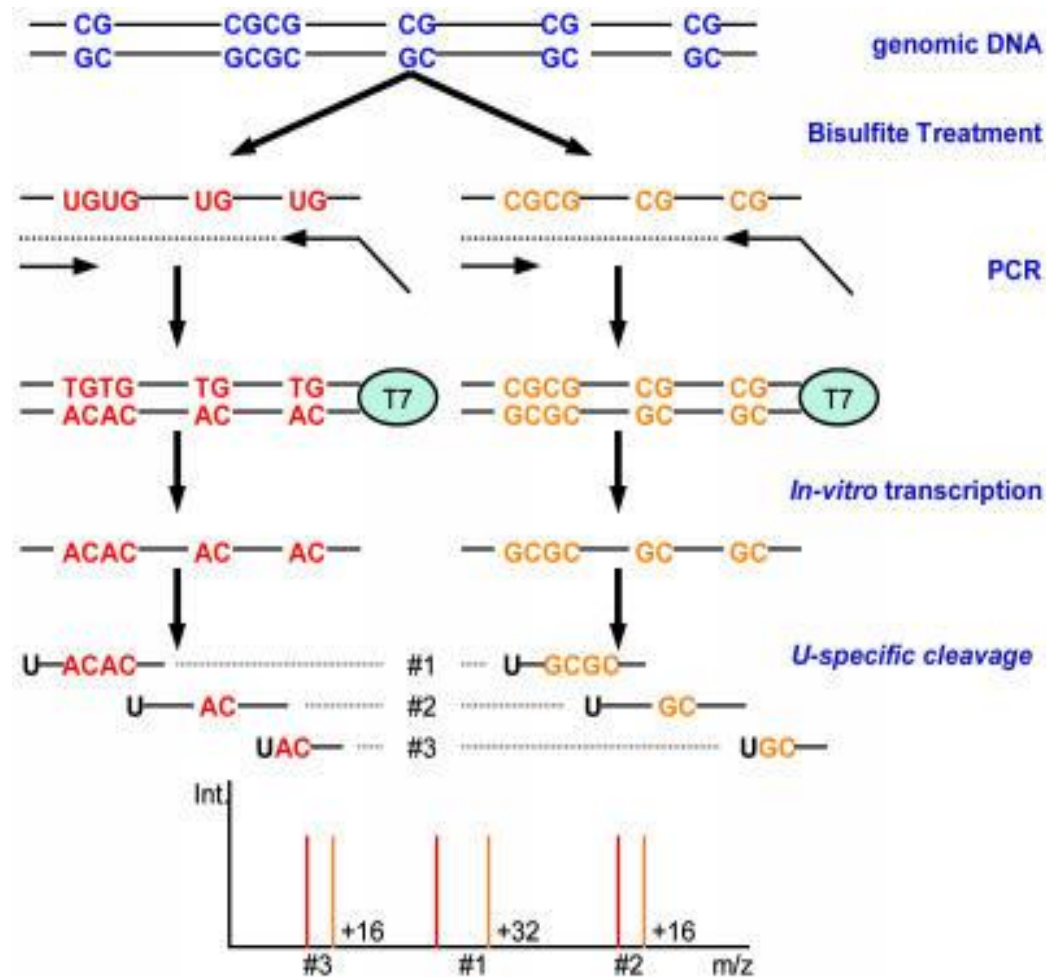
MALDI-TOF

- Amplificação por PCR: *primer* com T7 para iniciar a transcrição pela RNA polimerase



- RNAse A cleaves after “C” and “T” in RNA
- For a C-only cleavage:
 - Incorporate deoxyTTP, rCTP, rGTP, & rATP with T7 R&DNA polymerase
 - Only C’s available for Cleavage

- Transcrição – RNA e Clivagem
 - Mix com Buffer, RNA polimerase e RNaseA.

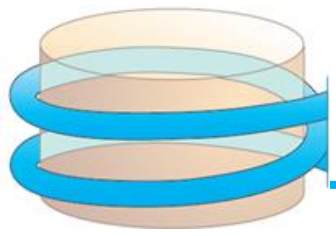


- Diferem em 16 Da de massa entre A e G

[illegible]

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
102	ar2008	2	0	M	NA	NA	NA	0	0,1	0,02	NA	0,18	0,26
104	ar2082	2	0	M	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
114	ar2093	2	0	F	0,03	NA	0,13	0,05	0,01	0,08	NA	0,04	0,1
115	ar2083	2	0	M	0,03	NA	0,13	0,05	0	0,03	NA	0	0,09
118	ar1108	2	0	M	0,05	NA	0,12	0,03	0,02	0,06	NA	0,02	0,09
119	ar1136	2	0	M	0,07	NA	0,11	0,04	0,01	0,02	NA	0,05	0,07
129	ar2138	2	0	M	0,01	NA	0,12	0,04	0,01	0,03	NA	0,03	0,03
131	ianc1303	2	0	M	0,03	NA	0,12	0,06	0,01	0,02	NA	0,02	0,07
134	ianc1328	2	0	M	0,03	NA	0,11	0,05	0	0,01	NA	0,04	0,08
146	sri1028	2	0	F	0,05	NA	0,11	0,08	0	0,01	NA	0,04	0,03
147	sri1085	2	0	F	0,05	NA	0,12	0,04	0	0,07	NA	0,03	0,08
150	sri1116	2	0	F	0,04	NA	0,11	0,03	0	0,05	NA	0,05	0,04
152	sri1122	2	0	M	NA	NA	0,03	0	0,03	0	NA	0,15	0,16
161	sri1162	2	0	F	0,04	NA	0,13	0,07	0	0,03	NA	0	0,08
163	sri1175	2	0	F	0,06	NA	0,15	0,09	0,01	0,05	NA	0,04	0,11
166	sri1180	2	0	F	0,03	NA	0,13	0,03	0	0,01	NA	0,03	0,08
168	sri1182	2	0	F	0	NA	0,1	0,02	0,05	0,02	NA	0,18	0,08
178	sri1188	2	0	F	0,04	NA	0,11	0,05	0	0,04	NA	0	0,06
179	sri1297	2	0	F	0,03	NA	0,12	0,05	0	0,05	NA	0,03	0,07
181	sri1157	2	0	M	0,04	NA	0,13	0,06	0,01	0,07	NA	0,03	0,05
Average					0,0378		0,1153	0,0430	0,0160	0,0360		0,0485	0,0845
Standard dev.					0,0166		0,0237	0,0234	0,0260	0,0230		0,0548	0,0505
135	positive control				0,96	NA	0,97	0,97	0,86	0,91	NA	0,72	0,78
136	negative control				NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
183	positive control				1	NA	0,98	1	0,9	0,98	NA	0,75	0,79
184	negative control				NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PSYCHOSIS				T_Test	0,1697		0,1139	0,1982	0,0159	0,1183		0,2405	0,0672
SCHIZOPHRENIA				T_Test	0,2248		1,0000	0,5024	0,0744	0,5330		0,9125	0,2796
BIPOLAR				T_Test	0,4344		0,0816	0,2976	0,0959	0,1015		0,1447	0,0965

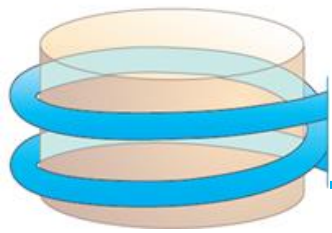
- Analisa um sítio CpG isolado ou a média dos CpGs
- CpGs isolados – Fatores de transcrição específicos



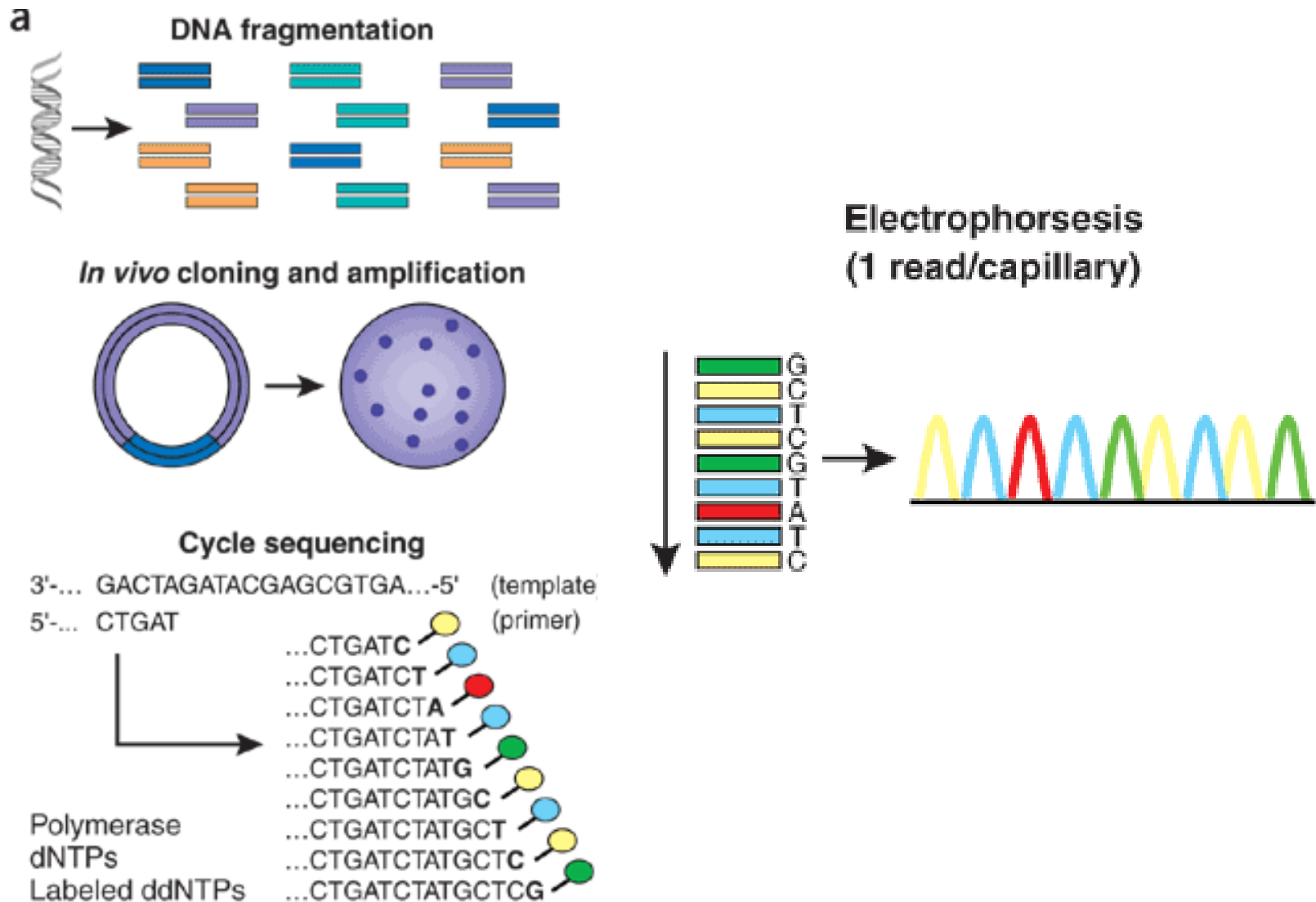
Sequenciamento

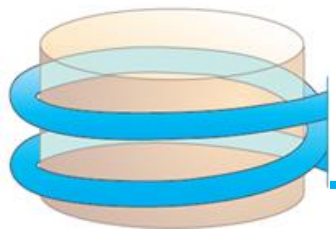
Sanger - Capilaridade

- Conversão por bissulfito de sódio
 - PCR do fragmento Alvo
 - Inserção em um vetor
 - Inserção do vetor em bactérias
 - Crescimento da bactéria em meio de cultura
 - Extração do DNA das bactérias
 - PCR e sequenciamento
-
- Vários clones bacterianos 5-10



Sequenciamento

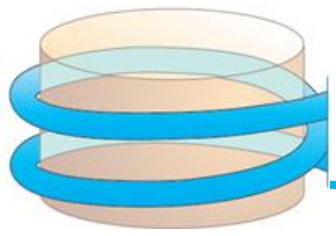




Sequenciamento

Sanger - Pós sequenciamento

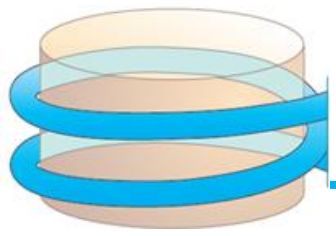
- Alinhar a sequência dos clones com a sequência referência
- Verificação da metilação em cada sítio CG
- Quantificação das médias de CG e análise estatística



Sequenciamento

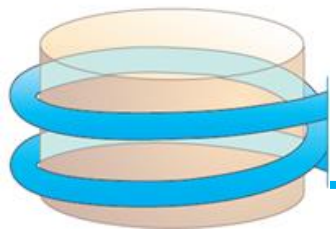
Next Generation Sequencing

- *Ion Torrent*
 - Amplificação das sequências por PCR
 - Construção das bibliotecas com os fragmentos
 - Carregamento do chip
 - Sequenciamento baseado em biocondutores
 - Análise é bem mais complexa
 - Muito *reads* x alinhamento



Array de metilação

- *450K da Illumina*
 - Permite investigação de 482.421 sítios CpGs
 - Conversão por bissulfito
 - Versão posterior ao 27K
 - Incorporou ao array sondas Infinium I (135.501) e Infinium II (350.076)
 - Infinium I: Duas sondas no array (M) e (U) - assume que é tudo M ou U;
 - Infinium II: Utiliza apenas uma sonda e inclui sítios degenerados , até 3 sítios por sonda



Array de metilação

- Dado bruto:
- $\beta = M / (M + U + \alpha)$
- M= sinal da intensidade da probe metilada
- U= sinal da intensidade da probe não metilada
- α = valor arbitrário compensatório, normalmente 100
- Dado bruto não normalizado



A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing

Sarah Dedeurwaerder, Matthieu Defrance*, Martin Bizet, Emilie Calonne, Gianluca Bontempi and Francois Fuks*

Submitted: 25th April 2013; Received (in revised form): 5th July 2013

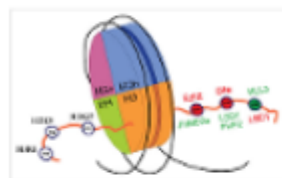
Michael C Wu^{1,2,*}, Bonnand Stephanie J London^{3,*}

¹Department of Biostatistics; The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC USA; ²Division of Intramural Research, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC USA; ³Department of Biostatistics, University of Washington, Seattle, WA USA; ⁴Division of Intramural Research, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC USA

Pidsley et al. BMC Genomics 2013, 14:293
http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/293



epigenetics Editor: Peter Green
Chief Editor: David Clayton
Managing Editor: Jonathan Cohen
Executive Editor: Jonathan Cohen

[illegible]

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data

Ruth Pidsley^{1†}, Chloe C Y Wong^{1†}, Manuela Volta¹, Katie Lunnon¹, Jonathan Mill^{1,2}
and Leonard C Schalkwyk^{1*}

Quach⁺, Lisa Barcellos⁺ & Nina Holland⁺

^a School of Public Health; University of California; Berkeley, CA USA
Published online: 05 Nov 2014.

Obrigada

