

**Delgado-Calle J<sup>1</sup>, Alonso MA<sup>2</sup>, Ortiz J<sup>2</sup>, Montero A<sup>2</sup>, Garcés C<sup>2</sup>, Sañudo C<sup>1</sup>, Pérez-Aguilar MD<sup>2</sup>, Pérez Núñez MI<sup>2</sup>, Riancho JA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Universidad de Cantabria - IDIVAL - RETICEF - Santander

<sup>2</sup> Servicio de Traumatología y Ortopedia - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Universidad de Cantabria - IDIVAL - Santander

## Análisis comparativo del epigenoma del tejido óseo y de osteoblastos primarios

Correspondencia: José A. Riancho - Departamento de Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Avda. Valdecilla, s/n - 39008 Santander (España)

Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Fecha de recepción: 25/04/2014

Fecha de aceptación: 17/06/2014

### Resumen

**Objetivos:** Los mecanismos epigenéticos, y en particular la metilación de las citosinas en las regiones promotoras, modulan la expresión de muchos genes. Sin embargo, su papel en la homeostasis esquelética apenas ha sido estudiado. En particular, se desconoce si los patrones de metilación de las células óseas en cultivo son un buen reflejo de lo que ocurre en el tejido óseo. El objetivo de este trabajo fue explorar las posibles diferencias en la metilación de citosinas en muestras de hueso humano y en osteoblastos.

**Material y métodos:** Para ello efectuamos un estudio de todo el genoma analizando el grado de metilación de 23.667 *loci* y comparamos los resultados en muestras de tejido óseo y en cultivos de osteoblastos primarios.

**Resultados:** Globalmente observamos una buena correlación entre ambos tipos de muestras, tanto en el conjunto de *loci* ( $r^2=0,87$ ;  $p<10^{-50}$ ), como en los localizados en genes involucrados en el metabolismo óseo. Sin embargo, una fracción de *loci* (7-8%) se desviaron de esa tendencia general y mostraron diferencias en la metilación superiores al 20%.

**Conclusiones:** Estos resultados indican que los datos de metilación obtenidos en cultivo no necesariamente son un fiel reflejo de lo que ocurre en los tejidos, por lo que se debe tener precaución antes de extrapolarlos a la situación en vivo.

**Palabras clave:** metilación de ADN, epigenética, osteoblastos.

# Comparative epigenomic analysis of bone tissue and primary osteoblasts

## Summary

**Objectives:** Epigenetic mechanisms, and in particular cytosine methylation in the promoter regions, modulate the expression of many genes. However, their role in skeletal homeostasis has scarcely been studied. In particular, it is not known if the patterns of methylation of bone cells in culture are a good reflection of that which occurs in bone tissues. The aim of this work was to explore the possible differences in cytosine methylation in human bone and in osteoblasts.

**Material and methods:** To achieve this we carried out a genome-wide study, analysing the degree of methylation of 23,667 *loci* and comparing the results in samples of bone tissue and in cultures of primary osteoblasts.

**Results:** Overall, we observed a good correlation between the two sample types, both in the whole group of *loci* ( $r^2=0,87$ ;  $p<10^{-50}$ ), and in those located in genes involved in bone metabolism. However, some of the *loci* (7-8%) deviated from this general tendency and showed differences in methylation greater than 20%.

**Conclusions:** These results indicate that the methylation data obtained in cultures are not necessarily a true reflection of that which occurs in tissues, which means that care should be taken when extrapolating such results to an *in vivo* situation.

**Key words:** DNA methylation, epigenetics, osteoblasts.

## Introducción

Algunas enfermedades esqueléticas frecuentes, como la osteoporosis o la artrosis, tienen una clara tendencia a la agregación familiar, lo que sugiere que su componente hereditario es importante<sup>1</sup>. De hecho, en varios estudios se ha estimado que la herencia explica hasta el 50-80% de la variabilidad de la masa ósea<sup>2,3</sup>. Sin embargo, las variantes alélicas identificadas en los estudios de genes candidatos y los barridos de todo el genoma (“*genome-wide association studies*”, GWAS) apenas explican una pequeña proporción de ese componente hereditario<sup>4,6</sup>. Los mecanismos epigenéticos pueden contribuir a explicar ese fenómeno. Estos permiten adaptar la expresión de los genes a las condiciones ambientales. Incluyen la metilación del ADN, las modificaciones postraslacionales de las histonas, los ARN no codificantes y la estructura general de la cromatina<sup>7-9</sup>.

En el ADN humano, la mayor parte de las citosinas que van seguidas de una guanina se encuentran metiladas. Se cree que ello da estabilidad al ADN. Sin embargo, en las regiones promotoras de muchos genes hay zonas ricas en citosinas seguidas de guanina (llamadas islas CpG) que pueden estar metiladas o no<sup>10</sup>. El grado de metilación de esas islas se correlaciona con la actividad transcripcional: en general, a mayor metilación, menor expresión del gen<sup>11,12</sup>.

Apenas hay estudios sobre la metilación de islas CpG en el hueso o en osteoblastos, en especial en humanos. Tampoco se conoce si los patrones de metilación en islas CpG en osteoblastos son equiparables a los observados en hueso o no. Por eso,

el objetivo de este trabajo fue explorar la metilación de citosinas a lo largo de todo el ADN en muestras de hueso humano, y comparar los resultados con los patrones de metilación en osteoblastos primarios en cultivo.

## Material y métodos

### Hueso y cultivos de osteoblastos

Se tomaron muestras de hueso trabecular de la cabeza femoral de mujeres sometidas a artroplastia de cadera (fracturas, artrosis), mediante un trócar dentado. Los cilindros se obtuvieron de la región central de la cabeza, evitando el hueso subcondral y las zonas de fractura y osteotomía, según se ha descrito previamente<sup>13</sup>. Tras lavarlas extensamente en PBS, se congelaron en nitrógeno líquido o se sembraron en frascos de plástico en medio Dulbecco suplementado con 10% de suero bovino y antibióticos para obtener osteoblastos a partir de esos explantes<sup>14</sup>.

### Análisis de la metilación

Tras pulverizar los fragmentos óseos, se aisló el ADN por el procedimiento previamente publicado<sup>12</sup>. Se utilizó un procedimiento similar para extraer el ADN de los cultivos confluentes de osteoblastos, de pases primero o segundo<sup>15</sup>. Para analizar la metilación se utilizaron *arrays* de metilación (Infinium Human Methylation 27 DNA análisis bead-chip, Illumina) que exploran unos 27.000 *loci* CpG localizados en las regiones promotoras de unos 14.500 genes. El grado de metilación de cada *locus* se expresa como un valor  $\beta$ , que oscila entre 0 y 1 y es proporcional a la metilación (0-100%). Los detalles del método han sido publicados previamente<sup>16</sup>.

**Análisis de los resultados**

Los valores  $\beta$  se multiplicaron por 100 para estimar el porcentaje de metilación. Se calcularon los valores promedio de metilación observados en 15 huesos de pacientes con fractura y en 15 huesos de pacientes con artrosis y que fueron incluidos en un estudio previo<sup>16</sup>. La media de la edad era de 77 años. Los resultados se compararon con el promedio de la metilación observada en dos cultivos de osteoblastos (uno procedente de un hueso con fractura y otro de un hueso con artrosis), que, para reducir las fuentes de variabilidad, fueron analizados conjuntamente en los mismos *arrays* que las muestras de hueso. Para comparar la metilación en ambos tipos de muestras se utilizaron pruebas de correlación y regresión lineal. Para identificar los genes relacionados con el hueso se exploraron las bases de datos bioinformáticos y los trabajos de la literatura.

**Resultados**

Se exploraron un total de 23.667 *loci*. Como se muestra en la figura 1, cuando se analizaron conjuntamente todos los *loci* CpG explorados, se encontró una correlación directa entre el nivel de metilación en hueso y en osteoblastos ( $r^2=0,88$ ;  $p<10^{-50}$ ). Asimismo, en términos generales el promedio de metilación en ambos tipos de muestras era similar (pendiente de la recta de regresión,  $b=1,009$ ; ordenada en el origen  $-4$ ). Sin embargo, había un número relevante de *loci* que se desviaban de esa relación (Figura 1). Para analizar si esas desviaciones dependían de genes no relacionados con el hueso, se hizo un subanálisis limitado a 658 *loci* localizados en 319 genes que están claramente relacionados con la homeostasis esquelética. El resultado fue similar al del análisis global (Figura 2). Existía una correlación general en el nivel de metilación de ambas muestras ( $r^2=0,87$ ;  $p<10^{-50}$ ), pero una fracción significativa de genes se desviaba de la relación general.

Restringiendo el análisis a los 319 genes óseos (de los que se exploraron 658 *loci*), la metilación en hueso era levemente mayor que en cultivo (diferencia promedio 3,8%;  $p=2,4 \times 10^{-15}$ ; figura 3). En concreto, de los 658 *loci*, 117 (17,8%) mostraban diferencias superiores al 10%. De ellos, el 61% estaban más metilados en el tejido óseo que en los cultivos, mientras que en el 39% de los *loci* la metilación era mayor en los cultivos. En 45 *loci* la diferencia del porcentaje de metilación era superior a 20 puntos, distribuyéndose en este caso por igual el exceso de metilación entre el tejido óseo y los cultivos. Los genes en los que se situaban esos *loci* se exponen en la tabla 1.

**Discusión**

El análisis del epigenoma, y en particular del patrón de metilación del ADN, está siendo objeto de un interés creciente, dado el papel que desempeña en determinar el patrón de expresión génica a lo largo de los diferentes estadios de diferenciación de las estirpes celulares, así como en su adaptación a las condiciones cambiantes del medio. Su

Figura 1. Porcentajes de metilación en tejido óseo y en cultivos de osteoblastos en el conjunto de *loci* analizados

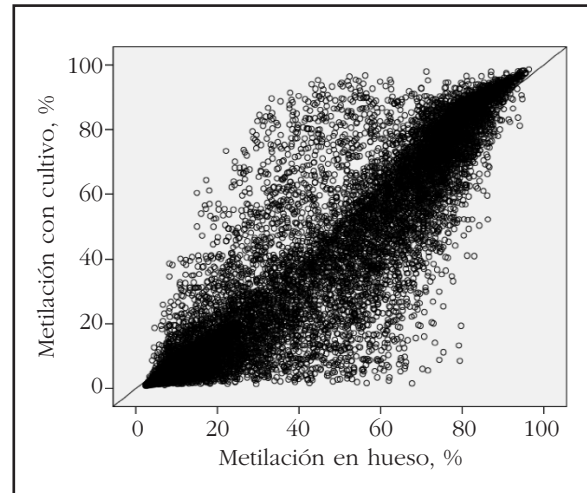


Figura 2. Porcentajes de metilación en tejido óseo y en cultivos de osteoblastos en *loci* correspondientes a genes relacionados con el metabolismo óseo

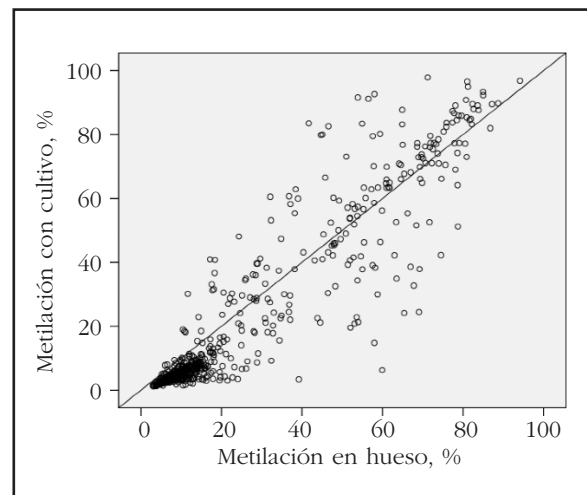


Figura 3. Distribución de frecuencias de las diferencias de metilación entre tejido óseo y osteoblastos en cultivo. Sólo se representan los datos correspondientes a los genes relacionados con el metabolismo óseo

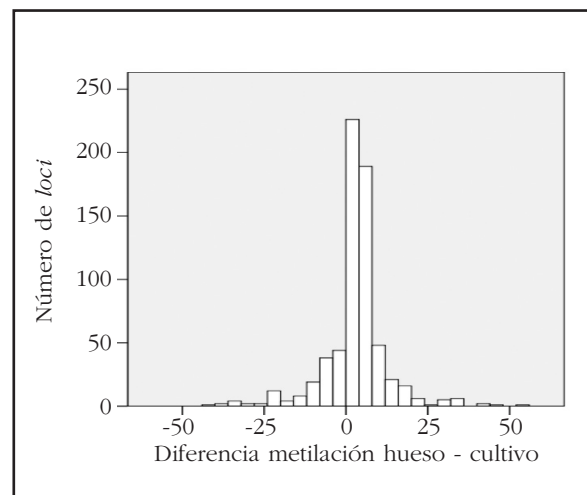


Tabla 1. Genes relacionados con el metabolismo óseo en los que se observaron diferencias de metilación superiores a 20 puntos porcentuales entre el tejido óseo y los cultivos de osteoblastos primarios. Se indica el número de *loci* CpG con diferencias de metilación

Gen	Nº <i>loci</i>
ACVRL1	1
AMH	1
APC	1
AR	2
ATP6V0D2	1
BGN	1
CDKN2B	4
CHRD	1
COL3A1	1
CXCL12	1
DLX5	1
ENG	1
FGF1	1
FGFR1	2
FKBP1B	1
GDF5	1
IL1B	1
IL1RN	1
ITGAM	1
LGALS1	1
MAP4K1	1
MAPK1	1
MAPK10	1
MSX1	7
NR3C1	1
PTH1H	1
PTHR1	1
SFRP1	1
SMAD2	1
TGFB3	1
TNF	1
TRAF1	1
WISP1	1
WNT6	1

papel en algunas enfermedades también parece importante, especialmente en los procesos neoplásicos<sup>17</sup>. De hecho, diferentes estudios han relacionado los cambios en la metilación de los promotores con las alteraciones en la expresión de genes facilitadores o inhibidores del desarrollo de tumores<sup>18-20</sup>. Sin embargo, el papel de los patrones de metilación en las enfermedades esqueléticas no tumorales apenas es conocido.

Uno de los factores que dificultan el análisis del epigenoma es que, a diferencia del genoma, el epigenoma es específico de cada tejido. Esto resulta lógico, puesto que los patrones de expresión génica deben estar alineados con las funciones específicas de ese tejido (de hecho, con las de cada tipo celular). De ahí que, dada la dificultad que plantea la obtención de muestras del esqueleto, exista poca información sobre el epigenoma del hueso.

Nuestro grupo ha publicado recientemente un análisis del patrón de metilación del tejido óseo en pacientes con osteoporosis y con artrosis<sup>16</sup>. En el presente estudio, aprovechamos esos datos para compararlos con el patrón de metilación de los osteoblastos primarios en cultivo, a fin de determinar hasta qué punto son similares. Este análisis es importante a fin de explorar si las células en cultivo son o no un buen reflejo del patrón tisular y, en consecuencia, si los cambios inducidos por diversas manipulaciones de los cultivos pueden ser relevantes para el tejido.

En este estudio de genoma completo, en el que hemos analizado unos 23.000 *loci*, hemos comprobado que, en general, existe una buena correlación en los patrones de metilación en el hueso y los osteoblastos primarios en cultivo. Sin embargo, algunos genes se desvían claramente de ese patrón. La desviación no sigue un patrón sistemático, y afecta tanto a genes que se han relacionado con el metabolismo óseo como a otros. Globalmente, un 17-18% de los *loci* (situados en genes relacionados con vías metabólicas del hueso o no) presentan desviaciones en el grado de metilación superiores al 10%. La proporción de genes con diferencias superiores al 20%, ciertamente relevante desde el punto de vista biológico, fue del 7-8%, similar en el total de *loci* y en aquellos localizados en el subgrupo de genes relacionados con el hueso. Hay varias razones que pueden justificar esas diferencias. Por un lado, el propio cultivo puede inducir cambios fenotípicos en las células, incluyendo cambios en los patrones de expresión y metilación génica. Por otro, en el tejido óseo hay una variedad de estirpes celulares, no sólo osteoblastos, que no se encuentran representadas en los cultivos. Lamentablemente, no es posible cultivar osteocitos, una especie muy abundante en el hueso, para hacer un estudio comparativo similar al efectuado con los osteoblastos.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio indican que existe una buena correlación global en los patrones de metilación entre el tejido óseo y los osteoblastos. Sin embargo, algunos genes presentan patrones claramente divergentes,

con frecuencia similar en el subgrupo de genes relacionados con el metabolismo óseo y en el global de genes analizados. Por tanto, los datos de metilación observados en cultivo pueden no ser representativos de la situación en vivo.

Estudio financiado en parte por una beca del Instituto de Salud Carlos III (PI 12/635).

### Bibliografía

- Riancho JA, González-Macías J. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Madrid: Jarpyo, 2004.
- Ralston SH. Osteoporosis as an hereditary disease. *Clin Rev Bone Miner Metab* 2010;8:68-76.
- Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2010;31:629-62.
- Riancho JA, Zarrabeitia MT, Gonzalez-Macias J. Genetics of osteoporosis. *Aging Health* 2008;4:365-76.
- Riancho JA. Genome-wide association studies (GWAS) in complex diseases: advantages and limitations. *Reumatol Clin* 2012;8:56-7.
- Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012;44:491-501.
- Delgado-Calle J, Garmilla P, Riancho JA. Do epigenetic marks govern bone mass and homeostasis? *Curr Genomics* 2012;13:252-63.
- Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009;8:268-76.
- Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta* 2014 Feb 19. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.02.007. [Epub ahead of print].
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;128:669-81.
- Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 2007;23:413-8.
- Delgado-Calle J, Sanudo C, Fernandez AF, Garcia-Renedo R, Fraga MF, Riancho JA. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics* 2012;7:83-91.
- Hernandez JL, Garces CM, Sumillera M, Fernandez-Aldasoro EV, Garcia-Ibarbia C, Ortiz JA, et al. Aromatase expression in osteoarthritic and osteoporotic bone. *Arthritis Rheum* 2008;58:1696-700.
- Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, Perez-Castrillon JL, Perez-Aguilar MD, Perez-Nuñez MI, et al. Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study. *Osteoporos Int* 2010;21:109-18.
- Delgado-Calle J, Sanudo C, Sanchez-Verde L, Garcia-Renedo RJ, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone* 2011;49:830-8.
- Delgado-Calle J, Fernandez AF, Sainz J, Zarrabeitia MT, Sanudo C, Garcia-Renedo R, et al. Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:197-205.
- Choi JD, Lee JS. Interplay between epigenetics and genetics in cancer. *Genomics Inform* 2013;11:164-73.
- Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:87-95.
- Tost J, Hamzaoui H, Busato F, Neyret A, Mourah S, Dupont JM, et al. Methylation of specific CpG sites in the P2 promoter of parathyroid hormone-related protein determines the invasive potential of breast cancer cell lines. *Epigenetics* 2011;6:1035-46.
- Jose-Eneriz E, Agirre X, Rodriguez-Otero P, Prosper F. Epigenetic regulation of cell signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics* 2013;5:525-38.