



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

Morfinak H3K27me3 histonaren antolamenduan sortutako eraldaketak inpronta genomikodun geneen adierazpenean duen eragin zuzenaren egiaztatpena, CHIP-seq teknikaren bidez

Iraia Muñoa Hoyos, Marta Gianzo Citores, Paloma Garcia, Jon Irazusta Astiazaran eta Nerea Subiran Ciudad

160-167 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.22>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



Morfinak H3K27me3 histonaren antolamenduan sortutako eraldaketak inpronta genomikodun geneen adierazpenean duen eragin zuzenaren egiaztapena, CHIP-seq teknikaren bidez

Iraia Muñoa-Hoyos¹; Marta Gianzo¹; Paloma Garcia²; Jon Irazusta¹ eta Nerea Subirán¹

¹Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

²University of Birmingham (Ingalaterra)

iraia.munoa@ehu.eus

Laburpena

Kanpo faktore edo estimuluek banakoan duten eragina epigenetikaren bitartez aztertzen da. Aldaketa epigenetikoak ez dira DNA-ren sekuentzian ematen diren mutazioak, DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimiko batzuk baizik, geneen adierazpenaren erregulazioan eragina izan dezaketenak. Kanpo faktoreek banako helduan aldaketa fisiologiko ugari sortzen dituztela erakutsi dute ikerketa ezberdinek. Baina pentsa dezagun nolako eragina izango luketen kanpo estimuluek fetuan eta zein ondorio ekarriko lituzke fetuaren garapen prozesuan eta ondorioz banakoan. Lan honen helburua, kanpo estimulua den morfinak, saguaren zelula ametan sortzen dituen aldaketa epigenetikoak aztertzea da, zehazki, errepresio marka bat den histona batean eta genomak zehar berari lotuta agertzen zaizkion geneetan.

Hitz gakoak: aldaketa epigenetikoak, H3K27me3 histona, inpronta genomikoa duten geneak, morfina.

Abstract

Epigenetics is the study of how environmental factors or external stimuli can affect the individual. Epigenetic modifications don't involve changes in the underlying DNA sequence or mutations; in fact, they are small biochemical molecules that stick to the DNA, regulating the expression of different genes. In the last years, lots of research groups have described that environmental factors have direct impact in physiological traits of adult individuals. But what do we know about the effect of the external stimuli in the fetus, and the consequences that those stimuli can produce in the early stages of the developmental process? The aim of this research is to analyze the epigenetic modifications caused by morphine in mouse embryonic stem cells, more specifically, we have focused the study on a repressive mark histone and the genes attached to this histone throughout the genome.

Key words: epigenetic modifications, histone H3K27me3, imprinted genes, morphine.

1. Sarrera eta motibazioa

Epigenetikak, kanpo faktore edo inguruneak, gure DNA-n izan dezakeen eragina aztertzen du. Ideia hau, Aristotelesek aipatu zuen lehenengoz bere garaian, eta Lamarckek berretsi orain dela mende batzuk. XXI.mendeko zientzian, garrantzia handiko arloa bihurtu da, ikerkuntza askok erakutsi baitute, genomaren sekuentzia aldatu gabe, geneak erregulatu dituzten mekanismoak badaudela. Mekanismo hauek osatzen dute epigenetika, eta aldaketa epigenetikoak kanpo faktore edo estimuluek sortuko lituzkete. Esaterako, dietak, toxiko ezberdinen kontsumoak (hala nola, tabakoak, drogak), jarduera fisikoak, pairatzen dugun estresak, hartzen ditugun farmakoek etab.

Aldaketa epigenetikoak

Aldaketa epigenetikoak DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimikoak dira, geneen adierazpena kontrolatzen dutenak, baina aipatu bezala, DNA-ren sekuentzian inolako aldaketarik sortu gabe (Marx 2012). Orokorrean, hiru dira geneen adierazpena erregulatu duten mekanismo epigenetikoak:

- **DNA-ren metilazioa.** DNA-ren puntu zehatz batean metilo talde bat (talde kimiko bat) gehitzeari deritzo, orokorrean dietatik lortzen duguna. DNA-ren sekuentzia zati bat zenbat eta metilatuagoa egon, orduan eta posibleagoa izango da zati horretako informazio genetikoa inaktibatu edo isilaraztea, hain zuzen ere, metilo taldea gene adierazpenaren etengailu modura arituko da (Baylin eta lank., 2005).

- **Histonaren eraldaketa.** Zelulen nukleoetan DNA-ren sekuentzia (2-3metroko luzerakoa) pilatuta agertzen da nukleosoma izeneko konplexua osatzen duten proteina batzuen inguruan. Proteina horiek dira histonak eta hauek eraldaketa epigenetiko ugari jasan ditzakete aldaketa kimiko ezberdinen bitartez, fosforilazioak, metilazioak eta azetilazioak, besteak beste (Rice eta lank., 2001). Hauek metilazioen kasuan bezala geneen adierazpen prozesuan dute eragina. Histonek eraldaketak jasotzen dituztenean, beregan biltzen duten DNA erlaxatu edo trinkotzen dute eta ondorioz, sekuentziako informazioa erakutsi edo ezkutatu. Hau da, geneen adierazpena kontrolatzen dute, hura bultzatuz edo etenez (Turner, 2011).

- **Kodifikatu gabeko RNA-ren sorrera.** RNA molekula hauek geneen adierazpena itzaltzea bultzatzen dute (Costa eta lank., 2005). Esparru honetan ez dago ikerketa lan askorik oraindik ere, baina epigenetika arloan garrantzia handia izan dezakeela aurreikusten da.

Aipatzekoa da H3K27me3 histona (histona honen 27.posizioan dagoen lisina metilatu agertzen da 3 aldiz), hau, marka epigenetiko errepresibo bezala ezagutzen da eta ondorioz, bere inguruko DNA trinkotu egiten du geneen adierazpena etenaraziz (Brykczynska eta lank., 2010). Gure laborategian egindako aurreko ikerketei jarraituz, lan honetan H3K27me3 histonak jasaten dituen aldaketak aztertuko ditugu, kanpo faktore edo estimulu bezala morfina erabiliz.

Sistem opioidea

Sistema opioidea, fisiologian garrantzi handiko prozesu zelularrak erregulatzen dituen komunikazio zelularreko sistema bat da. Batez ere, minaren eta plazeraren erregulazioarekin erlazionatua izan da Nerbio Sistema Zentralean, eta pixkana, ugalkortasuna eta garapena bezalako beste prozesu fisiologikoekin zerikusia duela frogatu da (Fabri eta lank., 1989, Subiran eta lank., 2011). Morfina, opioaren osagai aktiboa, beste edozein narkotiko baino gehiago erabili izan da medikuntzan bere balio terapeutikoagatik, baina erabilpen kroniko batek bigarren mailako efektuak sor ditzakeela deskribatu da, horien artean garrantzitsuena analgesiarekiko tolerantziaren garapena izanik (Dumas & Pollack, 2008, Michael & MacDonald, 2011).

Aurreko atalean aipatzen genituen kanpo faktore edo estimulu horien taldean morfina kontsumoa kontsideratu dezakegu. Honen harira, asko dira bibliografian zehar morfina sortzen dituen aldaketa epigenetikoak aztertzen dituzten ikerketa ezberdinak (Godfrey eta lank., 2007) eta honen ondorioak azaltzen dituztenak bai bizi kalitatean eta baita ondorengo belaunaldien transmisioan, batez ere droga kontsumoari lotuta (Ornoy eta lank., 1996). Adibidez, Tapocik eta lankideek 2009 urtean egindako ikerketa batean morfina tratamenduaren ondorioz sagu helduek, beraien burmuinetan, aldaketa fisiologiko eta estrukturalak jasaten zituztela deskribatu zuten (Tapocik eta lank., 2009).

Morfina bezalako kanpo estimulu batek, banakoan efektu esanguratsua eragiten baldin badu, pentsa dezagun banakoaren sortze prozesuan zehar, hau da, enbrioaren garapenean zehar egon daitekeen edozein estimulu ere efektu ezberdinak sorraraziko dituela prozesu ezberdinetan. Ideia honi jarraituz, lan honetan saguaren zelula ama enbrionarioak (mESC) erabili dira. Hauek, enbrioia blastozisto garapen mailara iristen den unean (saguetan

haurdunaldiko 3.5-4.5 egunean gertatzen da), barneko zelula-masa osatzen duten zelulak dira. Zelula ama enbrionarioen ezaugarrien artean aipagarrienak bi dira: lehenengoa, zelula desberdinu gabekoak direla, hau da, zatitzeko gaitasuna mugarik gabe mantendu dezaketela, eta bigarrenkoa pluripotenteak direla, ondorioz enbrioi-ehun espezializatu guztiak sortu ditzaketela, hots, zelula hauek izango dira fetua emango dutenak eta ondorioz, banakoa. Beraz, mESC-en “in vitro” modeloa erabiliko dugu, zelula hauek morfinarekin tratatu eta bere eragina ikusteko batez ere H3K27me3 histona ardatz bezala hartuta.

Inpronta genomikoa duten geneak

Morfinaren eragina, inpronta genomikoa duten geneekin lotzen duten ikerketak geroz eta ugariagoak dira (Gioiosa eta lank., 2007, Gioiosa eta lank., 2008, Tapocik eta lank., 2009). Inpronta genomikoa prozesu biologiko bat da, gene bat edo genomaren eremu bat biokimikoki markarazten duena jatorri parentala adieraziz, hau da, gene jakin bat amaren edo aitarengatik jasotako aleloaren kopia den adierazten digute. Inprontaren ondorioz, aleloetako bat bakarrik adieraziko da eta bestea itzalita mantenduko da. Ugaztunon garapen egokia eman dadin, amaren eta aitaren inpronta duten geneen ekarpena beharrezkoa da, prozesu horretan aldaketarik emanez gero hainbat eta hainbat gaixotasun edo sindrome sortu daitezke eta (Knoll eta lank., 1989, Nicholls eta lank., 2001, Horsthemke eta lank., 2008, Bartolomei eta Ferguson-Smith 2011).

Gaur egun, 150 inpronta genomikodun gene baino gehiago deskribatu dira bibliografian, batzuetan banaka eta bestetan taldeka edo “clusterretan” haritzen direnak (Williamson eta lank., 2013). Clusterretako gene hauen inpronta genomikoa orokorrean, Inprontaren Kontrol Eremua (Imprinting Control Region edo ICR) izeneko elementu erregulatzaileen bidez burutzen da (Dindot eta lank., 2009). Hauek, gurasoekiko espezifikoak diren aldaketa epigenetikoak izaten dituzte, hau da metilatuak egon daitezke edo histonaren eraldaketaren ondorio izan (Li et al. 1993). ICR eremu hauek zitosina eta guanina nukleotidoetan aberatsak dira (CpG irlak ere deiturikoak), eta beraz, metilazioa emateko leku aproposenak dira. ICR eremuak osatzen dituzten CpG irlak metilazio ezberdintasunak erakusten dituzte clusterretako gene konkretuetan, DMR deituak (ingelesezko Differentially Methylated Regions) (Edwards and Ferguson-Smith 2007). Hau dela eta inpronta genomikoa duten geneak gure ikerketa honen jomuga dira, beraien ICR eta DMR eremuak aldaketa epigenetikoak pilatzeko leku aproposa baitira.

Guzti honekin, morfinaren ondorioz H3K27me3 histonan sorturiko antolamendu aldaketek inpronta genomikoa duten geneetan izan dezakeen eragina aztertuko dugu lan honen bidez.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Taldeak burutu dituen aurreko ikerketa eta bibliografiako hainbat lan uztartuz ikusi dugu, H3K27me3 errepresio marka epigenetikoak konplexu erregulatzaile baten parte dela eta hainbat prozesuren kontrolean parte hartzen duela, hala nola, zelulen arteko memorian, inpronta genomikoan, X kromosomaren inaktibazioan edota belaunaldiz-belaunaldi transmititzen den memoria epigenetikoan (McEwen eta Ferguson-Smith 2010).

Jarraian aurkezten den lanaren bitartez, kanpo estimuluek, morfinak kasu, H3K27me3 histonaren antolamenduaren eraldaketaren bitartez, inpronta genomikoa duten geneetan izan dezakeen eragina aztertu nahi dugu. Era honetan morfinak sorturiko aldaketa epigenetikoak identifikatu ahal izango ditugu eta H3K27me3 errepresio markaren jarduera prozesua deskribatzen lagundu ahal izango dugu.

2.1. Helburu Orokorrak: Saguaren zelula ama enbrionarioetan, morfinaren tratamendu kronikoak izan dezakeen eragina aztertzea, maila epigenetiko eta transkripzionalean.

2.2. Helburu Espezifikoak:

- 1) H3K23me3 histonaren bilakaera globala hautematea kontrol laginetan eta morfinarekin tratatutako laginetan.
- 2) Morfinak inpronta genomikoa duten geneetan eragin zuzena duen identifikatzea.
- 3) H3K27m3 histonan, morfinak sortutako antolamenduaren aldaketak ikertzea eta inpronta genomikoa duten geneetan duen eragina behatzea.

3. Ikerketaren muina

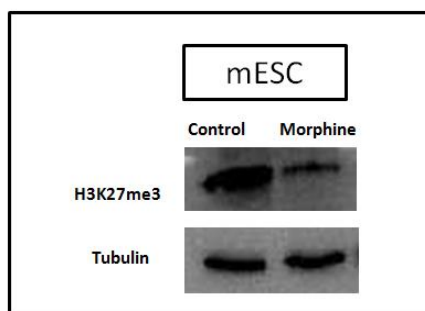
Saguaren zelula amak, 2i+LIF hazkuntza medioan hazi ziren, 37°C-tan eta CO₂ %5-ean. Medio hau, hainbat inhibitzailez osaturiko hazkuntza medioa da zelula amen pluripotenzia mantentzeko ezinbestekoa dena. Morfinaren tratamendu kronikoa, 10⁻⁵ M kontzentrazioan egin zen 24 ordutan inkubatuz. Horrela bi lagin izan genituen esperimenduak egiterako orduan, tratatu gabeko zelulak edo kontrol-laginak, eta tratatutako zelulak edo morfina-laginak.

3.1 Morfinak eragindako bilakaera H3K27me3 histonan – Western Blot Teknika

H3K27me3 histonaren adierazpenean morfinak eragin dezakeen bilakaera aztertzeko Western Blot teknika erabili dugu. Kontrol eta morfina-laginetako zelula kopurua berdindu ondoren, laginen proteinak beraien tamainaren arabera banatu dira eta ondoren, mintz batera transferitu dira, bertan H3K27me3-a detektatzen duen antigorputz espezifikoaren bitartez proteinaren adierazpena aztertzeko. Lortutako banden barne kontrol gisa, tubulina erabili da, azterturiko proteina kopurua bi kasuetan berdina dela ziurtatzeko.

Horrela, morfinak H3K27me3 histonan efektu negatibo global bat eragiten duela ikusi dugu (1.irudia). Histona metilatu kopuruaren jaitsierak adierazten du, morfinaren tratamenduaren ondoren kromatinaren kondentsazioa aldatu egiten dela, trinkoa izatetik erlaxatuagoa izatera pasatzen da eta beraz, geneen adierazpen prozesua ahalbidetzea ekar dezake.

1. Irudia. H3K27me3 histonaren bilakaera kontrol eta morfina laginetan.



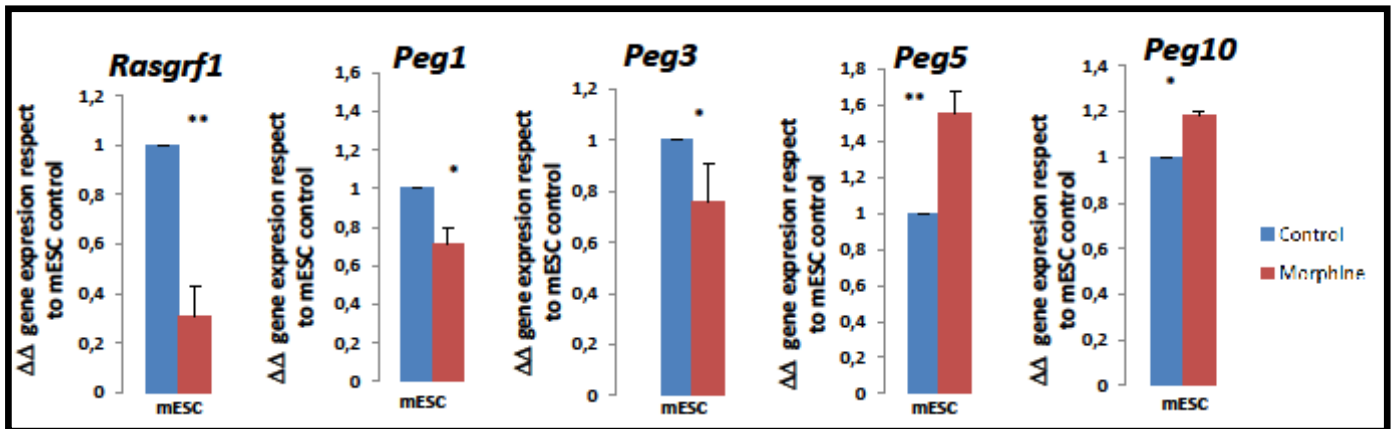
3.2. Morfinaren eragina inpronta genomidun geneen adierazpenean-qRT-PCR Teknika

Morfinaren tratamenduaren azterkari nagusiak inpronta genomikoa duten geneak dira gure lanean. Morfinak gene hauetan eraginen bat ote duen ikusteko, qRT-PCR teknikarekin inprontadun gene familiaren adierazpen aldaketak neurtu ditugu kontrol eta morfina laginetan.

Teknika honen bitartez inpronta genomikoa duten geneetan adierazpen aldaketa esanguratsuak identifikatu ditugu morfinarekin trataturiko laginak kontrol laginekin alderatuta (2.irudia). Adibidez, aitaren aldeko inpronta genomikoa duten gene diren Rasgrf1, Peg1 eta

Peg3-k beherakada adierazgarria erakutsi dute beraien adierazpenean eta Peg5 eta Peg10 geneek aldiz, adierazpena areagotu dute.

2. Irudia. Inpronta genomikoa duten geneen adierazpena kontrol eta morfina laginetan (*p<0,05, **p<0,01).



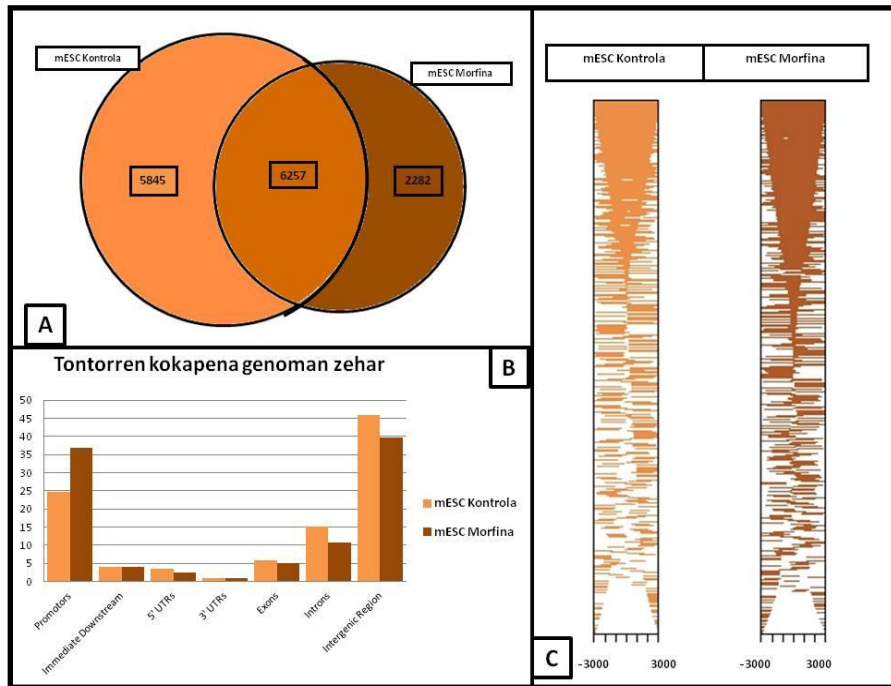
3.3 H3K27me3 histonaren antolamenduan eraldaketak – ChIP-seq Teknika

H3K27me3 histonaren analisi sakon bat egin eta bere antolamenduan morfina eragindako eraldaketak aztertzeko ChIP teknika erabili dugu. Lan teknika honen bidez histonari lotuta dagoen DNA guztia immunoprezipitatu dugu H3K27me3-arentzat espezifikoa den antigorputz baten bitartez, hots, H3K27me3 histonari lotutako DNA guztia erauzi da. Gero DNA hori purifikatu egin dugu eta sekuentziatu. Sekuentziazioaren teknika, Next Generation Sequencing delako teknika berrien parte da. Izan ere teknika honen bidez, H3K27me3 histonak, genoma osoko geneak zein puntu erregulatzen dituen ikusi dezakegu eta morfina ondoz sortutako ezberdintasunak aztertu.

Behin immunoprezipitaziotik lortutako DNA-aren sekuentziak izanik, analisi bioinformatiko baten bitartez landu dira. Lehenengo pausua, DNA hori, erreferentziazko genoma batekin lerrokatzea izan da, puzzle bat izango balitz bezala gure DNA genomaz zehar kokatuz. Ondoren, DNA puzketa horien pilaketaren arabera, beraien intentsitatea neurtu da eta genomaz zehar marrazten dituzten “tontor” bezala adierazi dira. Azkenik, tontor horien inguruan dauden geneen izenak identifikatu dira eta horiek, zein puntutan erregulatzen diren aztertu da, hau da, promotoreetan, genearen gorputzean, exoietan, introietan etab.

ChIP-seq teknikaren emaitza orokorrean aurreko ondorioa indartzen dute, morfina tratamenduen ondoren lortu dugun tontor kopurua nabarmen bat ageri delako (3.irudia A). Kontrol laginean 12102 tontor zenbatu ditugu eta morfina laginean aldiz 8539 tontor. Honek adierazten duenez, morfina tratamendua H3K27me3 eta DNA-ren arteko lotura puntuak murrizten ditu. Behin tontor bakoitzari dagokion geneak identifikatu ondoren, ikus dezakegu orokorrean H3K27me3 histonaren eta DNAREN arteko lotura gunea, promotoreetan eta gune intergenikoetan ematen dela gehien bat (3.irudia B). Izan ere morfina tratamendua promotoreetako loturaren igoera bat dakar. Emaitza hau bat dator, transkripzioaren hasiera gunearekiko histonak duen loturaren intentsitatearen mapa egiten dugunean (3.irudia C). Bertan ikus daiteke nola morfina tratamendua transkripzioaren hasiera gunearekiko lotura areagotzen duen.

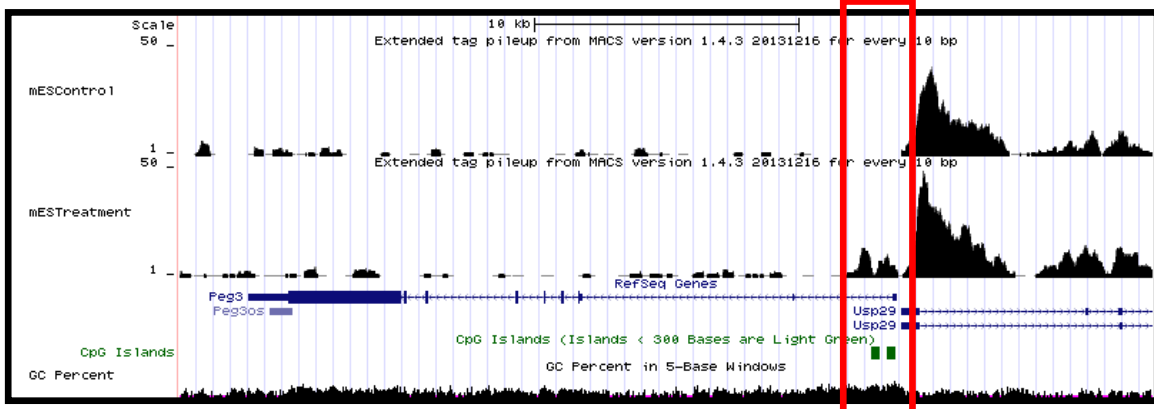
3. Irudia: ChIP-Seq teknikaren emaitza orokorrak. A) Tontor kopuruak lagin bakoitzeko, lagin bakoitzak propio dituenak eta bi laginek partekatzen dituztenak. B) Tontorren kokapen portzentaiak genomaz zehar. C) H3K27me3 histonaren antolamendua transkripzioaren hasiera gunearekiko duen intentsitatea.



Erreferentzia genomarekiko egindako lerroketak sakonago aztertuz, morfina eragindako H3K27me3 histonaren antolamendu aldaketak ikusteko, inpronta genomikoa duten geneetara zuzendu gara. Horretarako USCS Genome Browser nabigatzaile genomikoa erabili da (Kent eta lank., 2002). Kontrol laginean sortzen diren tontorrak morfina laginarekin alderatuz ikusi dugu, aldaketa gehienak CpG irlak dauden zonaldean ematen direla, orokorrean zonalde hauek genearen ICR edo DMR gunearekin bat etorritik.

Emaitza hau sakontasunean azaltzeko, inpronta genomikoa duen gene bat hartuko dugu kasu konkretuaren adibide bezala: Peg3, aitaren inpronta genomikoa duen genea (4.irudia). Lehenengo panelean irudiko genomaren zatiaren eskala ageri da, 10 Kb-koa. Bigarren eta hirugarren paneletan kontrol eta morfina laginaren tontorrak azaltzen dira hurrenez hurren. Laugarren panelean genomako posizio horretako geneak izendatzen dira beraien exoi eta introiekin urdinez, Peg3 eta berari jarraiki doan Usp29 geneak alegia. Eta azkenik, bosgarren panelean, CpG irlen posizioak marrazten dira berdez. Irudi honetan ikusi dezakegu kontrol eta morfina laginen H3K27me3 histonaren antolamendua alderatuz, bigarrengean bi tontor agertzen direla CpG irlen posizioarekin bat datorren puntuak (lauki gorria).

4.irudia: H3K27me3 histonaren antolamendua genomaz zehar (Peg3 genearen posizioa)



Bibliografiak deskribatzen du Peg3 genea, sarreran aipaturiko cluster horien partaide dela, 7. kromosoman hain zuzen ere (Kim eta lank., 2012). Cluster honek osatzen duen ICR-a Peg3 genearen promotorean dago kokatua (Hanna eta Kelsey, 2014). Guk morfinaren tratamenduaren ondoren agerian ikusten ditugun bi tontor horiek ere Peg3 genearen promotorearekin bat datoz eta baita CpG irlaren posizioarekin.

4. Ondorioak

Lan honen ondorio bezala esan dezakegu, morfinak H3K27me3 histonaren aktibitatean jaitsiera bat eragiten duela eta gainera, bere antolamenduan aldaketa zuzenak burutzen dituela, inpronta genomiko duten geneekiko lotura handiagotuz. Zehazki, lotura hau ICR eta DMR guneetan gertatzen da, erregulazio bat emanez. Honek morfinaren eraginez eraldatu daitekeen mekanismo epigenetiko bat eskaintzen digu, aztertzen jarraitzea merezi duena. Izan ere, morfinak, inpronta genomikoa duten geneengan sortzen duen efektu horrek inpaktu handia izan dezake bai memoria zelularrean, inpronta genomikoa, X kromosomaren inaktibazioan, enbrioaren garapenean edota belaunaldiz belaunaldiko oinordekotza epigenetikoan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honen bitartez, in vitro eredu bat sortu nahi izan dugu, kanpo estimulu batek zelula enbrionikoetan izan dezakeen eragina aztertzeko. Etorkizuneko lana izango litzateke, morfina ez den beste motako kanpo estimuluek ere, ondorio hauek sortzen dituzten edo ez aztertzea, mekanismo epigenetikoaren oinarriak finkatu ahal izateko.

Bestalde lana in vitro mailatik in vivo mailara estrapolatzea izango litzateke beste pausuetako bat, fetu garaian izandako estimulu batek, banakoaren garapenean izan dezakeen eragina aztertzeko eta kaltetuak egon daitezkeen prozesuak identifikatzeko.

6. Erreferentziak

- Bartolomei M. S. eta Ferguson-Smith A. C. (2011). Mammalian Genomic Imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 3: a002592.
- Baylin S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2, S4–S11.
- Brykczynska U., Hisano M., Erkek S., Ramos L., Oakeley E. J., Roloff T. C., Beisel C., Schübeler D., Stadler M. B. eta Peters A. H. (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 679–687. doi:10.1038/nsmb.1821
- Costa F. F. (2005). Non-coding RNA: new players in eukaryotic biology. *Gene* 357, 83–94.
- Dindot S. V., Person R., Strivens M., Garcia R. eta Beaudet A. L. (2009). Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions. *Genome Res*; 19(8): 1374–1383. doi: 10.1101/gr.089185.108.
- Dumas E. O. eta Pollack G. M. (2008). Opioid tolerance development: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *AAPS J*; 10(4): 537. doi:10.1208/s12248-008-9056-1.
- Edwards C.A eta Ferguson-Smith A.C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Jun;19(3):281-9.
- Fabbri A., Jannini E. A., Gnessi L., Ulisse S., Moretti C. eta Isidori A. (1989). Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem.* 32(1B):145-150.
- Godfrey K. M., Lillycrop K.A., Burdge G.C., Gluckman P.D. eta Hanson M.A. (2007). Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatr*;61:5R–10R.
- Gioiosa L., Chen X., Watkins R., Klanfer N., Bryant C. D., Evans C. J. eta Arthur P. Arnold A. P. (2008). Sex Chromosome Complement Affects Nociception in Tests of Acute and

- Chronic Exposure to Morphine in Mice. *Horm Behav*; 53(1): 124-130. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.09.003.
- Gioiosa L., Chen X., Watkins R., Umeda E. A., eta Arthur P. Arnold A. P. (2009). Sex Chromosome Complement Affects Nociception and Analgesia in Newborn Mice. *J Pain*; 9(10): 962–969. doi: 10.1016/j.jpain.2008.06.001.
- Hanna C. W. eta Kelsey G. (2014). The specification of imprints in mammals. *Heredity*; 113, 176–183; doi:10.1038/hdy.2014.54.
- Horsthemke B. eta Wagstaff J. (2008). Mechanisms of imprinting of the Prader–Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A* 146A: 2041–2052.
- Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M. eta Haussler D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res.*12(6):996-1006.
- Kim J., Ekram M. B. Kim H., Faisal M., Frey W. D., Huang J. M., Tran K., M. Kim M. M. eta Yu S. (2012). Imprinting control region (ICR) of the Peg3 domain. *Hum Mol Genet*; 21(12): 2677–2687. doi: 10.1093/hmg/ddc092
- Knoll J. H. M., Nicholls R. D., Magenis R. E., Graham J. M. J., Lalande M. eta Latt S. A. (1989). Angelman and Prader–Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 32: 285–290.
- Li E., Beard C. eta Jaenisch R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*; 366:362-365.
- Marx V. (2012). Epigenetics: Reading the second genomic code. *Nature*. 491,143–147. doi:10.1038/491143a.
- McEwen K.R. eta Ferguson-Smith A.C. (2010). Distinguishing epigenetic marks of developmental and imprinting regulation. *Epigenetics & Chromatin* 3(1): 2. doi: 10.1186/1756-8935-3-2.
- Michael M. M. eta MacDonald J. C. (2011). Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br J Pharmacol*; 164(4): 1322–1334. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01335.x
- Nicholls R.D. eta Knepper J.L. (2001). Genome organization, function, and imprinting in Prader–Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 153–175.
- Ornoy A., Michailovskaya V., Lukashov I., Bar-Hamburger R. eta Harel S. (1996). The developmental outcome of children born to heroin-dependent mothers, raised at home or adopted. *Child Abuse Negl.*, 20(5):385-96.
- Rice, J. C. eta Allis, C. D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 263-273.
- Subirán S., Casis L., eta Irazusta J. (2011). Regulation of Male Fertility by the Opioid System. *Mol Med*; 17(7-8): 846–853. doi: 10.2119/molmed.2010.00268.
- Tapocik J. D., Letwin N, Mayo C.L., Frank B., Luu T., Achinike O., House C., Williams R., Elmer G. I. eta Lee N.H. (2009). Identification of candidate genes and gene networks specifically associated with analgesic tolerance to morphine. *J Neurosci.*;29:5295–307.
- Turner, B. M. (2011). Environmental sensing by chromatin: an epigenetic contribution to evolutionary change. *FEBS Lett.* 585, 2032-2040.
- Williamson C.M., Blake A., Thomas S., Beechey C.V., Hancock J., Cattanaach B.M. eta Peters J. (2013). MRC Harwell, Oxfordshire. World Wide Web Site - Mouse Imprinting Data and References - http://www.har.mrc.ac.uk/research/genomic_imprinting/

7. Eskerrak eta oharrak

Iraia Muñoa Hoyosek Eusko Jaurlaritzako laguntza predoktorala jaso du eta Marta Gianzo Citoresek Eusko Jaurlaritzako Zabalduz diru laguntza predoktorala. Bestalde, aipatu beharra dago lan honetan azaltzen diren emaitzak, Birminghameko Unibertsitatearekin hasitako kolaborazio lan baten ondorio direla.