

Trabajo Fin de Grado

Regulación génica por REX1 en células troncales

Epigenética de las dianas genómicas

AUTOR:

JOSÉ JAVIER MARQUETA GRACIA

DIRECTORES:

JON SCHOORLEMMER
PEDRO MUNIESA

LUGAR DE REALIZACIÓN:

GRUPO DE PLURIPOTENCIA EN CÉLULAS TRONCALES
EMBRIONARIAS.
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE ARAGÓN.

VISTO BUENO DE LOS DIRECTORES

Los Doctores Jon Schoorlemmer y Pedro Muniesa Lorda acreditan como directores que el alumno José Javier Marqueta Gracia ha realizado el trabajo de fin de grado "Regulación génica por REX1 en células troncales. Epigenética de las dianas genómicas" y otorgan el V.º B.º a su contenido para su presentación al Tribunal de Trabajo fin de Grado.

Fdo. Dr. Jon Schoorlemmer



Fdo. Dr. Pedro Muniesa Lorda



Grado de Biotecnología, Zaragoza a 22 de Junio de 2016

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Dr. Jon Schoorlemmer por su constante apoyo y supervisión. Ha sido un auténtico placer tener la posibilidad de aprender de primera mano conocimientos de un investigador de tan alto prestigio.

A la futura Dra. Sofía Macías por estar siempre dispuesta a ayudar en los momentos más difíciles y ser una excelente educadora.

Y finalmente a la Unidad de Secuenciación y Genómica Funcional, como al resto del Centro de Investigación Biomédica de Aragón por la gran labor realizada que ha permitido la consecución de este trabajo.

ÍNDICE

Abreviaturas

Resumen/Abstract pág.1

Antecedentes

Células Madre Embrionarias pág. 2
REX1 en el desarrollo embrional pág. 2
Dianas genómicas de REX1 págs. 3-4
Tratamiento de DNA con bisulfito pág. 4-5
Amplificación mediante el uso de un primer universal págs. 5
Pirosecuenciación pág. 6

Objetivos/Planteamiento del trabajo pág. 7

Técnicas y equipos utilizados

Líneas celulares pág. 8
Extracción de DNA genómico pág. 8
Tratamiento DNA genómico con bisulfito pág. 9
Preparación y condiciones de PCR págs. 9-10
Visualización Productos PCR págs. 10-11
M13 pirosecuenciación págs. 11-12
Análisis estadístico pág. 12

Resultados y discusión

Caracterización DNA genómico pág. 13
Diana genómica asociada al locus *Nespas* págs. 13-17
Diana genómica asociadas a los loci *Chd2*, *PisD* y *Ly6c1* págs. 18-21
Grado de metilación de *Nespas* en distintas líneas celulares págs. 21-23

Conclusiones/Conclusions pág. 24

Bibliografía pág. 25

Anexo 1: Secuencias de primers.

Anexo 2: Condiciones de PCR para la amplificación de dianas genómicas.

Anexo 3: Pirogramas relacionados con el locus *Nespas*.

Anexo 4: Pirogramas del locus *Nespas* con el primer de secuenciación 607.

Anexo 5: Pirogramas del locus *Nespas* con el primer de secuenciación 609.

ABREVIATURAS

- ATP: Adenosine Triphosphate
- Bp: Base pairs.
- ChIP-seq: Chromatin Immunoprecipitation Sequencing
- *Dnmt1*: DNA metiltransferasa 1
- *Dnmt3a*: DNA metiltransferasa 3a
- *Dnmt3b*: DNA metiltransferasa 3b
- DMRs: Differentially Methylated Regions
- DNA: DeoxyriboNucleic Acid
- dNTP: DeoxyNucleotide Triphosphate
- ES: Embrionic Stem
- ICM: Inner Cell Mass
- Kb: Kilobases
- KO: KnockOut
- ON: OverNight
- PBS: Phosphate Buffered Saline
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- RNA: RiboNucleic Acid
- REX1: Reduced Expression-1
- Rpm: Revoluciones por minuto
- TSS: Transcription Starting Site
- Wt: Wild type
- YY1: YingYang1

RESUMEN

Los mecanismos moleculares que están detrás de las funciones reguladoras del factor de transcripción REX1 durante el desarrollo embrional son en muchos aspectos todavía una incógnita. Recientes descubrimientos revelaron que numerosas dianas genómicas de REX1 poseen marcas epigenéticas indicativas de improntas genéticas.

En el presente trabajo se llevó a cabo la puesta a punto de ensayos que permiten estudiar el nivel de metilación asociado a dinucleótidos CpG en loci diana de REX1: *Nespas*, *Chd2*, *PisD* y *Ly6c1*. Para ello, DNA genómico de células madre embrionarias (ES) de ratón fue tratado con bisulfito y se diseñaron experimentos de amplificación para cada locus. Un primer intento de amplificación mediante el uso de un primer de secuencia universal (M13) produjo productos poco o no aptos para la cuantificación mediante pirosecuenciación. Como solución se decide utilizar uno de los primers directamente biotinilado.

Resultados de un primer ensayo en el locus *Nespas* mostró aproximadamente la mitad de metilación en células ES carentes de *Rex1* que en células ES wild type (wt). A falta del estudio de loci adicionales para una posible generalización, esta observación sugiere para REX1 un papel protector de la metilación de sus sitios de unión.

ABSTRACT

The molecular mechanisms that underlie the regulatory functions of the transcription factor REX1 during embryonic development remain poorly defined. Recent studies have revealed that several genomic targets of REX1 carry epigenetic marks that usually are associated with genomic imprinting.

In the present project, assays were developed to determine the methylation levels of dinucleotides CpG in REX1 target loci: *Nespas*, *Chd2*, *PisD* and *Ly6c1*. Genomic DNA of mouse Embryonic Stem (ES) cells was converted with bisulfite and each locus was amplified. A first attempt using an universal primer (M13) for amplification resulted in the generation of little or no valid products for their posterior sequencing. To solve the problem, it is necessary to use a biotinylated gene-specific primer.

Results of a first assay in the *Nespas* locus showed that methylation levels in ES cells lacking *Rex1* are approximately half the levels found in wild type (wt) cells. While additional loci have to be studied to generalize this finding, this result suggests a potential role of REX1 as a protector of the methylation at its binding sites.

ANTECEDENTES

Células Madre Embrionarias

Las células ES tienen su origen en la masa celular interna del blastocisto. La masa celular interna (ICM) es extraída y puesta en cultivo derivándose a células ES que se mantienen por un aparente ilimitado número de divisiones. Las células ES conservan la propiedad de pluripotencialidad que es la capacidad de diferenciarse en cualquiera de las tres líneas celulares que forman las capas del embrión: ectodermo, mesodermo y endodermo¹.

REX1 en el desarrollo embrional

Reduced Expression-1 (REX1), también conocido como ZFP42, es un factor de transcripción de 37 kDa, que contiene cuatro motivos Cys-His (dedos de zinc)². El gen codificante se localiza en el cromosoma 8 de ratón (Gene ID: 22702). REX1 pertenece a la familia de las proteínas YING YANG1 (YY1) y mantiene altamente conservada la región de los dedos de zinc³. *Rex1* surge a partir de una duplicación por retro-transposición de *Yy1* durante la evolución de los mamíferos. *Rex1* está presente únicamente en mamíferos placentarios, al contrario que *Yy1* la cual se expresa en todos vertebrados e incluso en insectos voladores.

Se ha identificado la expresión de *Rex1* en numerosos, pero no en todos, tipos de células madre en cultivo, incluyendo embrionarias y adultas^{4,5}. Niveles moderados de expresión han sido detectados también durante la espermatogénesis y en placenta^{4,6}. *Rex1* se expresa a lo largo del desarrollo de preimplantación del embrión⁷ y en las células derivadas del trofoectodermo del embrión⁴. La expresión de *Rex1* en células madre ha conllevado a que sea ampliamente utilizado como un marcador de pluripotencia en este tipo celular⁴. Estudios de pérdida de función en los que se generaron líneas *KnockOut* (KO) para *Rex1* observaron que se trata de un gen dispensable para la adquisición de pluripotencia durante la preimplantación y para el cultivo de células madre⁸. A pesar de resultar un gen dispensable, el cruce de ratones deficientes para *Rex1* generaron crías de menor tamaño y por debajo de los ratios mendelianos⁸, mientras que la disminución de la expresión de *Rex1* en células ES de ratón mediante la utilización de shRNA reduce la capacidad de auto-renovación de dichas células en cultivo⁹.

Aunque la función de REX1 en cada sitio de expresión no ha sido del todo aclarada, REX1 controla la expresión de elementos retrovirales de la familia muERV-L⁹ y contribuye a la expresión génica regulada por improntas¹⁰. Una de las funciones conocidas de REX1 es el mantenimiento de la inactivación del cromosoma X¹¹, un proceso relacionado a la impronta que a su vez es ligado a la pluripotencia de células madre.

Dianas genómicas de REX1

Varias de las dianas genómicas de REX1 están sometidas a procesos de impronta genética, lo que significa que contienen regiones diferencialmente metiladas según la procedencia paterna o materna del alelo¹⁰. Entre ellos se encuentran *Peg3* y *Nespas*. El locus *Nespas* produce un RNA no codificante, cuyo promotor se encuentra no metilado y activo en el alelo de origen paterno, mientras que el alelo de origen materno está metilado y por tanto, silenciado¹².

Experimentos realizados en DNA aislado de embriones en etapa de blastocisto provenientes del cruce de ratones WT y KO para *Rex1* evidenciaron que dos loci, *Peg3* y *Nespas* se encontraban hipermetilados en los embriones KO, mientras que embriones heterocigotos mantenían niveles de metilación normales sugiriendo así que se necesita al menos de la mitad de la dotación de *Rex1* para mantener un alelo desmetilado¹⁰.

La metilación alelo-específica ocurre durante la gametogénesis y se mantiene en las células somáticas¹³. En mamíferos la metilación ocurre predominantemente en dinucleótidos CG (que comúnmente están incorporados en islas CpG) en la posición C5 de las citosinas y es catalizada por dos tipos principales de metiltransferasas: DNA metiltransferasa1 (*Dnmt1*) cuya función es metilar las islas CpG de la nueva hebra de DNA tras la replicación y DNA metiltransferasas 3a y 3b (*Dnmt3a* y *Dnmt3b*) que son fundamentales para el establecimiento de los patrones de metilación durante el desarrollo, es decir las responsables de la metilación en células ES¹⁴.

Para identificar dianas genómicas de REX1 *in vivo* se realizó un experimento de inmunoprecipitación de cromatina con secuenciación masiva de DNA (ChIP-seq)¹⁵. El análisis (D. Guallar, P.Muniesa, J. Schoorlemmer et al., manuscrito en preparación, Fig.1) muestra que REX1 se une mayoritariamente a zonas del DNA distantes del inicio de transcripción de genes.

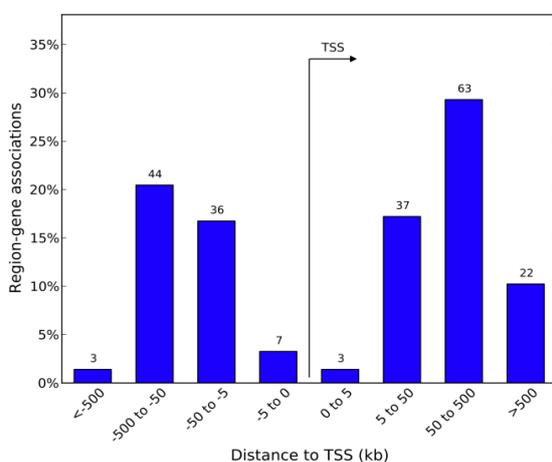


Fig1. Diagrama de barras que indica la distancia entre los sitios de binding de REX1 y el sitio de inicio de transcripción de los genes más cercanos. En horizontal se muestra la distancia en kilobases. En vertical, el porcentaje de TSS con respecto al total de genes que se han encontrado a esa distancia (el número encima de las barras hace referencia a la cantidad de TSS). Como puede observarse las 150 zonas de unión analizadas se encuentran, predominantemente, alejadas de genes.

La forma en la que REX1 regula sus dianas genómicas es todavía una incógnita. Sin embargo, los sitios de unión solapan con marcas específicas de histonas: H3K4Me3, H3K9Me3 y H4K20Me3 (D. Guallar, P. Muniesa, J. Schoorlemmer et al., manuscrito en preparación, Fig.2). La combinación de estas marcas se asocia con improntas y regiones diferencialmente metiladas (DMRs), sugiriendo una regulación alélica de los loci a los que se asocia REX1.

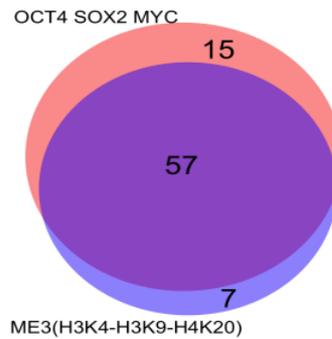


Fig2. Diagrama de Venn. Representación del número de dianas genómicas de REX1 (1) marcadas con trimetilación (ME3) de H3K4, H3K9 y H4K20; (2) que solapan con la unión de factores específicos de células madre OCT4, SOX2 y MYC

Tratamiento de DNA con bisulfito

Con el propósito de llevar a cabo un análisis de metilación se utiliza una técnica que se basa en los siguientes principios¹⁶: En primer lugar se realiza una conversión con bisulfito de sodio del DNA genómico y posteriormente un paso de desulfonación, lo que provoca la desaminación de citosinas convirtiéndolas en uracilos. La metilación de citosinas típica en dinucleótidos CpG impide la conversión (Fig.3).

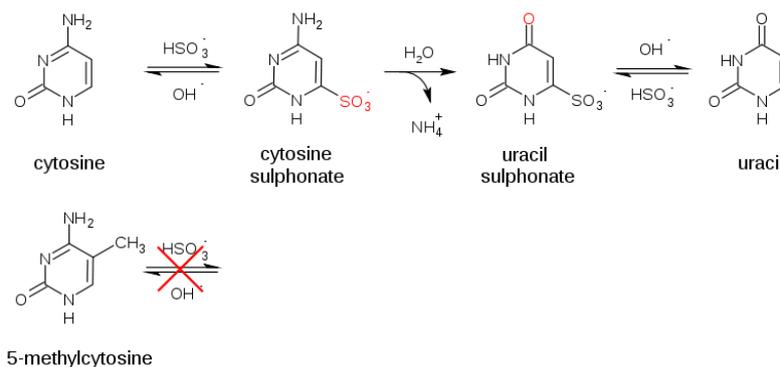


Fig3. Conversión de citosinas con bisulfito de sodio. La citosina sufre una serie de ataques químicos que provocan la desaminación de su grupo amino en posición 4 convirtiéndose en uracilo. La citosina metilada en posición 5 está protegida del ataque químico y permanece inalterada. (Imagen aportada bajo licencia de CreativeCommons, autor Jujubix).

Después del tratamiento se procede a amplificar el DNA mediante PCR, lo cual resulta en la sustitución de los uracilos que se habían formado por timinas¹⁶. Dependiendo del grado de metilación del locus bajo análisis, en la PCR se genera una mezcla de productos que conservan la secuencia CG original, o por el contrario la han cambiado a TG¹⁶.

Amplificación mediante el uso de un primer universal

El proceso de amplificación de las dianas genómicas para su posterior secuenciación, y la preparación de *template* para la posterior secuenciación se explica en el pie de la Figura 4. Para facilitar el análisis de múltiples locus, se hace uso de un primer de secuencia universal biotinilado (M13)¹⁷.

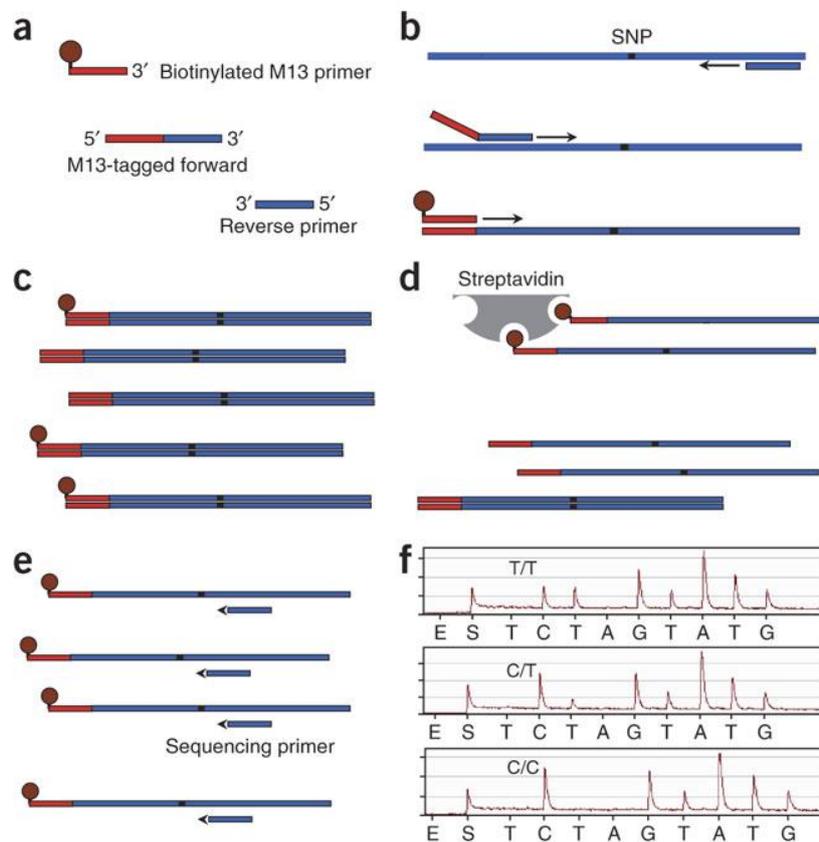


Fig4. Esquema de PCR asistida por M13 para generar productos para su pirosecuenciación. (a) Primers utilizados. Se utilizan dos primers específicos de locus para la amplificación. Uno de ellos se extiende en el extremo 5' con una secuencia universal llamada M13. Se incluye un tercer primer que consiste en la secuencia universal M13 y está biotinilado. (b) Durante la PCR la cola de M13 es añadida al amplicón lo que permite la inclusión del primer M13 biotinilado en el producto final marcando el amplicón con biotina. (c) El ratio de productos marcados y no marcados depende la cantidad de primer M13 biotinilado y primer con la secuencia M13 utilizados. (d) El DNA marcado con biotina es desnaturalizado y la cadena marcada con biotina es atrapada por partículas de estreptavidina. (e) Se utiliza un primer de secuenciación para unirse a la monohebra y comenzar la elongación. (f) La secuencia es analizada en forma de pirogramas que permiten estudiar los niveles de metilación de dinucleótidos CpG.

Pirosecuenciación

Para analizar el grado de metilación es necesario realizar una secuenciación cuantitativa, en este caso se utiliza la pirosecuenciación. El proceso es explicado en el pie de la figura 5.

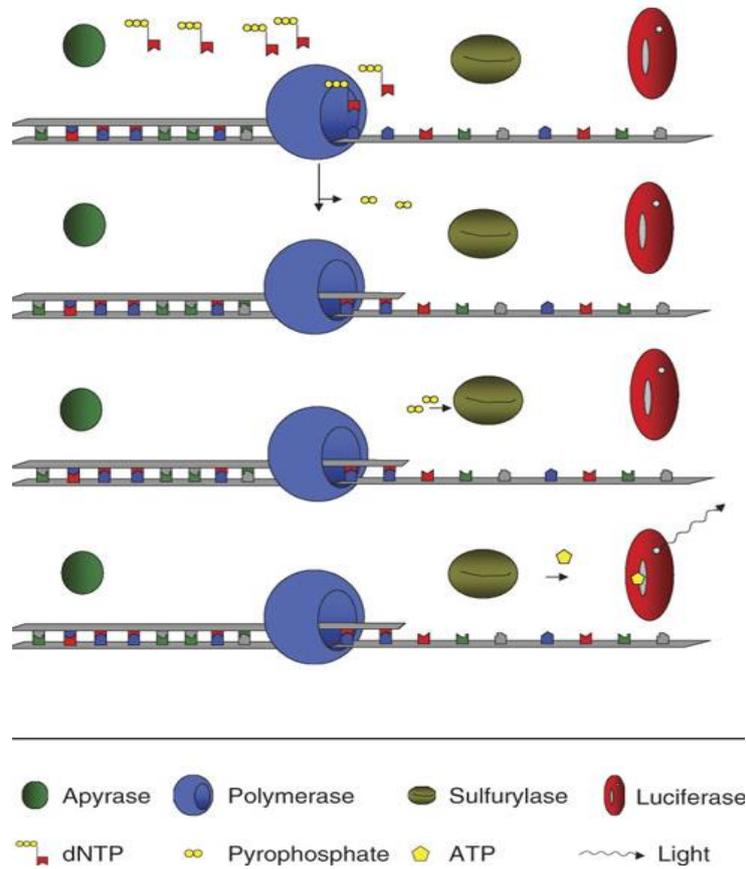


Fig5. Proceso de pirosecuenciación. La DNA polimerasa completa la cadena monohebra desde el primer de secuenciación con el dNTP correspondiente. Su incorporación libera una molécula de pirofosfato convertida a ATP por la sulfurilasa. A su vez el ATP es transformado por la luciferasa en luz detectable. La relación entre la incorporación de dNTPs y la luz emitida es proporcional lo que permite la secuenciación cuantitativa. La apirasa se encarga de eliminar los dNTPs no añadidos. (Imagen obtenida de Royo, J. Et al.¹⁷).

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Bajo la premisa de que REX1 actúa como regulador epigenético, se pretende analizar el grado de metilación en dinucleótidos CpG de sus dianas genómicas. El primer paso para realizar ese objetivo es llevar a cabo la puesta a punto de ensayos que permitan su secuenciación cuantitativa. Para desarrollar los ensayos, es necesario establecer las condiciones de PCR para la amplificación de cada locus una vez se ha tratado el DNA genómico, optimizando los siguientes variables: funcionalidad y especificidad de las parejas de primers, temperatura de *annealing*, cantidad de ciclos y necesidad o no de realizar una *Nested* PCR. Una vez amplificada la secuencia, será necesario establecer unas condiciones de pirosecuenciación que permitan calcular el grado de metilación. Se estudiarán en células ES de ratón dianas asociadas a distancia de los loci *Chd2*, *Ly6c1* y *PisD* identificadas previamente en el grupo y el locus *Nespas*, que ya fue identificado como diana de REX1 y del que ya se han realizado estudios¹⁰.

Una vez se haya conseguido establecer un protocolo que permita una eficaz amplificación y secuenciación de cada diana genómica, el siguiente paso es su aplicación sobre diferentes líneas celulares para comparar los niveles de metilación entre ellas, como parte del proceso de instauración del ensayo. En este trabajo se procede a comparar (1) entre una línea de cultivo continuo (con un elevado número de pases) y otra línea de reciente derivación para valorar el efecto de cultivo y (2) entre líneas deficientes en *Rex1* (*Rex1*^{-/-}) y silvestres (*Rex1*^{+/+}).

En resumen, se pretende conseguir la implantación de un ensayo que permita en un futuro comparar el nivel de metilación de dinucleótidos CpG de varias dianas genómicas de REX1 en diferentes líneas celulares y tejidos de ratón. Una vez consolidado, el ensayo permitirá estudiar tanto una posible relación entre el nivel de metilación y la presencia o ausencia de *Rex1*, como la influencia que tiene la metilación sobre la unión de REX1 a sus dianas genómicas. Dichos experimentos ayudarían a avanzar en la investigación de cómo REX1 regula sus dianas genómicas durante el desarrollo embrional.

TÉCNICAS Y EQUIPOS UTILIZADOS

Líneas celulares

En el presente trabajo se han utilizado los siguientes tipos celulares:

- Células ES con genotipo *Rex1* $-/-$ derivadas por Niwa et al.¹⁶. Se trata de células ES de ratón en las que ha sido eliminado *Rex1* mediante procesos de recombinación homóloga.
- Células ES sin modificación genética o silvestres (wt). Se trata de la línea E14T (*Rex1* $+/+$), una línea de células ES de ratón con una larga historia de cultivo en el laboratorio.
- Células ES-MAR. Una línea wt (*Rex1* $+/+$) de reciente derivación (Miguel Angel Ramírez, CSIC, Madrid; comunicación personal).

Los cultivos de células han sido realizados por el supervisor Jon Schoorlemmer.

Extracción de DNA genómico

Las líneas celulares ES *Rex1* $-/-$ y ES wt se encuentran cultivadas en monocapa (material aportado por el supervisor) en una cantidad total aproximada de 4 millones de células. Para la extracción se procede de la siguiente forma:

1. Las células son lavadas con 2ml de PBS, y se utiliza un raspador para recolectarlas del fondo de la placa. Las células se distribuyen en dos tubos *eppendorf*.
2. Se centrifuga a 2.000 revoluciones por minuto a 4°C durante 5 minutos. Se decanta el sobrenadante.
3. Se añade 1ml de solución FG2 (Tris-HCl 30mM pH 8.5, 40% (m/v) GuHCl, EDTA 30mM pH8) y 10µl de proteasa (Qiagen 7.5 AU Ref.19155)
4. Se incuban a 65°C ON.
5. Se añade 1ml de 2-propanol y se mezcla en vórtex.
6. Se centrifuga 5 minutos a 13.200rpm. Se decanta el sobrenadante.
7. Se lava el pellet de DNA con 1ml de Etanol al 70% y se mezcla en vórtex.
8. Se centrifuga 5 minutos a 13.200 rpm. Se decanta el sobrenadante.
9. El pellet es resuspendido en una cantidad variable de TE (1% (v/v) Tris-HCl 1M pH8, 0.2% (v/v) EDTA 0.5µM) en función del tamaño del pellet. Se especificará para cada caso.
10. Se incubaba a 55°C en agitación (1200rpm) hasta que el pellet quede resuspendido.

El DNA genómico proveniente de la línea celular ES-MAR ha sido aportado por el supervisor. Las propiedades del DNA son examinadas en el equipo Nanodrop 2000c®.

Tratamiento DNA genómico con bisulfito

En este trabajo se utiliza el Kit EZ DNA Methylation™ (Ref. D5001) de ZYMO RESEARCH CORP®, que se aplica de la siguiente forma:

1. Se parte de 500ng totales de DNA.
2. Se añade 5µl of *M-Dilution Buffer* a la muestra y se ajusta a un volume total de 50µl con agua MiliQ. Incubar durante 15 minutos a 37°C.
3. Se añade 100µl de *CT Conversion Reagent* y se deja a 50°C durante 12-16 horas en oscuridad.
4. Incubar a 0-4°C durante 10 minutos.
5. Se adicionan 400µl de *M-Binding Buffer* a una columna *Zymo-Spin™ IC* dentro de un tubo de recolección. A la columna se añade el volumen de la muestra obtenida tras el paso 4.
6. Centrifugar a 13.200rpm durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante.
7. Se añaden 100µl de *M-Wash Buffer* y se centrifuga a 13.200rpm durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante.
8. Adicionar 200µl de *M-Desulphonation Buffer* y se deja incubar a temperatura ambiente (20-30°C) durante 15-20 minutos. Posteriormente centrifugar a 13.200rpm durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante.
9. Añadir 200µl de *M-Wash Buffer* y centrifugar a 13.200rpm durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante y repetir el proceso de nuevo.
10. Colocar la columna en un tubo de laboratorio y añadir 20µl de TE. Centrifugar durante 30 segundos para eluir el DNA.

El DNA fue utilizado siempre antes de dos semanas desde su conversión.

Preparación y condiciones de PCR

Todos los ensayos han sido realizados sobre DNA tratado con bisulfito de células ES *Rex1* *-/-*, a no ser que se especifique lo contrario. El diseño de primers para cada diana genómica se ha llevado a cabo por el supervisor teniendo en cuenta la nueva secuencia convertida con bisulfito mediante el programa disponible en www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker. Las secuencias de primers se encuentran en el Anexo 1.

Las condiciones de PCR serán optimizadas dependiendo de cada locus (condiciones optimizadas disponibles en el Anexo 2. Como procedimiento general partimos de las siguientes condiciones:

	Concentración []	Volumen μ l
DNA		2
<i>Forward</i>	10 μ M	2
<i>Reverse</i>	10 μ M	2
Buffer*	10X	5
MgCl₂	50mM	1
dNTPs	5mM	2
Taq Polimerasa*	5U/ μ l	0,1
H₂Omq		34,9
		50

*Sigma Aldrich Ref. D1806

En el caso de ser necesaria la realización de una Nested PCR se utiliza 1 μ l de producto de PCR.

En la generación de productos de PCR directamente biotinilados para la pirosecuenciación, se sustituye uno de los primers por su versión unida a biotina.

El termociclador utilizado es Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Ref. 4375786) de Applied Biosystems™.

Si no se indica el contrario, las temperaturas, ciclos y tiempos estándar empleados son los siguientes:

100°C _____ 3´

94°C _____ 30´´ } 30 ciclos
 53°C _____ 30´´ }
 72°C _____ 30´´ }

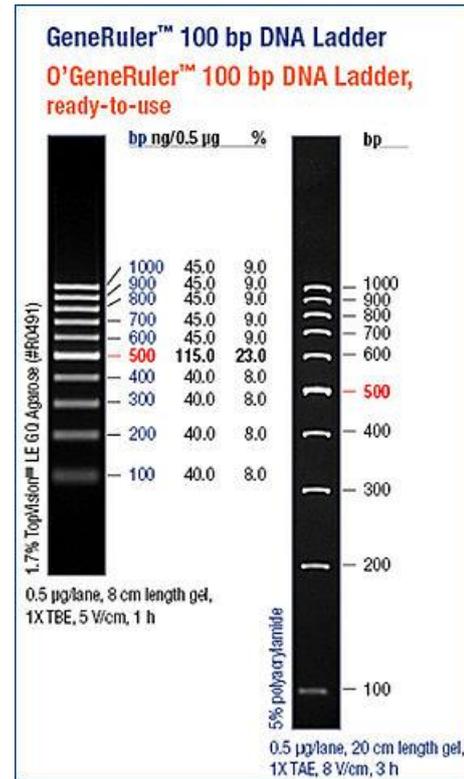
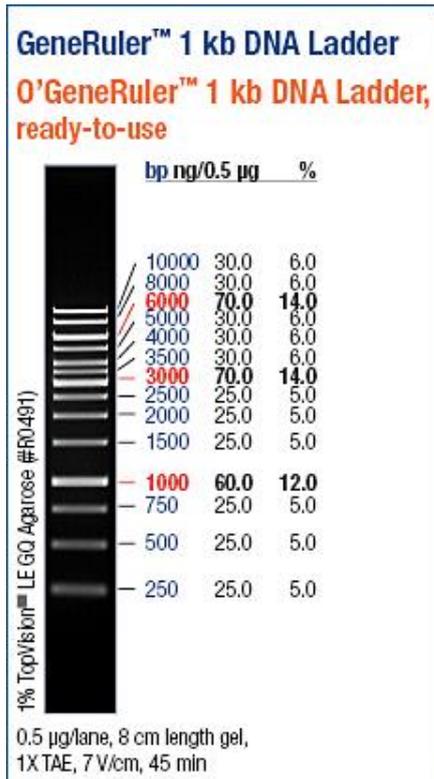
72°C _____ 10´

Como control positivo general se utiliza la amplificación de un inserto introducido en un plásmido. Es un ensayo previamente elaborado por el grupo y produce un fragmento de 90bp en todas las condiciones de PCR testadas.

Visualización Productos PCR

Se utilizan 5 μ l de producto de PCR para su separación en gel de Agarosa al 2% y se emplea el transiluminador ChemiDoc XRS (BIO RAD Laboratories, S.A.) para visualizar los productos. En cada figura, todas los carriles mostrados provienen del mismo gel.

Los marcadores de peso molecular utilizados son: GeneRuler 1kb DNA Ladder Ref. SM0313 y GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder Ref. SM0321 de ThermoFisher™.



M13 pirosecuenciación

Para el uso del primer M13 universal, las condiciones de PCR estándar son las siguientes:

	Concentración []	Volumen µl
DNA		2
Primer	10µM	1
Primer con M13	0,025µM	1
Primer M13-Biot	10µM	1
Buffer*	10X	5
MgCl ₂	50mM	1
dNTPs	5mM	2
Taq Polimerasa*	5U/µl	0,1
H ₂ Omq		36,9
		50

*Sigma Aldrich Ref. D1806

En el caso de ser necesaria la realización de una Nested PCR se utiliza como *template* 1µl de producto de PCR.

Si no se especifica lo contrario las temperaturas, número de ciclos y tiempos empleados estándar son los siguientes:

100°C _____ 3´

94°C _____ 30´´
53°C _____ 30´´
72°C _____ 30´´ } 30 ciclos

72°C _____ 10´

La pirosecuenciación es realizada por la unidad de secuenciación y genómica funcional del Centro de Investigación Biomédica de Aragón utilizando los siguientes materiales: Streptavidin Sepharose High Performance Ref. 17-5113-01 de HealthCare™, PyroMark®Gold Kit Q96 (Ref. 972804) de Qiagen™ y PyroMark® Q96 ID system (Ref. 9001525) de Qiagen™.

Se entrega para analizar de 10 a 40µl de producto, en un volumen final de 40 µl ajustado con TE. Asimismo se aportan 10µl (10µM) de primer de secuenciación.

Análisis estadístico

El análisis del patrón de metilación de los dinucleótidos CpG se realiza mediante el programa PyroQ-CpG 1.0.9. Los resultados son recogidos en formato Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización DNA genómico

El primer paso consistió en obtener DNA genómico de las líneas celulares seleccionadas. Para ello se realizaron extracciones de DNA y se tomaron medidas con el fin de analizar su calidad y cantidad a una longitud de onda de 230, 260 y 280nm. Los valores que se utilizan como referencia para la calidad del DNA son: cociente entre 260/280 próximo a 1,8 y cociente entre 260/230 próximo a 2. Los resultados de la Tabla 1 indican que las propiedades del DNA son correctas y las cantidades son suficientes para llevar a cabo los experimentos.

	ng/ μ L	260/280	260/230
ES <i>Rex1</i> -/-	60,30	1,88	2,15
ES wt	20,20	1,81	1,45
ES-MAR wt*	909,55	1,93	2,18

Tabla1. En la primera columna concentración de DNA expresada en ng/ μ L. En la segunda columna cociente entre la absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm. En la tercera columna cociente entre la absorbancia a 260 y 230 nm.

*DNA disponible en el laboratorio.

Ensayo para el locus *Nespas*

A pesar de que el locus *Nespas* está asociado a improntas¹⁰, no se ha descrito un amplicón apto para análisis mediante pirosecuenciación. Para implementar dicho análisis, se empezó con la amplificación de la región relevante que presenta DMRs. Se utilizaron dos parejas de primers distintos indicados como amplicón A y B en la figura 6 y se analizaron los productos en gel de agarosa.

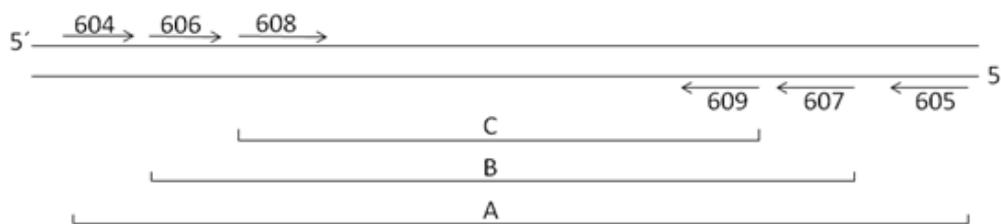


Fig6. Localización de primers en el locus *Nespas*. Los amplicones A, B y C generados por las parejas de primers representadas, producen fragmentos de los siguientes tamaños: (A) 604/605: 396bp; (B) 606/607:304bp y (C) 608/609: 227bp.

Los amplicones testados generaron productos a lo largo de todo el carril sin generar una banda específica (Fig. 7A). Para tratar de remediarlo, se realizó una *Nested* PCR, utilizando como molde el producto generado en la amplificación del amplicón A. La *Nested* PCR generó productos definidos de los amplicones B y C según el tamaño predicho de forma muy intensa. El producto generado en el control aparece a diferente altura de nuestro amplicón (Figura 7B), indicando una amplificación específica.

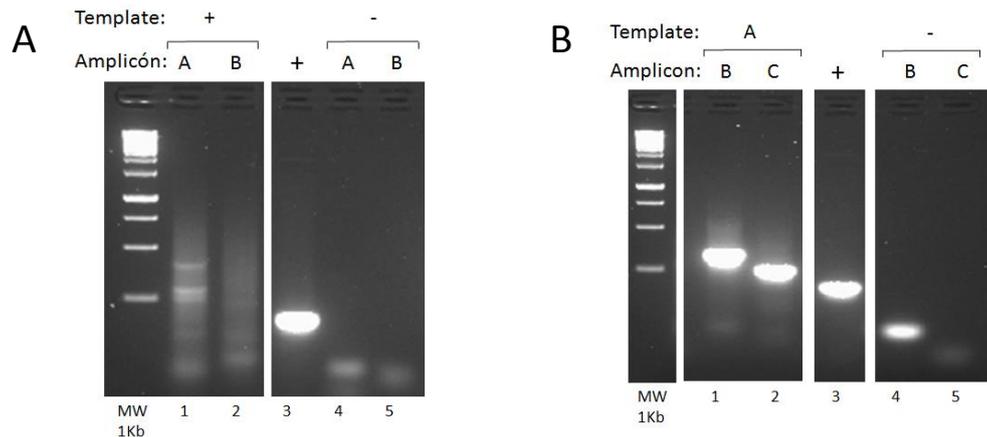


Fig7. (A) Amplificación de diferentes amplicones (Figura 6) del locus *Nespas* a partir de DNA genómico tratado con bisulfito, con condiciones indicadas en material y métodos, exceptuando el uso de 40 ciclos. (B) Productos de PCR generados usando el amplicon A generado en Fig. 7A (carril 1) como *template*. Condiciones estándar para *Nested* PCR. El + indica un control positivo general de la PCR. Reacciones control sin *template* son marcadas como *template* -.

Cada ciclo de PCR puede producir cambios de secuencia no deseados. Para determinar el mínimo número de ciclos e *input* necesarios para una eficaz amplificación, se intentó rebajar el número de ciclos en la primera PCR de 40 a 30 y disminuir la cantidad de producto utilizado como *template* en la *Nested* PCR. Como resultado (Fig.8) se apreció una correcta y eficaz amplificación en todas las condiciones testadas. Se decidió utilizar de ahora en adelante las condiciones que parten de la mínima cantidad de *template*: amplicón B del carril 1 (Fig.8). Dichas condiciones se encuentran disponibles en el ANEXO2.

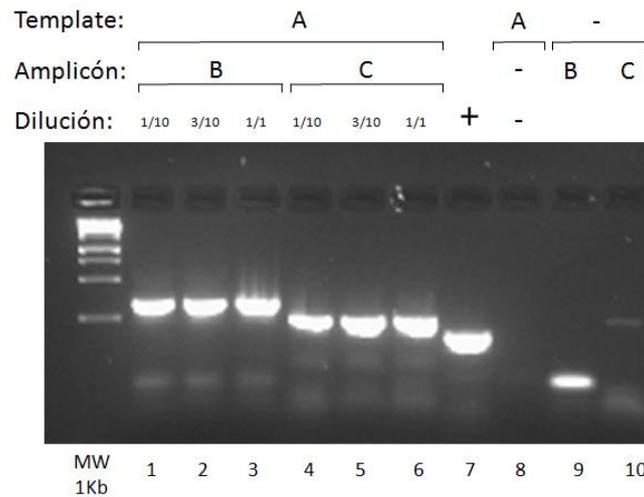


Fig8. Productos de PCR generados usando el amplicon A generado en Fig.7A (carril 1) como *template*, usando las diluciones indicadas. Los amplicones B y C están representados en la figura 6. El + indica un control positivo general de la PCR. Reacción control sin primers se indica con - en el amplicón y reacciones control sin *template* se indican con -.

El siguiente paso fue la generación del producto de PCR biotinilado. Se intentó implementar un ensayo que sirviera para cualquier amplicón, utilizando un primer universal de secuencia definida (M13). En la reacción de PCR (Fig.9A) se empleó el primer Forward (606), el primer reverse extendido con la secuencia universal (638) y un tercer primer con la secuencia universal biotinilado (M13-Biot). Para la optimización del proceso (Fig.5) fue necesario titular las concentraciones de primer extendido. El primer extendido únicamente es útil en el comienzo de la amplificación ya que su producto no se encuentra biotinilado. La concentración óptima será la mínima que permita la amplificación específica y eficaz: aquella que menor cantidad de primer extendido necesite.

Se testaron concentraciones de primer extendido en el rango de 3,3 a 0,025 μ M. Todas las concentraciones testadas generaron productos visibles del tamaño predicho de aparente abundancia (Fig.9C). Bajo la premisa explicada anteriormente se eligió el producto del carril 4 (Fig.9C) para su secuenciación cuantitativa.

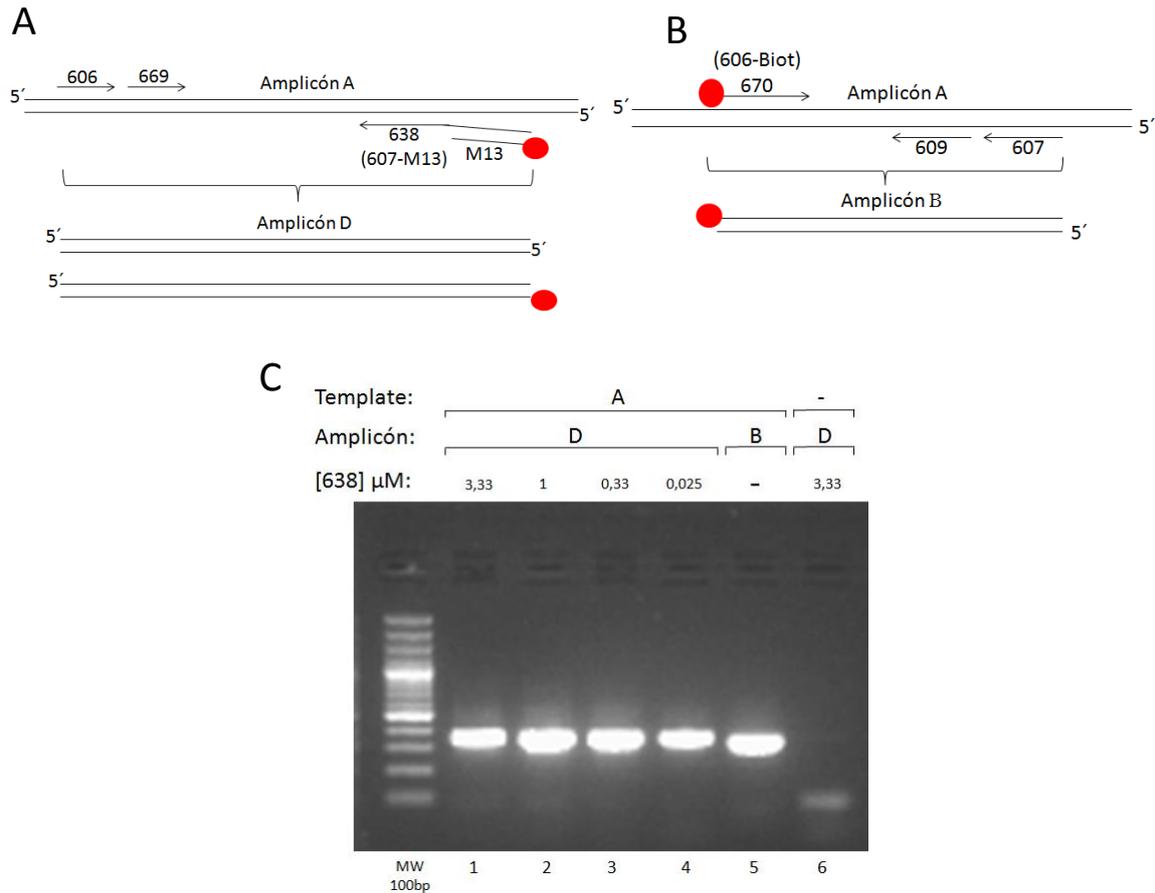


Fig9. Localización del amplicón A y primers en el locus Nespas. (A) Representación de los primers utilizados y los posibles amplicones D generados con o sin biotina (círculo rojo). (B) Representación de los primers utilizados y amplicón B biotinilado generado. (C) Productos de PCR generados usando como *template* el amplicon A (Fig.7A, carril 1), según condiciones disponibles en técnicas y equipos utilizados, con las diferentes concentraciones de primer 638 indicadas. Amplicón B no biotinilado como control (Fig.6). Reacción sin *template* se indican con -.

El proceso de pirosecuenciación produce la emisión de luz, cuya intensidad es reflejada en picos en un pirograma. Se incluyó un control del amplicón D sin primer (Anexo3, Fig.1B) para mostrar la ausencia de auto-apareamiento. Como resultado, se observó picos de casi nula intensidad indicando que no afecta a la secuenciación cuantitativa del amplicón. Los resultados de la secuenciación del amplicón D utilizando el primer 606 (Fig.9A), figuran en el Anexo3, Fig.1A. La secuencia generada se corresponde con la secuencia de referencia. En la secuenciación del amplicón D con el primer 606 el nivel de intensidad de los picos no superó un valor de 5 por nucleótido. Este valor no suele permitir la obtención de datos de metilación fiables y reproducibles (Dr. M. Strunk, comunicación personal).

Para mejorar la intensidad y la fiabilidad de la secuenciación, se decidió en primer lugar emplear un nuevo primer de secuenciación (669, Fig.9A) sobre el mismo amplicón D. La pirosecuenciación del amplicón D utilizando el nuevo primer generó una secuencia con picos de intensidad media en torno a 10 por nucleótido (Anexo3, Fig.2A). La secuencia generada se corresponde con la secuencia de referencia.

El software asociado al secuenciador interpreta la intensidad de picos, y calcula de cada dinucleótido CpG el porcentaje de citosina no convertida. De forma interna el programa adjudica un nivel de fiabilidad a la cuantificación: en azul se trata de valores fiables, en amarillo valores a valorar por el usuario y en rojo valores no fiables. Los criterios que el programa utiliza para otorgar fiabilidad a la cuantificación de porcentajes de C/T son varios: compara la altura de los picos con los adyacentes; la suma de los picos de los dos nucleótidos debe corresponder a como si fuese un único nucleótido y potenciales fallos en la secuencia del patrón de referencia. En este caso el nivel de fiabilidad detectado fue bueno para cuatro de los dinucleótidos CpG analizados y no fiable para uno de ellos. Este ensayo podría ser utilizado para medir el nivel de metilación en 4 posiciones CpG del locus *Nespas*.

Como alternativa, se intentó producir el mismo fragmento dejando de lado el primer universal. Para ello, se utilizó el primer 606 biotinilado (670 en Fig. 9B) para producir el amplicón directamente biotinilado. Los productos generados (datos no mostrados) fueron enviados para su secuenciación mediante los primers indicados en la figura 9B.

La pirosecuenciación del amplicón B utilizando el primer 607 obtuvo valores en los picos cercanos o superiores a 10 por nucleótido (Anexo3, Fig.2B). La secuencia generada se corresponde con la secuencia de referencia. El nivel de fiabilidad resultó bueno para tres de los dinucleótidos analizados y tras revisión, se aceptó también el valor en amarillo. Por otro lado la secuenciación con el primer 609 produjo picos con niveles de intensidad próximos a 10 por nucleótido (Anexo3, Fig.2C). La secuencia generada se corresponde con la secuencia de referencia. El nivel de fiabilidad fue bueno para tres de los dinucleótidos y tras su revisión se aceptó el valor en amarillo. El primer CpG no fue posible su análisis.

Con estos resultados se decidió establecer para el análisis cuantitativo de metilación en el locus *Nespas* las condiciones implementadas en los resultados de las Figuras 2B y 2C del anexo 3 por los siguientes motivos: (1) Mediante la utilización de dos primers de secuenciación se puede analizar un mayor número de dinucleótidos CpG. (2) El nivel de fiabilidad de los dinucleótidos CpG es mayor.

Diana genómica asociadas a los loci *Chd2*, *PisD* y *Ly6c1*

Este grupo ha encontrado evidencias de que las dianas genómicas de REX1 asociadas a los loci *Chd2*, *Ly6c1* y *PisD* muestran marcas genómicas asociadas a procesos de improntas (D. Guallar, P. Muniesa, J. Schoorlemmer et al., manuscrito en preparación). Este hecho hace que haya un interés en poner a punto ensayos que permitan analizar los patrones de metilación de dichas dianas.

Como en el caso del locus *Nesfap* diferentes condiciones de temperatura (53°C para *Chd2* y 57°C para *Ly6c1* y *PisD*), número de ciclos (40 para *Chd2* y *PisD* y 30 para *Ly6c1*) y parejas de primers (Fig. 10) fueron testadas.

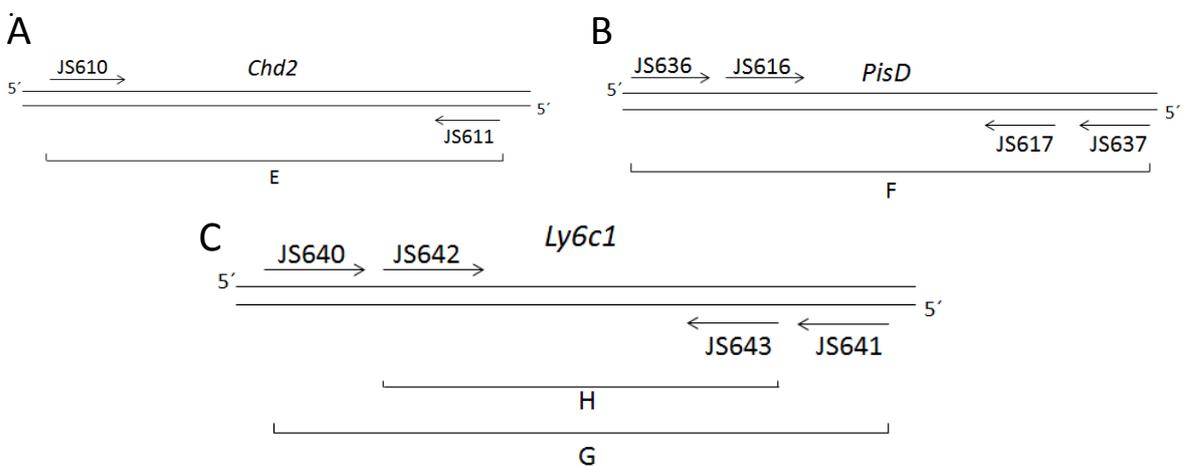


Fig10. Localización de primers. (A) Locus *Chd2*, el amplicón E generado por la pareja de primers 610/611 posee un tamaño de 356 bp. (B) Locus *PisD*, el amplicón F generado por las parejas de primers 636/637 produce un fragmento de 366 bp. (C) Locus *Ly6c1*, los amplicones G y H generados por las parejas de primers representadas, producen fragmentos de los siguientes tamaños: (G) 640/6641: 469 bp; (H) 642/643: 202 bp.

Para cada *locus*, la amplificación de las dianas genómicas generó productos visibles, específicos y del tamaño esperado (Fig.11). Las condiciones de los amplicones E, F y H (carril3) para *Chd2*, *PisD* y *Ly6c1*, respectivamente (Fig.11) fueron las escogidas para utilizar de ahora en adelante. Condiciones de amplificación disponibles en el ANEXO 2.

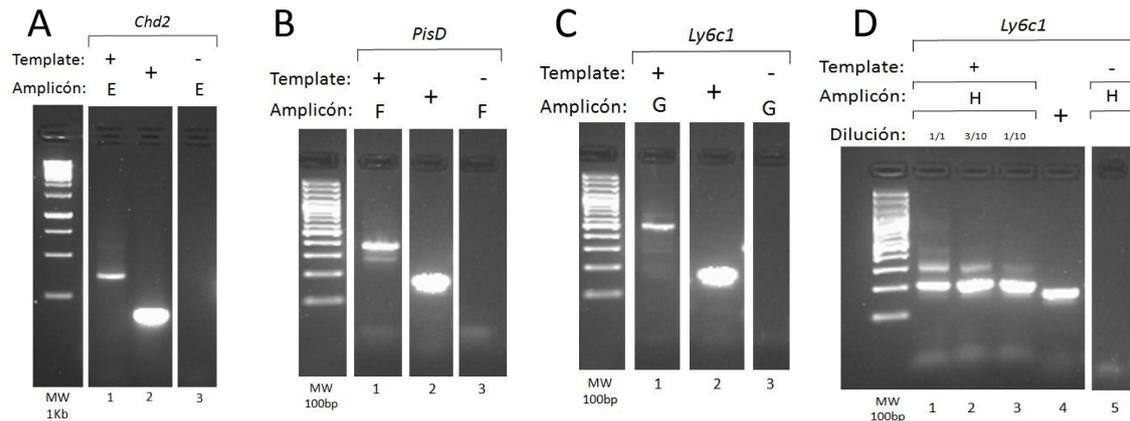


Fig11. (A) Productos de PCR generados en el locus *Chd2* con condiciones estándar y 40 ciclos. (B) Productos de PCR generados en el locus *PisD* con condiciones estándar, temperatura de *annealing* de 57°C y 40 ciclos. (C) Productos de PCR generados en el locus *Ly6c1* con condiciones estándar y temperatura de *annealing* de 57°C. (D) Productos de PCR generados usando diferentes cantidades de amplicón G generado en Fig. 11C (carril 1) como *template* con condiciones estándar y temperatura de *annealing* de 57°C. El + indica un control positivo general de la PCR. Reacciones control sin *template* son marcadas como *template* -.

Una vez establecidas las condiciones de amplificación se procedió a la generación de los productos de PCR para su secuenciación utilizando el primer universal M13 titulando la cantidad óptima necesaria de primer extendido para cada locus:

Para *Chd2* (Fig.12A) no se generó amplicón I visible bajo ninguna de las condiciones testadas.

En el caso de *PisD* se probó un primer que corresponde al primer 616 extendido con la secuencia universal (667) en combinación con dos primers reverse diferentes (Fig.12B). Se confirmó la amplificación eficaz y específica de los amplicones K y L en ausencia de primer M13-Biot. (Fig 12B, carriles 7 y 8). En presencia del primer M13-Biot fue posible generar producto con ambas parejas de primers en presencia de altas concentraciones (3,3µM) del primer con la extensión universal (amplicones K y J, Fig. 12B). Sin embargo, en las condiciones óptimas para la incorporación de biotina (0,025µM), no apareció producto específico visible (Figura 12B, carriles 3 y 6). Los resultados obtenidos no muestran para ninguno de los amplicones J y K fragmentos aptos para su secuenciación.

Para el locus *Ly6c1* (Fig. 12C) los productos obtenidos fueron visibles y específicos. Sin embargo, para una eficaz amplificación fue necesario el uso de altas concentraciones de primer no biotinilado (intensidad insuficiente en el carril 3 comparado con los carriles 1 y 2, Figura 12C). Dicha característica conlleva el riesgo de generar pocas copias biotiniladas. Por este motivo, se decidió que no era apto para su secuenciación.

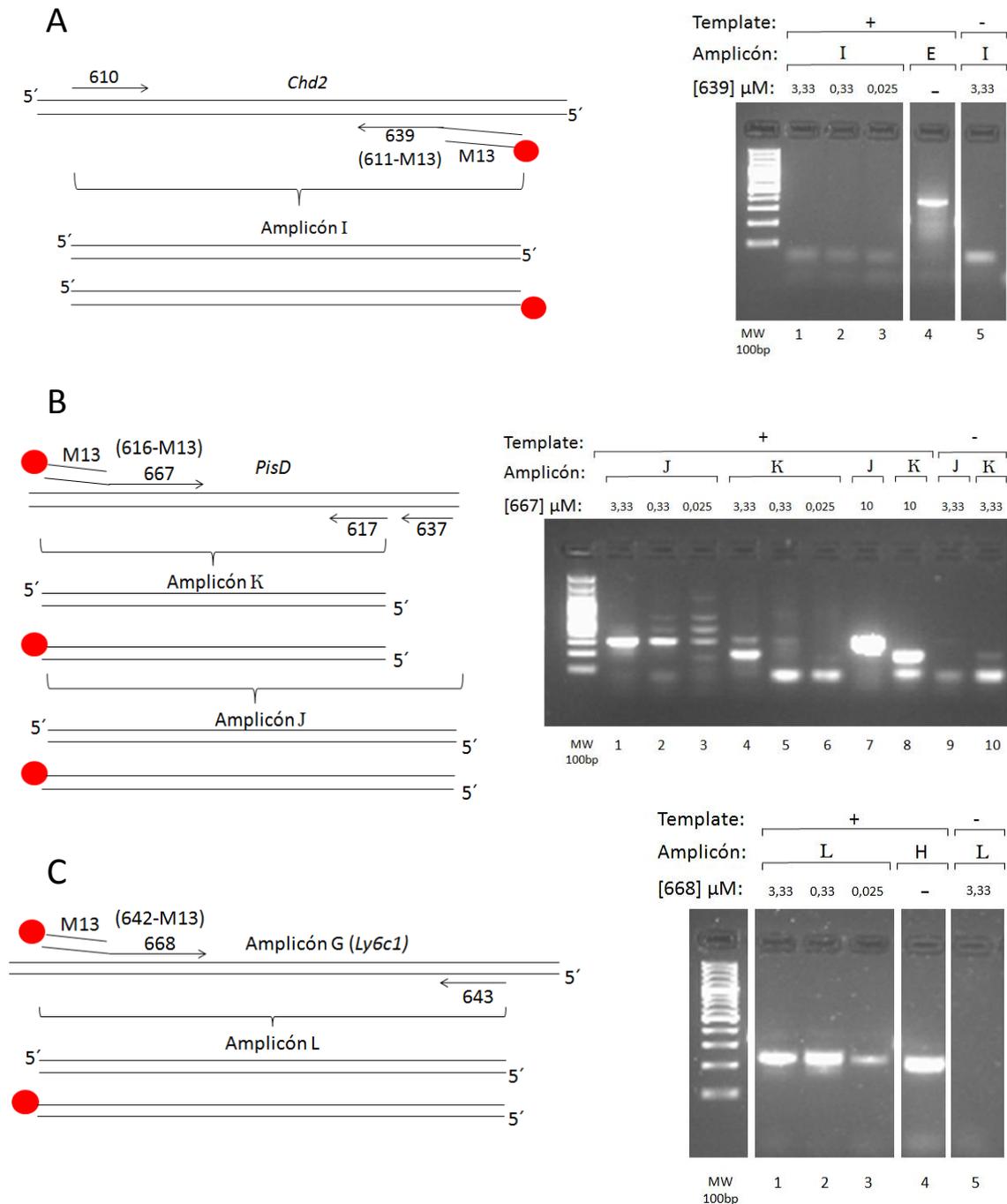


Fig12. Generación de productos de PCR biotinilados en DNA genómico tratado con bisulfito para los loci *Chd2* (A), *PisD* (B) y *Ly6c1* (C), según condiciones establecidas en ANEXO 2. Para cada locus se ha titulado la concentración de primer extendido con la secuencia universal (M13). El círculo rojo representa la biotina en el primer universal. (A) Representación de los primers utilizados en el locus *Chd2* y amplicón I. Amplicón E (Fig.10A) utilizado como control positivo. (B) Representación de los primers utilizados en el locus *PisD* y amplicones K y J. Carriles 7 y 8 sin primer M13-Biot. (C) Representación de los primers utilizados en el amplicón G (Fig.10C) del locus *ly6c1* y amplicón L. Amplicón H (Fig.10C) utilizado como control positivo. Reacciones control sin *template* son marcadas como -.

Como consecuencia de la amplificación poco eficaz obtenida con el primer universal, se recomienda un cambio en la estrategia usando primers biotinilados específicos de cada locus. Con las condiciones ya establecidas (Anexo2), permitirán la generación de productos de PCR biotinilados y su posterior pirosecuenciación.

Grado de metilación de *Nespas* en distintas líneas celulares

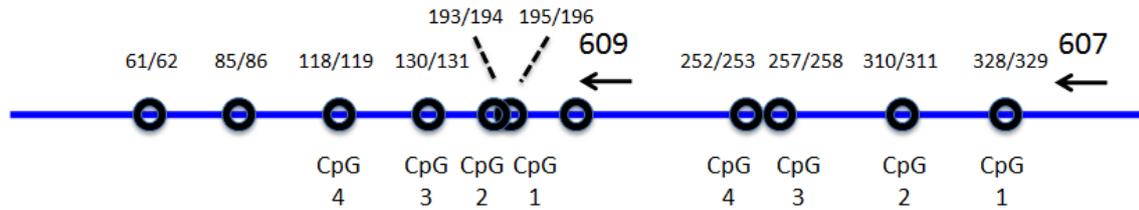
Una vez puesto a punto el ensayo para medir los niveles de metilación de *Nespas*, se decidió su aplicación a líneas ES *Rex1* -/-, ES wt y ES wt de reciente derivación. Se generaron fragmentos (Fig.9B) de cada línea celular a partir de DNA genómico tratado con bisulfito. Los datos de secuenciación primarios están reproducidos en la Tabla 2 obteniendo los siguientes resultados:

La pirosecuenciación de la línea ES wt con el primer 607 (Anexo 4, A) mostró picos con una intensidad cercana a un valor de 15 por nucleótido. Los dinucleótidos CpG analizados mostraron los siguientes niveles de metilación: 12%, 14%, 18% y 7% con unos niveles de fiabilidad buenos en el primero y último, uno a valorar y no fiable en el segundo. La secuenciación cuantitativa con el primer 609 (Anexo5, A) mostró picos con una intensidad media próxima a un valor de 15 por nucleótido. Los dinucleótidos CpG analizados presentaron los siguientes niveles de metilación: 16%, 14%, 16% y 9% con unos niveles de fiabilidad buenos para dos nucleótidos, uno a valorar y el último no fiable. La secuenciación no calculó porcentaje para el primer dinucleótido CpG a analizar.

La secuenciación cuantitativa de la línea ES wt de reciente derivación con el primer 607 (Anexo4, B) mostró picos con una intensidad media alrededor de 20 por nucleótido. El nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados fue: 11%, 14%, 20% y 9% con un nivel de fiabilidad bueno para la primera posición, dos a valorar y no fiable en la segunda. De la secuenciación con el primer 609 (Anexo5, B) se obtuvo picos con una intensidad media cercana a un valor de 20 por nucleótido. El nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados fue: 20%, 16%, 18% y 10% con unos niveles de fiabilidad buenos para dos nucleótidos, uno a valorar y el último no fiable.. No se pudo medir el nivel de metilación del primer dinucleótido CpG.

La pirosecuenciación de la línea ES *Rex1* -/- con el primer 607 (Anexo4, C) mostró picos con una intensidad media alrededor de 20 por nucleótido. El nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados fue : 5%, 6%, 12% y 5% con un nivel de fiabilidad bueno para la primera posición, dos para valorar y no fiable en la segunda. De la secuenciación cuantitativa con el primer 609 (Anexo5, C) se obtuvo picos con una intensidad media próxima a un valor de 15 por nucleótido. El nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados fue: 7%, 6%, 13% y 7% con unos

niveles de fiabilidad buenos para dos nucleótidos, uno a valorar y el último no fiable. No se pudo medir el nivel de metilación del primer dinucleótido CpG.



	Primer Sec.	1 ^{er} CpG %	2 ^o CpG %	3 ^{er} CpG %	4 ^o CpG %
ES wt	607	12,40	14,01	17,82	7,09
	609	15,61	13,52	16,11	9,13
ES-MAR wt	607	11,09	13,72	19,59	9,35
	609	19,50	16,33	18,00	10,02
ES <i>Rex1</i> -/-	607	4,83	6,17	12,36	4,79
	609	6,95	6,06	13,19	6,51

Tabla2. Datos de metilación de dinucleótidos CpG analizados de las líneas celulares ES wt, ES-MAR wt y ES *Rex1* -/- obtenidos en la secuenciación cuantitativa (Anexos 4 y 5). En la figura superior se puede observar la posición genómica de los CpG analizados. Las posiciones CpG son enumeradas según su cercanía al primer de secuenciación. El porcentaje indica la proporción de citosinas no convertidas que equivale al porcentaje de metilación existente del CpG. En azul valores fiables, en amarillo valores a revisar y en rojo valores poco fiables.

Los niveles de metilación en rojo (poco fiables según el software) fueron descartados (Tabla 2). Los valores en amarillo fueron revisados y se confirmó que podían ser utilizados. Así pues se utiliza para determinar los niveles de metilación de línea celular los resultados de la Tabla 3.

	Primer Sec.	1 ^{er} CpG %	2 ^o CpG %	3 ^{er} CpG %	4 ^o CpG %	Media %	Desviación Estándar	Media %	Desviación Estándar
ES wt	607	12,4	-	17,82	7,09	12,44	5,37	13,76	3,79
	609	15,61	13,52	16,11	-	15,08	1,37		
ES-MAR wt	607	11,09	-	19,59	9,35	13,34	5,48	15,64	4,40
	609	19,5	16,33	18	-	17,94	1,59		
ES <i>Rex1</i> -/-	607	4,83	-	12,36	4,79	7,327	4,36	8,03	3,77
	609	6,95	6,06	13,19	-	8,733	3,89		

Tabla3. Niveles de metilación confirmados de dinucleótidos CpG analizados (Tabla 2) de las líneas celulares ES wt, ES-MAR wt y ES *Rex1* -/-. Porcentajes obtenidos en la secuenciación cuantitativa (Anexos 4 y 5). Niveles medios de metilación por línea celular y desviación estándar.

Los resultados comparativos entre líneas celulares ES con un largo historial de pasajes y de reciente derivación mostraron una diferencia de 1,8 en el porcentaje de metilación de dinucleótidos CpG (Fig.13). Esta diferencia se atribuye a la pérdida de conservación del material genético a lo largo de tiempo, lo que provoca la reducción en el nivel de metilación.

La comparación en el nivel de metilación de dinucleótidos CpG entre células ES wt y deficientes para *Rex1* reflejó una diferencia cercana a un 6% (Fig.13). Esta diferencia indica la presencia de aproximadamente el doble de metilación de dinucleótidos CpG en el locus *Nespas* en presencia de REX1. Estos resultados sugieren un papel protector de metilación de REX1 en el locus *Nespas* en células madre embrionarias. Estudios previos publicados por Kim et al.¹⁰ mostraron niveles de hipermetilación para los loci *Nespas* y *Peg3* en blastocistos deficientes para *Rex1* sugiriendo un papel opuesto para REX1.

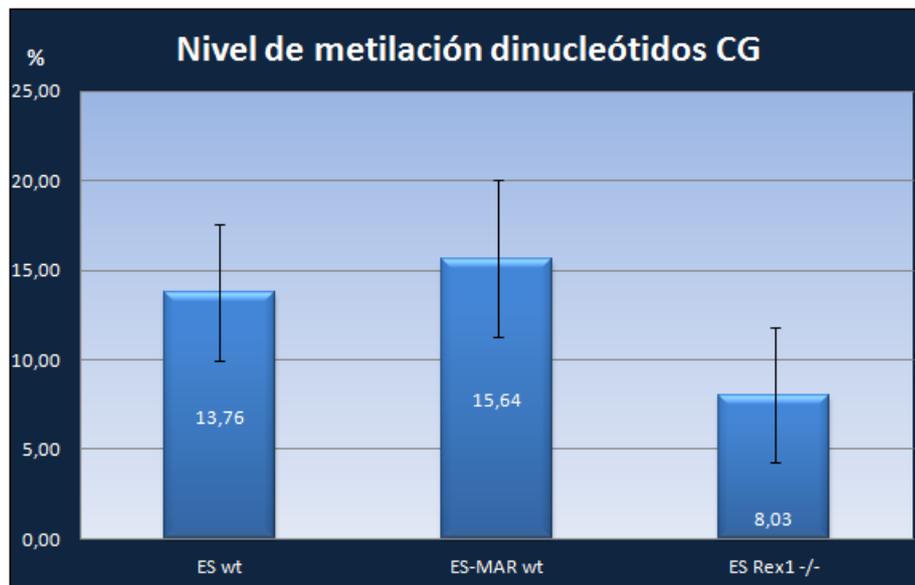


Fig13. Diagrama de barras. Media de los niveles de metilación del conjunto de dinucleótidos CpG en el DMR de *Nespas* para cada línea celular (Tabla 3). Desviación estándar indicada con barras.

Los resultados comparativos en el nivel de metilación entre líneas wt y deficientes para *Rex1* no poseen un significado real estadístico. Estos resultados se incluyen como parte de la puesta a punta del ensayo del locus *Nespas*. Es necesario realizar un mayor número de ensayos para la obtención de valores significativos

CONCLUSIONES

PRIMERA. Se ha conseguido la puesta a punto de ensayos que permiten medir de forma cuantitativa el nivel de metilación de dinucleótidos CpG en sitios genómicos asociados a los loci *Nespas*, *Chd2*, *PisD* y *Ly6c1*. En los últimos tres casos, el ensayo abarca zonas genómicas que coinciden con sitios de unión de REX1 descritos por el grupo.

SEGUNDA. La utilización del primer universal M13 para producir productos biotinilados en los loci *Chd2*, *PisD* y *Ly6c1* ha resultado negativa (Fig12). Es recomendable realizar la amplificación con uno de los primers directamente biotinilado.

TERCERA. Un primer ensayo revela mayor nivel de metilación del locus *Nespas* en presencia de REX1 en células madre embrionarias, sugiriendo un posible papel como protector contra la desmetilación.

CONCLUSIONS

FIRST ONE. Assays that allow quantitative measurements of the metilation level of dinucleotides CpG in genomic locations associated with *Nespas*, *Chd2*, *PisD* and *Ly6c1* loci have been optimized. In the latter 3 cases, the assay covers genomic locations that coincide with REX1 binding sites described for the group.

SECOND ONE. The use of the universal primer M13 to produce biotinilated products in the loci *Chd2*, *PisD* and *Ly6c1* has been proven inefficient. It is recommended to carry out the amplification using a biotinylated gene-specific primer

THIRD ONE. The results of a first assay reveal higher metilation levels for the locus *Nespas* in the presence of REX1 in Embrionic Stem cells. This suggests a potential role for REX1 as a protector against demethylation.

BIBLIOGRAFÍA

1. SMITH, Austin. The battlefield of pluripotency. *Cell*, 2005, vol. 123, no 5, p. 757-760.
2. HOSLER, Betsy A., et al. Expression of REX-1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Molecular and cellular biology*, 1989, vol. 9, no 12, p. 5623-5629.
3. DO KIM, Jeong; FAULK, Christopher; KIM, Joomyeong. Retroposition and evolution of the DNA-binding motifs of YY1, YY2 and REX1. *Nucleic acids research*, 2007, vol. 35, no 10, p. 3442-3452.
4. ROGERS, Melissa B.; HOSLER, Betsy A.; GUDAS, Lorraine J. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development*, 1991, vol. 113, no 3, p. 815-824.
5. JIANG, Yuehua, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, vol. 418, no 6893, p. 41-49.
6. KARLMARK, Karlin R., et al. Activation of ectopic Oct-4 and Rex-1 promoters in human amniotic fluid cells. *International journal of molecular medicine*, 2005, vol. 16, no 6, p. 987-992.
7. CLIMENT, María, et al. Functional analysis of Rex1 during preimplantation development. *Stem cells and development*, 2012, vol. 22, no 3, p. 459-472.
8. MASUI, Shinji, et al. Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. *BMC developmental biology*, 2008, vol. 8, no 1, p. 1.
9. GUALLAR, D., et al. Expression of endogenous retroviruses is negatively regulated by the pluripotency marker Rex1/Zfp42. *Nucleic acids research*, 2012, p. gks686.
10. DO KIM, Jeong, et al. Rex1/Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting. *Human molecular genetics*, 2011, p. ddr017.
11. GONTAN, Cristina, et al. RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation. *Nature*, 2012, vol. 485, no 7398, p. 386-390.
12. LIU, Jie; NEALON, Julie G.; WEINSTEIN, Lee S. Distinct patterns of abnormal GNAS imprinting in familial and sporadic pseudohypoparathyroidism type 1B. *Human molecular genetics*, 2005, vol. 14, no 1, p. 95-102.
13. REIK, Wolf. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 2007, vol. 447, no 7143, p. 425-432.
14. LI, En. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 2002, vol. 3, no 9, p. 662-673.
15. BARSKI, Artem; ZHAO, Keji. Genomic location analysis by ChIP-Seq. *Journal of cellular biochemistry*, 2009, vol. 107, no 1, p. 11-18.
16. LI, Yuanyuan; TOLLEFSBOL, Trygve O. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Epigenetics Protocols*, 2011, p. 11-21.
17. ROYO, Jose Luis; HIDALGO, Manuel; RUIZ, Agustin. Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping. *Nature protocols*, 2007, vol. 2, no 7, p. 1734-1739.