



Universidad
Zaragoza

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Regulación Epigenética del locus *Cd9* por REX1
Epigenetic Regulation of Cd9 locus by REX1

Autora: Susana Guevara Rodríguez

Directores: Jon Schoorlemmer y María Climent

Fecha: Septiembre 2017

Máster en Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

Universidad de Zaragoza

VISTO BUENO DEL DIRECTOR Y CO-DIRECTORA

El Doctor Jon Schoorlemmer y la co-directora María climent acreditan que la alumna Susana Guevara Rodríguez ha realizado el trabajo de fin de máster "Regulación epigénica del locus *Cd9* por REX1" y otorga el V.º B.º a su contenido para su presentación al Tribunal de Trabajo fin de Máster.

Fdo. Dr. Jon Schoorlemmer y Dra. María Climent



Máster en Biología Molecular y Celular, Zaragoza a 14 de septiembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Dr. Jon Schoorlemmer por su constante apoyo y supervisión durante todo el proyecto. Ha sido un auténtico placer tener la posibilidad de aprender de un investigador como él. A la Dra. María Climent por ofrecerme su ayuda.

A mis compañeros María Martínez, Silvia Calvo y Guillermo Martínez por estar siempre apoyándonos y aprendiendo de nuestros respectivos proyectos. En especial a la futura Dra. Sofía Macías que me enseñó todo lo que necesitaba saber en mis primeros días.

A mi pareja Daniel por apoyarme en los peores días y celebrar conmigo los mejores. Sin su ayuda la realización de este trabajo hubiera sido mucho más dura.

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.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

αRex1	Anticuerpo anti-REX1
cDNA	DNA complementario
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CHCl₃	Cloroformo
DTT	Agente redox DTT del inglés <i>Dithiothreitol</i>
dE	Día de embarazo
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
ERV	Retrovirus endógeno
ES	Células troncales embrionarias o células madre embrionarias
EtOH	Etanol
FGF4	<i>Fibroblast Growth Factor 4</i>
gDNA	DNA genómico
ICM	Masa celular interna del blastocisto
KCl	Cloruro de potasio
KoRex1	Células Knock-out de <i>Rex1</i>
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MQ	Agua Mili-Q, ultra pura
NaAc	Acetato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
O.N	Toda la noche del inglés <i>Over night</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR a tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Room Temperature (temperatura ambiente)
TE	Trofoectodermo
TE	Buffer TE (Tris y EDTA)
Tm	Temperatura de alineamiento de los primers. Del inglés <i>Melting temperature</i> .
TS	Células trofoblásticas
TST	Células trofoblásticas cultivadas en presencia de FGF4
TSD	Células trofoblásticas cultivadas en ausencia de FGF4
V	Volumen

ÍNDICE

Resumen / Abstract.....	4
1.Introducción	5-10
2. Objetivos del proyecto	11
3. Hipótesis.....	12
4.Materiales y métodos.....	13-25
4.1. Preparación de las muestras.....	13-16
4.1.1. Homogenización de placenta para la extracción de DNA.....	13
4.1.2. Homogenización de células para la extracción de DNA.....	13
4.1.3. Homogenización de placenta para la extracción de RNA.....	13-14
4.1.4. Extracción de gDNA.....	14
4.1.5. Extracción de RNA.....	14-16
4.1.6. Obtención de cDNA por retrotransposición del RNA	16
4.2. Muestras	16-17
4.3. Estudio del estado de metilación	18-22
4.3.1. Conversión con bisulfito	18-19
4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis	19-21
4.3.3. Pirosecuenciación	21-22
4.4. Estudio de expresión por PCR	23-24
4.5. Estudio de expresión por qPCR.....	24-25
5. Resultados y Discusión	26-51
5.1. Concentración y calidad de las muestras	26-27
5.2. Estudio de expresión por PCR.....	27-29
5.3. Estudio de expresión por qPCR.....	29-34
5.3.1. Expresión de <i>Rex1</i> y <i>Cd9</i> en tejidos y células wt.....	29-32
5.3.2. Expresión de <i>Rex1</i> y <i>Cd9</i> en distintos genotipos	32-34
5.4. Estudio del estado de metilación	35-50
5.4.1. Optimización de primers	35-41
5.4.1.1 Amplicón <i>Cd9U</i>	37-38

5.4.1.2 Amplicón <i>Cd9l</i>	38-40
5.4.1.3 Locus <i>Elf5</i>	40-41
5.4.2. Validación Pirosecuenciación.....	41-45
5.4.3. Porcentaje de metilación	45-50
5.4.3.1 Amplicón <i>Cd9M</i>	45-49
5.4.3.2 Amplicón <i>Cd9l</i>	49-50
5.5. Influencia de la metilación en los niveles de expresión	51
6. Conclusiones / Conclusions	52-53
7. Bibliografía.....	54-55

RESUMEN / ABSTRACT

El factor de transcripción REX1 controla la metilación en genes de impronta durante la embriogénesis temprana y participa en el silenciamiento de retrovirus endógenos (ERV). Se ha visto por ChiPseq que este factor tiene diana sobre el gen *Cd9*, que codifica para una proteína del mismo nombre que participa en múltiples actividades biológicas. Esta relación hace pensar en REX1 como regulador transcripcional de *Cd9* mediante mecanismos epigenéticos. En el presente trabajo se estudió si REX1 es capaz de modular la expresión del locus *Cd9*. Con este fin, se determinó el porcentaje de metilación de secuencias genómicas de *Cd9* cercano al pico de ChiPseq y los niveles de expresión de RNA del locus *Cd9* por qPCR. Para ello analizamos muestras de tejidos y células de ratón (ES, TS, placentas y embriones) wt y las comparamos con REX1^{-/-} y REX1^{+/-}. Los resultados indican que REX1 actúa como protector de la metilación del locus analizado y represor de la expresión de *Cd9*. Este efecto parece no tener relación entre sí pues no existe una correlación negativa entre el grado de metilación del locus en los tejidos analizados y los niveles de expresión de *Cd9*. Es posible que la región analizada no sea determinante para el control de la expresión o que estén actuando otros mecanismos reguladores de la transcripción.

The transcription factor REX1 controls the methylation levels of imprinted genes during early embryogenesis and participates in the silencing of endogenous retroviruses (ERVs). It has been found by ChiPseq that this factor targets the Cd9 gene which encodes a protein with the same name that participates in multiple biological activities. This relationship suggests that REX1 act as a transcriptional regulator of Cd9 by epigenetic mechanisms. In the present work, we studied whether REX1 is able to modulate the expression of CD9 locus. To this end, the percent methylation of Cd9 genomic sequences close to the ChiPseq peak and the levels of RNA expression of the Cd9 locus by qPCR were determined. We analyzed cells and tissue samples from mouse (ES, TS, placentas and embryos) wt and compared them with REX1 - / - and REX1 +/- . The results indicated that REX1 acts as a protector of methylation of the Cd9 locus and repressor of its expression. This effect seems to be unrelated because there is no negative correlation between the degree of methylation of the analysed locus in these tissues and the levels of Cd9 expression. It is possible that this region is not determinant for the control of its expression, or other regulatory mechanisms of transcription are acting.

1. INTRODUCCIÓN

Tras la fecundación, se produce la reprogramación epigenética para convertir al cigoto en una célula totipotente. El cigoto inicia el proceso de embriogénesis por el cuál acabará diferenciándose a todos los tipos celulares somáticos tanto fetales como extraembrionarios. Durante la pre-implantación, el cigoto experimenta sucesivas divisiones hasta convertirse en blastocisto (*Imagen 1*)[1].

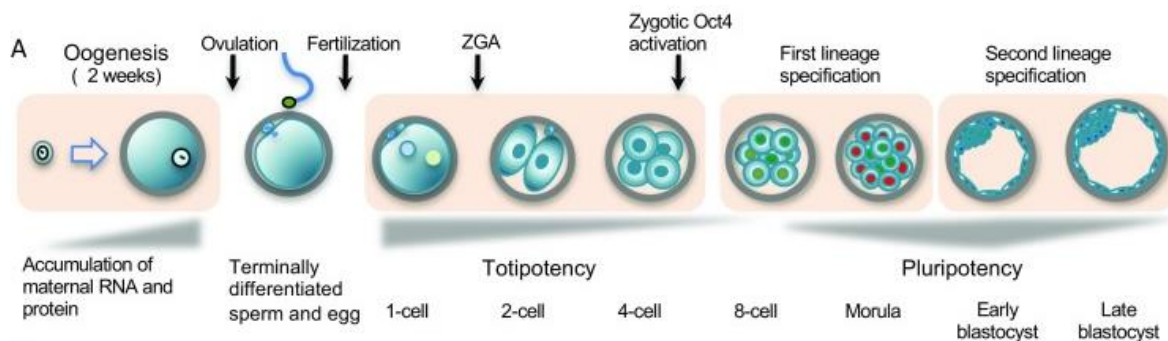


Imagen 1. Desarrollo pre-implantacional en ratón[1].

El blastocisto se compone de:

- Trofoectodermo que dará lugar a los tejidos extraembrionarios junto al endodermo.
- Masa celular interna (ICM) cuyas células son pluripotentes y pueden diferenciarse a todos los tipos celulares de un organismo adulto. Las células madre embrionarias (ESC) derivan de ella.
- Blastocela una cavidad interna rellena de líquido.

En el estadio de blastocisto tardío, la ICM se separa en epiblasto o ectodermo primitivo e hipoblasto o endodermo primitivo. El epiblasto dará lugar al embrión mientras que el endodermo, junto al trofoblasto, contribuyen a la formación de los tejidos extraembrionarios (membranas fetales, corion y placenta) (*Imagen 2*)[2].

Las células ES tienen capacidad de auto-renovación por lo que pueden mantenerse en cultivo de forma indefinida, además son pluripotentes por lo que diferenciándolas adecuadamente podrían formar los tres tejidos embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo). Las células madre trofoblásticas (TS) han sido derivadas a partir del trofoectodermo (TE) y también pueden mantenerse en cultivo

indefinidamente. A diferencia de las células ES son células multipotentes, y solo pueden diferenciarse a células de un mismo linaje, las de los tejidos extraembrionarios [2,3].

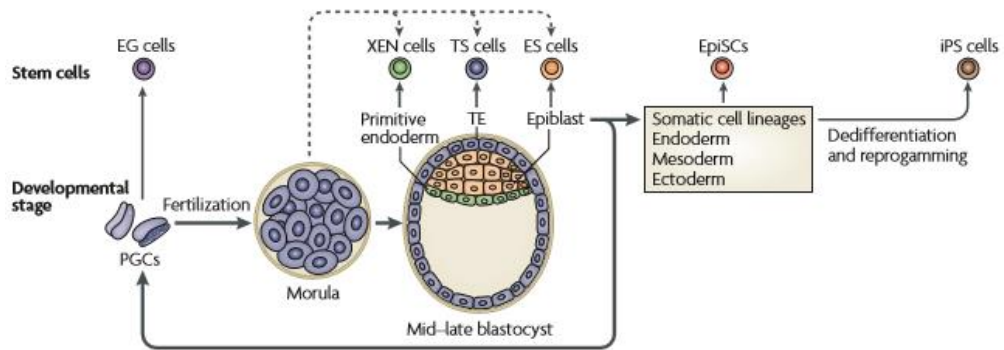


Imagen 2. Células madre y su tejido de origen.

La placenta comienza a desarrollarse en el momento de la implantación en el que el trofoblasto invade el endotelio materno promoviendo la vascularización hacia el embrión [3]. La placenta permite establecer una relación esencial entre el embrión y la madre para el intercambio de nutrientes, gases y la eliminación de productos de desecho del feto. Por tanto, aunque las células trofoblásticas están destinadas a formar parte del embrión son esenciales para el correcto desarrollo del mismo [3].

Para que las células ES y TS experimenten procesos de diferenciación a los diferentes tipos celulares del embrión o placenta, son necesarios factores de transcripción, factores de crecimiento, cambios fisiológicos y de matriz extracelular entre otros. Estos modulan su patrón epigenético necesario para la determinación de los linajes celulares. Por tanto, las modificaciones epigenéticas juegan un papel crucial en nuestra diferenciación [2].

Los mecanismos de regulación epigenéticos de la expresión génica no producen cambios en la secuencia de DNA sino cambios en la estructura de la cromatina, metilación y desmetilación del DNA y modificación de histonas. También se considera regulación epigenética la que llevan a cabo los RNA no codificantes [4].

Uno de los mecanismos de regulación epigenéticos más importantes es el de la metilación del DNA. Esta metilación se produce en las citosinas de los dinucleótidos CpG y la llevan a cabo las DNA-metiltransferasas. Se caracteriza por ser una

modificación muy estable y afecta a la expresión génica de formas diversas, aunque comúnmente está asociada a represión génica por la formación de heterocromatina, cabe decir que en la actualidad el papel de la heterocromatina está en constante debate. Ya en las primeras divisiones celulares del embrión se reducen progresivamente los niveles de metilación del DNA de forma pasiva y se produce la programación epigenética específica de linaje [2].

Un ejemplo clásico de efectos de la metilación sobre el de la expresión génica es el de los genes regulados por impronta (*Imagen 3*). Este tipo de genes presentan una metilación diferencial entre los alelos materno y paterno, uno de ellos se inactiva dando pie a la expresión del otro alelo por lo que funcionalmente se podrían considerar haploides. La metilación del DNA tiene lugar los dinucleótidos de las regiones controladoras de imprinting (ICRs), esta impronta se establece en la línea germinal y se propaga en las siguientes rondas de replicación del DNA que se dan a lo largo del desarrollo [5].

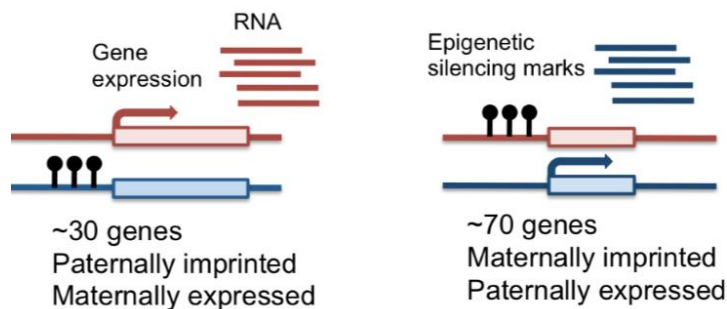


Imagen 3. Representación de genes de impronta paterna y materna.

Existen mecanismos moleculares y factores de transcripción como OCT4, SOX2 y NANOG que se encargan de mantener las células en su estado pluripotente reprimiendo la expresión de genes responsables de la diferenciación [4]. La expresión del gen *Rex1* (*Reduced expression 1*) se encuentra controlada por estos factores que mantienen la pluripotencia.

Rex1 codifica para una proteína llamada REX1 o ZFP42 (*Zinc finger protein 42*), un factor de transcripción de dedos de zinc con cuatro motivos Cys-His [6]. Es una proteína exclusiva de mamíferos placentarios y que ha sido altamente conservada en la evolución. Se expresa en las células germinales en las primeras etapas de la espermatogénesis (testículo), en células ES, TS, ICM y en placenta. No se ha detectado

su expresión en estadios más tardíos del desarrollo embrionario. Este gen proviene de la duplicación por retrotransposición del también factor transcripcional YY1 (Yin Yang 1), con el que comparte un elevado grado de homología. REX1 actualmente se utiliza como marcador de pluripotencia [7], aunque en células deficientes para REX1 no se ha encontrado diferenciación por lo que no parece un factor indispensable para mantenerla pero que debe tener una función importante para el mantenimiento de la misma. Entre las funciones demostradas de REX1 figuran: regulación de la inactivación del cromosoma X (otro mecanismo epigenético dependiente de metilación), silenciamiento de la expresión de ERV (Endogenous Retroviruses) en células ES y regulación de procesos regulados por improntas [3,8,9].

Entre los genes desregulados en células ES deficientes en *Rex1* se encuentran varios genes regulados por improntas: *Gtl2*, *Tsix*, *Xist*, *Igf2*, *Peg10* [10]. Experimentos realizados en embriones en etapa de blastocisto, provenientes del cruce de ratones WT y KO para *Rex1*, evidenciaron que la expresión de varios de genes con improntas se encuentra desregulada, especialmente en *Peg3*, *Igf2* y *Nespas* [8]. Análisis de metilación genómica en DNA de los mismos embriones evidenciaron que dos loci, *Peg3* y *Nespas* se encontraban hipermetilados en los embriones KO, comparado con embriones heterocigotos. El conjunto de datos sugiere que se necesita al menos de la mitad de la dotación de *Rex1* para evitar su hipermetilación [8].

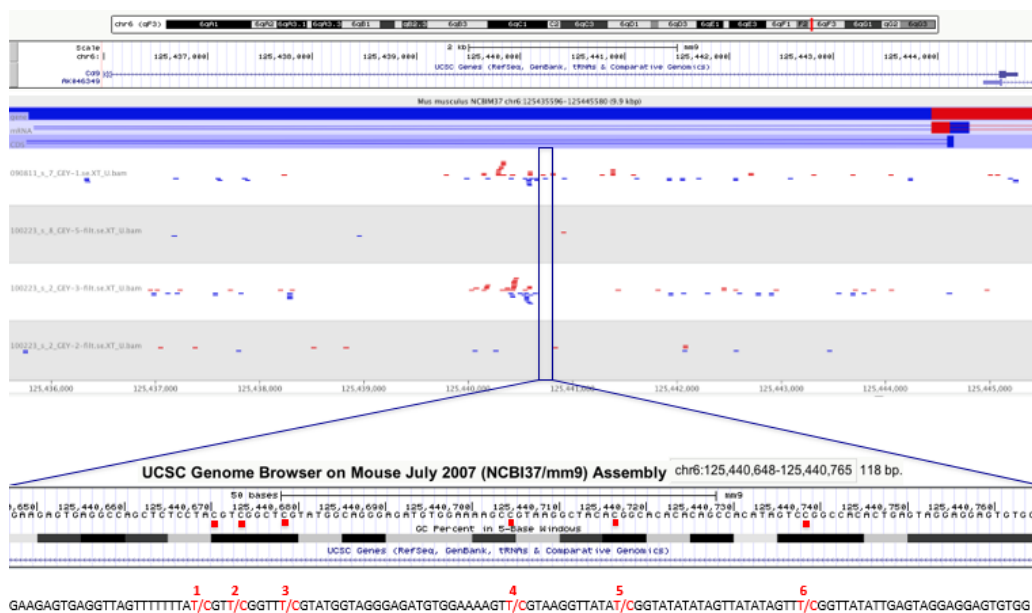


Imagen 4. Localización de uno de los picos de ChIP-seq en el que se muestra a *Cd9* como diana de REX1 (base de datos UCSC).

El laboratorio del Dr. Jon Schoorlemmer puso apunto un análisis de ChipSeq utilizando un anticuerpo policlonal contra la región N-terminal de REX1 (los anticuerpos disponibles en el mercado α *Rex1* no son lo suficientemente sensibles para detectarla endógenamente). Este análisis sobre E14T [D Guallar, J Schoorlemmer et al., datos no publicados], han identificado in sitio de unión de REX1 cerca del locus *Cd9* por lo que este gen sería una nueva diana de asociación (*Imagen 4*).

El gen *Cd9* se localiza en el cromosoma 6 de ratón codifica para transcritos: *Cd9001* que codifica la proteína funcional CD9 de 226 aminoácidos, *Cd9002* que codifica para un transcrito procesado y *Cd9003* para un intrón retenido (*Imagen 5*)[11].

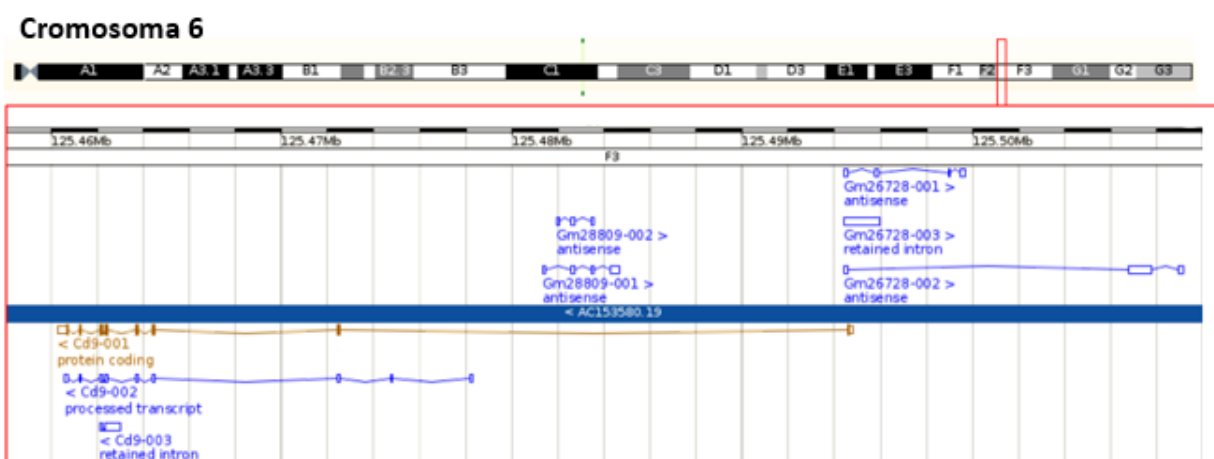


Imagen 5. Transcritos codificados por el gen *Cd9* (*Cd9001*, *002* y *003*) y transcritos codificados por el gen anexo *gm26728* (*Gm26728-001*, *002* y *003*).

En las proximidades del gen *Cd9* se localiza *Gm26728*, que codifica para 3 transcritos que son dos antisentido (*Gm26728-001* y *002*) y un intrón retenido (*Gm26728-003*) (*Imagen 6*). Estos RNA antisentido podrían afectar a la expresión de *Cd9* [11]. Sería interesante analizar la posible influencia de REX1 no sólo sobre *Cd9001* y *002*, sino también sobre *Gm26728-001* y *002*.

CD9 es una proteína transmembrana de la familia TM4SF, es un antígeno de superficie de linfocitos pre-B y participa en múltiples funciones biológicas como la activación y agregación plaquetaria, la adhesión y migración celular, o la metástasis tumoral [12]. También está implicado en la implantación y desarrollo embrionario; se encuentra altamente expresada en las células madre embrionarias tanto de humano como de ratón[13], su expresión está regulada por la vía LIF/STAT3, que es crítica en el

mantenimiento del estado pluripotente y la supervivencia de este tipo de celular [14]. Por su implicación en metástasis y embriogénesis se estudió la implicación de esta proteína en el comportamiento invasivo del embrión [15].

La asociación entre *Rex1* y *Cd9* llevó a pensar en la influencia de este factor sobre la expresión de esta proteína, y si tendría un control epigenético el locus *Cd9*. Su estudio permitiría conocer mejor el desarrollo embrionario temprano y las células troncales embrionarias.

En un trabajo anterior del grupo [16] se analizó la metilación de del locus *Cd9*, al que denominaremos *Cd9M*, en la una región cercana al pico de ChipSeq (*Imagen X*). Se concluyó que la metilación se altera en función de la presencia o ausencia de REX1. Sin embargo, los datos se fundamentan sobre pocas muestras, además de que solo se estudió una región del locus *Cd9*. Para reforzar esta idea se deberían analizar más muestras y regiones además de comparar los resultados obtenidos con regiones sin asociación de REX1.

2. HIPÓTESIS

Ha sido demostrado, que REX1 protege varios genes de la hipermetilación en blastocisto [8]. Ensayos de CHIPseq del grupo, han identificado un sitio de unión de REX1 en el promotor del locus *Cd9/Gm26728* [D Guallar, J Schoorlemmer et al., datos no publicados]. Datos obtenidos en estudios previos del grupo [16] han indicado que en células ES de ratón, la presencia de REX1 es necesaria para mantener el nivel de metilación genómico en las secuencias colindantes al sitio de unión. A pesar de ello no parecía existir una relación entre el grado de metilación y los niveles de expresión de *Cd9* en células ES. Aparte de en células ES y blastocisto, REX1 se expresa en placenta.

Las Hipótesis por testar en este proyecto son:

- I. Si realmente REX1 es capaz de proteger de la desmetilación al locus *Cd9* en células ES y este hecho afecta a la expresión de *Cd9*.
- II. Si REX1 afecta a la expresión de CD9 en placenta.
- III. Si alteraciones en la metilación que ocurren en ES podrían afectar a la posterior expresión génica en la placenta.

3. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

- I. Valorar la expresión de forma cualitativa de los diferentes transcritos de los loci *Cd9* (*Cd9-001* y *Cd9-002*) y *Gm26728* (*Gm26728-001* y *Gm26728-002*) en placenta.
- II. Poner apunto los ensayos de metilación pertinentes para analizar (A) nuevas regiones colindantes al pico de ChiPseq y (B) un locus con el que REX1 no tendría asociación.
- III. Determinar el grado de metilación de las regiones genómicas de interés. Analizar la metilación de diferentes tejidos y células para comparar entre sí placenta, embrión, células madre trofoblásticas (TS) y células madre embrionarias (ES).
- IV. Determinar y comparar el grado de metilación en tejidos y células wt y deficientes en REX1.
- V. Analizar por qPCR la expresión de *Cd9* en tejidos y células wt y deficientes en REX1.
- VI. Comprobar la relación entre el grado de metilación del locus *Cd9* y la expresión del mismo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

4.1.1 HOMOGENIZACIÓN DE PLACENTA PARA EXTRACCIÓN DE DNA

Para la correcta extracción de gDNA de las muestras de placenta es necesaria su homogenización. Para ello se introdujo el tejido en un tubo Eppendorf, con unas tijeras de cirujía se cortó el tejido para ayudar a su posterior disgregación. Se añadieron esferas de zirconia de BioSpect Products (Cat. No. 11079110zx ,1.0mm diámetro), y 1 ml de FG2 buffer lysis (30mM Tris-HCl) pH8,5. Posteriormente se introdujo el tubo bien cerrado en la máquina Mini-beadbeater-96 TM Biospec y se mantuvo en agitación durante 4 minutos. Al finalizar, se añadió 10µl de proteasa 1mU/µl (QUIAGEN) y se incubó toda la noche a 65°C. Al día siguiente se recogió el sobrenadante y se centrifugó 2 minutos a 12000 rpm (RT) para descartar el material no homogenizado que se encontraba en el *pellet*. Seguidamente se realizó la extracción de gDNA.

4.1.2 HOMOGENIZACIÓN DE CÉLULAS PARA EXTRACCIÓN DE DNA

Para extraer DNA a partir de células cultivadas en monocapa (aproximadamente 4 millones de células), se retiró el medio de cultivo y se añadió 0,5 ml de FGF2, después se levantó el cultivo con un raspador y se recogió la muestra en un tubo. Se añadió, en el mismo, 500 µg/ml de proteinasa K y se incubó a 55°C O.N. Una vez la muestra estaba preparada ya se puede iniciar la extracción de DNA igual que ocurría con las células de placenta tras su homogenización.

4.1.3 HOMOGENIZACIÓN DE PLACENTA PARA EXTRACCIÓN DE RNA

También se debe realizar homogenización de la placenta previamente a la extracción de RNA. Sigue un procedimiento similar al de la extracción de DNA pero con algunas variaciones. En vez de añadir FG2 al tubo con las esferas, se añadió 1ml de TRIzol® (Invitrogen). Tras la agitación o disgregación en la máquina Mini-beadbeater-96 TM Biospec durante 4 minutos se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Para recuperar el máximo material posible repitiendo la operación, por tanto, se añadió

otro mililitro de TRIzol® al tubo con las esferas, se volvió a agitar durante 4 minutos y se recuperó el sobrenadante. Seguidamente se realizó la extracción de RNA sal combinado de los dos sobrenadantes, aunque se puede guardar el volumen recogido a -80°C si la extracción no se realiza al instante.

4.1.3 EXTRACCIÓN DE gDNA

Para la extracción de gDNA se añadió a la muestra 1V de 2- propanol y se mezcló con la ayuda de un vórtex. El DNA formó un precipitado visible, seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm RT, se aspiró el sobrenadante y se lavó el *pellet* añadiendo 1V de etanol al 70% y se mezcló en vórtex. Se volvió a centrifugar 5 minutos a 13000 rpm RT, se aspiró el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* durante aproximadamente 1 minuto. Se resuspendió el DNA en 100 µl de TE y se incubó a 55°C durante 4 horas en un baño para facilitar su resuspensión. Durante ese período se agitaron las muestras periódicamente. Si no se consigue una total resuspensión centrifugar 2 minutos a 13000 rpm y recuperar el sobrenadante. Por último se determinó su concentración con un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific) y se mantuvieron las muestras a 4°C hasta su uso.

4.1.4 EXTRACCIÓN DE RNA

Para extraer RNA a partir de células en cultivo primeramente se determinó la concentración celular de una placa paralela o de células levantadas utilizando la cámara de Neubauer. Este es instrumento se utiliza para el recuento celular en medio líquido, se trata de portaobjetos con una cuadrícula sobre la cual se aplica la muestra. Se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con PBS frío, por último, se añadió TRIzol® y se levantó el cultivo con un raspador. Para homogenizar bien la muestra se pasó varias veces por una aguja de 25 gauges. Una vez se encontraban las células bien disgregadas en TRIzol®, se procedió a la extracción de RNA igual que ocurría con las placentas homogenizadas.

El protocolo expuesto a continuación para aislar RNA ha sido puesto a punto por M. Sánchez y J. Schoorlemmer [16], este se basa en la extracción con cloroformo y precipitación con isopropanol.

Se añadió 1:5V de CHCl_3 a la muestra homogenizada, normalmente se utilizan 500 μl de la misma, se mezcló bien y se dejó 2-3 minutos a RT. Seguidamente se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase superior a un nuevo tubo con cuidado de no aspirar interfase ya que en ella se encuentra el gDNA. Sobre este volumen, se añadió 0.6V de isopropanol y 1.5 μl de glucógeno, se mezcló bien y se dejó reposar 10 minutos a RT. El glucógeno es un co-precipitante que facilita la visualización de la precipitación del RNA desencadenada por el isopropanol.

Se centrifugó a 12.000rpm durante 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 μl de EtOH al 75%. Se dejó secar el pellet al aire y se resuspendió en 75 μl de agua MQ tratada con DEPC, un inhibidor irreversible de ribonucleasa. Tras resuspenderlo se dejó reposar durante 5 minutos a RT, se vorteoó y se volvió a esperar 5 minutos.

Hasta aquí la extracción de RNA, pero para eliminar el posible gDNA que haya permanecido en la muestra se utilizó el Kit de la casa comercial Invitrogen RT-PCR por el que se le añadió 24,8 μl de este mix a cada una de las muestras: 10 μl DTT (0,1M), 10 μl MgCl_2 (50mM), 3,3 μl NaAc (3M), 0,5 μl RNase IN, y 1 μl RQ1RNase free DNase. Se incubó la mezcla en un termobloque a 37°C durante 15 minutos y 800rpm para que actúen las enzimas.

Se añadió fenol (100 μl), se mezcló bien y se centrifugó a 12.000rpm durante 7 minutos a 4°C. Seguidamente se traspasó la fase superior a un nuevo eppendorf, se añadió 1V de CHCl_3 , se agitó en vórtex y a continuación se centrifugó a 12.000rpm durante 2 minutos a 4°C. La fase acuosa superior se reservó en un nuevo tubo mientras que sobre la fase acuosa inferior se repitió este paso utilizando 90 μl de agua tratada con DEPC en vez de fenol. Esto se realizó con la finalidad de extraer todo el RNA posible de la muestra original.

Se midió el volumen total de las fases recogidas y añadir 0,1V de NaAc (3M), 1,5µl de glucógeno y 3V de EtOH al 100%. Se mezcló bien y se dejó reposar durante 10 minutos a RT, después, se centrifugó a 12.000rpm durante 16 minutos a 4°C y se lavó el pellet con 500µl de EtOH al 75%. Tras centrifugar el mismo a 12.000rpm durante 8 minutos a 4°C se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Este fue resuspendido en 50µl de agua tratada con DEPC. Para acabar, se determinó su concentración mediante un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific) y se guardaron las muestras a -80°C hasta su uso.

4.1.5 OBTENCIÓN DE cDNA POR RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA

Para la obtención del cDNA se siguió el protocolo del kit *PrimeScript RT reagent* de la casa comercial Takara. Se partió de una concentración de 500 ng/µl de RNA, en algunas ocasiones se debe diluir la muestra si esta se encuentra muy concentrada o si esta se encuentra muy diluida volver a precipitar el RNA y resuspender en un volumen menor de agua tratada con DEPC. Se preparó un mix que contenía para cada muestra 1µl *Primer oligo random (Random 6 mers)*, 0,5µl *Enzyme RT Prime Script* y 2µl *buffer (x5 primeScript Buffer)*, este se mezcló con la cantidad de muestra necesaria y se añadió agua tratada con DEPC hasta un volumen total de 10µl. Para que tuviera lugar la transcripción reversa se incubó el homogenizado 15 minutos a 37°C en un termociclador Veriti™ y posteriormente se inactivó la enzima aplicando durante 5 segundos un calor de 85°C. Una vez acabada la retrotranscripción se puede conservar la muestra a 4°C si se va a utilizar inmediatamente o almacenar a -80°C para usos futuros. Para verificar que la retrotranscripción se ha producido correctamente se realizó PCR y electroforesis del producto amplificado.

4.2 MUESTRAS

El material empleado para el estudio del estado de metilación fue gDNA de diversos tejidos y líneas celulares cultivadas por el Dr. Jon Schoorlemmer. Se trata de dos preparaciones independientes de una línea de células madre o ES (E14T); células ES deficientes en REX1 (*Rex1 -/-*) cedidas generosamente por el Dr. H. Niwa[17], células

ES MAR de reciente derivación (cedidas generosamente por M.A Ramírez, CSIC, Madrid), placentas de 14,5 días de embarazo(dE) y 18,5 dE, células TS (línea TSB7) [18] y tejido embrionario (18,5 dE) (Tabla 1).

Para el estudio de expresión de los diferentes transcritos de *Cd9* por PCR se utilizó tanto cDNA de placenta de 11,5 dE como de placenta obtenida en 18,5 dE(Tabla 1).

Por último, para analizar la expresión de RNA de forma cuantitativa (qPCR) se utilizó cDNA de diversos orígenes: una muestra de E14T, dos de Placenta (11,5 dE y 18,5 dE), TST (Células TS cultivadas en presencia de FGF4), TSD (Células TS cultivadas sin FGF4), dos de embrión(11,5 dE y 18,5 dE) (Tabla 1).

Las muestras con deficiencia (parcial o no) en *Rex1*, fueron cedidas por el Dr. J Kim [19], que generó ratones deficientes en REX1. Una hembra embarazada de un cruce entre REX1+/+ y REX1-/- fue sacrificada a los 18,5 dE. Se preparó DNA de placentas y embriones y se genotiparon como *Rex1 -/-*, *Rex1+/+*, *Rex1+/-*. RNA purificado de estas muestras fue preparado por el grupo del Dr. J Kim et al. [19], y puesto a nuestra disposición para los análisis posteriores. Se trata de 5 preparaciones de RNA procedentes de embriones y placentas de hembras de la misma camada. Estas muestras también fueron analizadas por qPCR (Tabla 1).

MUESTRAS UTILIZADAS					
Expresión RNA por PCR		Estado de metilación (gDNA)		Expresión RNA por qPCR (cDNA)	
cDNA Placenta	11,5 dE	ES	E14T 23/2/16	E14T	
	18,5 dE		E14T 4/4/17	Placenta	11,5 dE
	MAR		18,5 dE		
		Placenta	14,5 dE	TSD	
			18,5 dE	TST	
		Embrión	18,5 dE	Placentas y Embriones de ratones hembra	REX1- 1 -/-
		TS			REX1- 2 +/+
		REX1 -/-			REX1- 4 -/-
					REX1- 5 -/+
					REX1 -6 -/+
				Embrión	11,5 dE
					18,5 dE

Tabla 1. Resumen de las muestras utilizadas para la consecución de los diferentes ensayos. En concreto para determinar la expresión del RNA de forma cualitativa (por PCR seguida de electroforesis), cuantitativa (por qPCR) y el estado de metilación de diferentes loci. Con fondo azul muestras propiedad del grupo del Dr. Jon Schoorlemmer, con fondo verde cDNA obtenido por el grupo del Dr. Jon Schoorlemmer a partir de RNA cedido por Dr. J Kim et al. [19], en naranja muestra original propiedad de M.A Ramírez, CSIC, extracción del gDNA realizada por el grupo del Dr. Jon Schoorlemmer.

4.3 ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACIÓN

Para conocer el estado de metilación de los dinucleótidos CpG es necesario someter el gDNA al tratamiento de conversión con bisulfito de sodio mediante el cual las citosinas que no se encuentran metiladas se convierten en uracilo (*Imagen 7*). Una vez realizado el tratamiento se amplifica la región a analizar mediante PCR y por último se realiza pirosecuenciación para comprobar si se han producido cambios o no en la secuencia indicando de este modo el porcentaje de metilación de la muestra para cada isla.

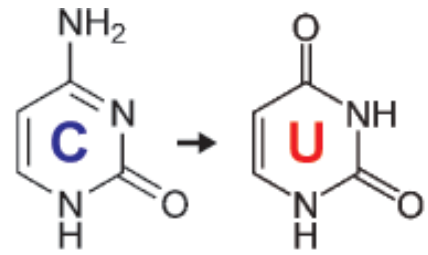


Imagen 7. Efecto de la conversión con bisulfito en las bases del DNA. Las citosinas que no se encuentran metiladas se convierten en uracilo por la acción del bisulfito de sodio. Imagen propiedad de Zymo Research.

4.3.1 CONVERSIÓN CON BISULFITO

Para la conversión se utilizó el protocolo derivado del EZ DNA Methylation Kit de la casa comercial Zymo Research. Este Kit está diseñado para reducir la degradación de la muestra y la pérdida de material durante el tratamiento. El kit se basa en 3 pasos principalmente: desnaturalización del DNA, conversión del mismo y desulfonación (*imagen 8*).

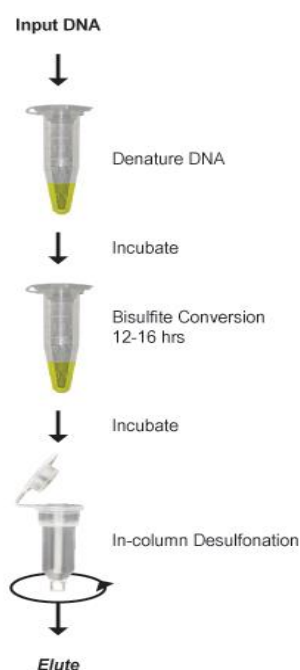


Imagen 8. Esquema de los tres pasos principales de la conversión con bisulfito con EZ DNA Methylation Kit de Takara. Tras añadir la muestra se realiza la desnaturalización, seguida de la conversión con bisulfito y la desulfonación para lograr un eluido que contiene gDNA convertido. Imagen propiedad de Zymo Research.

A continuación, se detalla el protocolo que se siguió: se partió de una concentración de 500 ng/ μ l de gDNA y se añadió 5 μ l de M-dilution buffer (agente que desnaturaliza el DNA) y agua MQ hasta un volumen de 50 μ l totales. Este tubo y 100 μ l de *CT conversion reagent* se incubaron a 37°C durante 15 minutos, una vez el DNA se ha

desnaturalizado se mezclaron. Se mantuvo durante 16h en oscuridad y a 50°C para que se produjera la conversión. Una vez acabado se dejaron las muestras 10 minutos a 4°C también en oscuridad. Los pasos siguientes se llevaron a cabo para producir la desulfonación de la muestra. Se cargó la muestra tratada mezclada con 400µl de *M-binding buffer* en una columna *zymo spin IC* sostenida por un tubo de recolección. Se centrifugó 30'' a 13.200rpm (todas las centrifugaciones se realizaron bajo las mismas condiciones) y se descartó el volumen eluido. Se realizó un lavado de la columna utilizando *M-wash buffer*, con centrifugación posterior. Se añadió *M-desulphonation buffer* (200µl) y se mantuvo a RT durante 18 minutos (esto provoca la desaminación de citosinas, convirtiéndolas en uracilos). Se centrifugó y se hicieron dos lavados más a la columna con *M-wash buffer* y sus respectivas centrifugaciones. Por último, se colocó la columna en un tubo de recolección limpio y se añadió 20µl de TE (en vez de 10µl de *Elution Buffer*). Se centrifugó y se guardó el volumen eluido, que contiene el gDNA convertido, a -20°C hasta su uso (siempre antes de dos semanas tras su conversión).

4.3.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y ELECTROFORESIS

Para determinar el estado de metilación por pirosecuenciación, se amplifica el locus de interés (*Imagen 17*) mediante PCR sobre el gDNA convertido con bisulfito. Los *primers* fueron diseñados por el supervisor Dr. Jon Schoorlemmer mediante el programa disponible en www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker, teniendo en cuenta la nueva secuencia convertida con bisulfito. Las secuencias de *primers* se encuentran en la *Tabla 2*. Fueron producidos y comercializados por Sigma Aldrich.

Locus	Secuencia primers (5'→3')		Amplificación (pb)
<i>Cd9M</i>	Fw	TAAAATGGAGGTAGTGGTTTTGTTTT	144
	Rv	CCCACTCCTCCTACTCAATATAACC	
	Rv -biotina	BIO-CCCACTCCTCCTACTCAATATAACC	
<i>Cd9U</i>	Fw	GGGAGAAATTAAGTTTTAGGTA	A: 337
	Rv	AAAAAAAAAATACACCTACTCCTA	
	Fw-biotina	BIO- GGGAGAAATTAAGTTTTAGGTA	

<i>Cd9l</i>	Fw -2	TTTTTTAGGTAGTTTAGAGAGAG	B: 415 C: 264
	Fw -1	TTTGATTATTTGGGAAATGTAGA	
	Rv	CCCCCRAATATAAAAAAAAAA	
	Rv -biotina	BIO- CCCCCRAATATAAAAAAAAAA	
<i>Elf5</i>	Fw	TTTGGTTGTTTGAGATTGAGAGAG	D:330
	Rv	CAATACTTTCACCTTTCCAC	
	Fw -biotina	BIO-TTTGGTTGTTTGAGATTGAGAGAG	

Tabla 2. Primers utilizados en el ensayo de metilación. En la primera columna tenemos el locus a amplificar, en la segunda el diseño de los *primers* forward (fw), reverse(rv) y del primer con biotina, en la tercera tamaño del producto de amplificación en pb.

La pareja de *primers* sin biotina se ha utilizado para optimizar las condiciones óptimas de amplificación. Para generar *template* para la pirosecuenciación se sustituye uno de los *primers* con el equivalente con biotina. El *primer* sin biotina se utiliza en la pirosecuenciación.

El ensayo para la amplificación del locus *Cd9* fue puesto a punto por María Martínez [16], con las siguientes condiciones óptimas de amplificación: 60°C de Tm, 40 ciclos de amplificación y sin adición extra de Mg²⁺.

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa se preparó un Mix para cada locus a amplificar y por cada muestra (Tabla 3).

	Concentración []	Volumen µl
Buffer	10X	5
dNTPs	5µM	2
Forward	10µM	2
Reverse	10µM	2
MgCl ₂	50mM	1
MQ	---	34,9
Taq DNA Polimerasa	5U/µl	0,1
gDNA convertido hervido 3'	---	2
		Vf: 50

Tabla 3. Mix utilizado en la PCR para el ensayo de metilación. En la primera columna se encuentran los componentes del mix, en la segunda concentración su concentración y en la tercera el volumen utilizado por cada muestra para testar la amplificación de un locus. El volumen final de la reacción es de 50µl.

Tanto el Buffer como la enzima Taq DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* proceden del kit de la casa comercial Sigma Aldrich. Si la reacción funciona mejor sin magnesio añadido sustituir el microlitro de magnesio por uno más de agua MQ. Las muestras de gDNA convertido se hirvieron durante 3 minutos a 100°C antes de añadirlas al mix

para facilitar su desnaturalización. En caso de eficacia en una PCR, se ha realizado una “Nested PCR”, utilizando como template 1µl de producto de PCR inicial.

Como control positivo se usó el mix de amplificación del locus *Cd9* con cualesquiera de las muestras de gDNA convertido [16].

Tras mezclar bien el mix se amplificó en un termociclador Veriti™ con el siguiente programa: 40 ciclos con 3 etapas de 30 segundos de duración (94°C para separar las hebras de DNA, Tª de Tm del locus a amplificar en la que el primer se une a la cadena a amplificar y 72°C para elongarla), y 10 minutos a 72°C (*Imagen 9*).

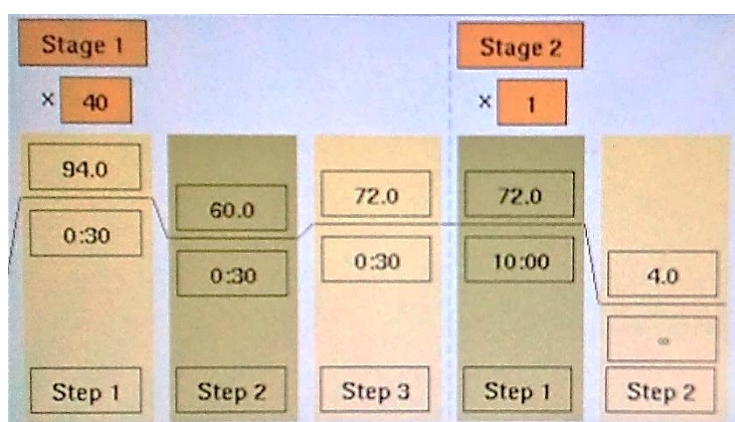


Imagen 9. Programa de amplificación para el locus *Cd9* por PCR en termociclador Veriti™. El primer paso está formado por 40 ciclos de 3 etapas (94°C, 60°C y 72°C) de 30 segundos cada una. El segundo paso son 10 min a 72°C y se mantienen las muestras a 4°C hasta su recogida.

Una vez amplificados, 9µl de los productos de PCR fueron separados por electroforesis junto a 3µl de tampón de carga en un gel de agarosa al 2% (1g de agarosa, 50ml de TAE). En la preparación del gel se le añade 2,5 µl GelRed™ (4x) con la finalidad de que se intercale en el DNA luz visible roja al ser excitado con luz ultravioleta (254nm). Como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler 100bp Plus DNA ladder de Thermo Scientific. Para visualizar el resultado de la electroforesis se utilizó un transiluminador BioRad ChemiDoc XRS+. El producto de PCR biotilado que no se utilizó en la electroforesis se guardó a 4°C a la espera de realizar su pirosecuenciación.

4.3.3 PIROSECUENCIACIÓN

A través de la pirosecuenciación se puede conocer si las citosinas de secuencia original de DNA se encontraban metiladas o no. Aquellas que estaban metiladas no habrán sufrido ningún cambio durante la conversión con bisulfito de sodio y son detectadas

como citosinas durante la secuenciación, mientras que las citosinas no metiladas son convertidas a uracilo y detectadas como timinas (*Imagen 10*).

Tras la amplificación por PCR (en la que uno de los dos *primers* contenía cola de biotina) y la electroforesis en gel de agarosa, se decidió el factor de dilución en TE del producto de PCR según la intensidad de las bandas. El volumen final fue de 40µl por muestra y se entregó junto a 10µl(10µM) de primer de secuenciación, sin biotina, a la unidad de secuenciación y genómica funcional del Centro de Investigación Biomédica de Aragón; ellos fueron los encargados de llevar a cabo la pirosecuenciación.

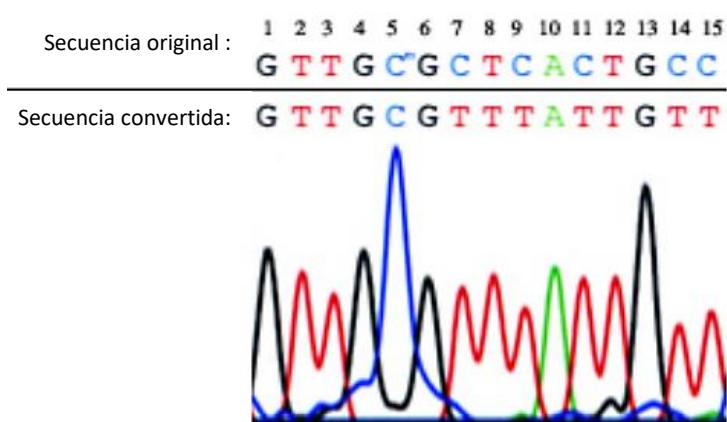


Imagen 10. Resultado de la secuenciación de una hebra de DNA convertido con bisulfito de sodio. La citosina de la posición 5 se encontraba metilada en la secuencia original, a diferencia de las citosinas de la posición 7,9,11,14 y 15 no fue convertida a uracilo tras la conversión. Tras la amplificación y secuenciación, **la citosina que se encontraba es** detectada como citosina mientras que las no metiladas como timinas. Imagen propiedad de Zymo Research.

Utilizaron perlas *Streptavidin Sepharose High Performance* de HealthCare™ para separar las monohebras con biotina. Para la pirosecuenciación utilizaron PyroMark®Gold Kit Q96 de Qiagen™ y PyroMark® Q96 ID system de Qiagen™. Este tipo de secuenciación se basa en la luminiscencia, detecta la liberación de pirofosfato al incorporarse los nucleótidos. La intensidad o altura de los picos de señal obtenidos es proporcional al número de nucleótidos incorporados. El análisis del patrón de metilación se realizó con el programa PyroQ-CpG 1.0.9.

Se analizó el patrón de metilación de todos los tipos celulares y tejidos como mínimo por triplicado para obtener mayor robustez en los resultados.

4.4 ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR PCR

Para valorar de forma cualitativa los niveles de expresión de los diferentes transcritos del locus *Cd9* en placentas de ratón de 11,5 dE de gestación y de 18,5 dE, realizamos también amplificación por PCR y electroforesis.

Los *primers* utilizados y las condiciones óptimas para la amplificación de los cuatro transcritos y del locus control, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*GapdH*), se encuentran recogidas en esta *Tabla 4*.

Transcrito	Secuencia <i>primers</i> (5'→3')		Amplicón (pb)	Condiciones qPCR	
				Tm	Mg ²⁺
<i>Cd9 - 001</i>	Fw	TACCATGCCGGTCAAAGGAGG	120	Tm	60°C
	Rv	GAGTCGAATCGGAGCCATAGTC		Mg ²⁺	No
<i>Cd9 - 002</i>	Fw	TTCGCCCACATCTCATCCAGG	105	Tm	60°C
	Rv	GGTCCTATGTGTGGGCGTCA		Mg ²⁺	No
<i>Gm26728-001</i>	Fw	CCGACAGTCGCCTCTCACT	107	Tm	60°C
	Rv	CTGCAGGGGTGAGGAAGAGAAA		Mg ²⁺	No
<i>Gm26728-002</i>	Fw	CCGACAGTCGCCTCTCACT	116	Tm	60°C
	Rv	CACCCACTGCCAACAGAGC		Mg ²⁺	No
<i>GapdH</i>	Fw	CATACCAGGAAATGAGCTTG	175	Tm	60°C
	Rv	ATGACATCAAGAAGGTGGTG		Mg ²⁺	Si

Tabla 4. Primers utilizados para el análisis de expresión cualitativo (PCR). En la primera columna tenemos el transcrito del locus *Cd9* a amplificar, en la segunda la secuencia de los *primers* forward (fw) y reverse (rv), en la tercera el tamaño del producto de amplificación en pb, en la última columna las condiciones óptimas de amplificación en cuanto a Tm y adición o no de Mg²⁺ extra.

Se ha utilizado *GapdH* como locus normalizador de expresión para poder comparar y determinar de forma cualitativa los niveles de expresión de los diferentes transcritos. Las condiciones óptimas para la amplificación de los *primers* fueron determinadas anteriormente [16] para analizar la expresión de los transcritos en células E14T.

Se utilizó el mismo mix de PCR que en el caso del ensayo de metilación. Las muestras eran cDNA en vez de gDNA, estas no se hirvieron 3 minutos antes de incluirlas en el mix. El programa de amplificación en el termociclador también fue diferente: primeramente 2 minutos a 98°C, seguidamente 34 ciclos en tres etapas de un minuto

cada una (94°C, T^a de T_m del locus a amplificar, 72°C), por último 5 minutos a 72°C (Imagen 11).

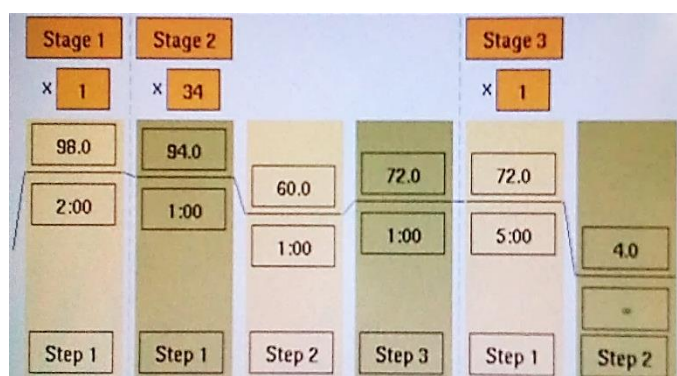


Imagen 11. Programa de amplificación por PCR de todos los transcritos de *Cd9* y *GapdH* en termociclador Veriti™. El primer paso es 2 minutos a 98°C, seguido por un segundo paso formado por 35 ciclos de 3 etapas (94°C, 60°C y 72°C) de 1 minuto cada una. El último paso son 5 min a 72°C y se mantienen las muestras a 4°C hasta su recogida.

La electroforesis y visualización de los productos resultantes de la PCR se realizó de la misma forma que para el ensayo de metilación.

4.5 ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR qPCR

Para determinar la expresión de los loci *Rex1*, *Cd9* y *GapdH*, se utilizó PCR cuantitativa (qPCR) o a también llamada a tiempo real. Esta técnica se basa en la amplificación por PCR que incluye la utilización de un agente intercalante de DNA, SyBr Green, que emite fluorescencia al ser irradiado por una fuente de luz. El aparato va registrando de forma continua la fluorescencia emitida en cada ciclo de amplificación.

Primers utilizados para el análisis de expresión cuantitativo (qPCR)					
Locus	Secuencia primers (5'→3')		Amplicón (pb)	Condiciones qPCR	
<i>Cd9-001</i>	Fw	TACCATGCCGGTCAAAGGAGG	120	T _m	60°C
	Rv	GAGTCGAATCGGAGCCATAGTC		Mg ²⁺	No
<i>GapdH</i>	Fw	CATACCAGGAAATGAGCTTG	175	T _m	60°C
	Rv	ATGACATCAAGAAGGTGGTG		Mg ²⁺	Si
<i>Rex1</i>	Fw	AAGCCGTATCAGTGCACGTTCAAGGCT	250	T _m	60°C
	Rv	ATGCGTGTATCCCCAGTGCCTCTGTCAT		Mg ²⁺	Si

Tabla 5. Primers utilizados para el análisis de expresión cuantitativo (qPCR). En la primera columna tenemos locus a amplificar, en la segunda el diseño de los primers forward (fw) y reverse (rv), en la tercera el tamaño del producto de amplificación en pb, en la última columna las condiciones óptimas de amplificación en cuanto a T_m y adición o no de Mg²⁺ extra.

Para cuantificar el nivel de expresión se establece un umbral de fluorescencia llamado ciclo umbral o Ct, por el que se determina el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanza este umbral.

Los *primers* utilizados y sus condiciones óptimas de amplificación se encuentran recogidos en la [Tabla 5](#).

La optimización de estos *primers* para qPCR se llevo a cabo en ensayos anteriores a la realización de este proyecto.

Para la realización de la qPCR se utilizó el kit SYBR® Premix Ex Taq™ II de la casa comercial TaKaRa, con él se prepararon los 14µl de mix necesarios para cada pocillo formado por: 7.5µl de SYBR Premix Ex Taq II (2X), 0.3µl de ROX Reference Dye (50X), 5,3µl Agua MQ tratada con DEPC, 0.3µl Primer Forward (10µM), 0.3µl Primer Reverse (10µM) y 0,3µl de agua MQ tratada con DEPC o MgCl₂ (50Mm) según las condiciones optimizadas para cada pareja de *primers*. A este mix se le añadió 1µl de cDNA diluido 1:30 de las diferentes muestras.

Cada locus fue analizado por triplicado para cada muestra para obtener un valor representativo. Se utilizó una placa de 96 pocillos y una vez estuvo cargada se introdujo en el termociclador ViiA™ 7 y se utilizó el programa ViiA7 Software v1.2 de Applied Biosystems para determinar las condiciones de amplificación. Los resultados fueron procesados en Excel utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ [20] utilizando como gen de referencia *GapdH*. De esa forma, es posible comparar los niveles de expresión sin la necesidad de conocer su valor absoluto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para analizar la metilación y expresión del locus *Cd9* en función de la presencia de REX1 se prepararon gDNA y RNA de diversos tejidos de ratón (*Tabla 1*). Se analizó su calidad y cantidad en Nanodrop. Este dato es necesario para calcular el volumen de muestra del que se partirá en los ensayos de este estudio (500ng/μl). Para ello se iluminó la muestra con longitudes de onda de 230, 260 y 280nm. El programa Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific) nos proporciona la concentración de la muestra expresada en ng/μl, y los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 a partir de los cuales se puede valorar su calidad. Los resultados de los análisis están recopilados en la (*Tabla 6*).

A.

gDNA	ng/μL	260/280	260/230
Placenta 14,5 dE	923,14	1,82	1,95
Placenta 18,5 dE	827,0	1,87	1,98
ES-MAR	1070,0	1,91	2,02
E14T 4/4/17	98,3	1,85	2,05
E14T 23/2/16	21,65	1,78	1,99
TS	419,4	1,82	2,03
Embrión 18,5 dE	1147,4	1,83	1,96
REX1 -/-	2200,4	1,86	1,99

B.

RNA	ng/μL	260/280	260/230
Placenta 11,5 dE	474,6	1,98	2,07
Placenta 18,5 dE	2051,5	1,97	2,24
Embrión 11,5 dE	664,9	2,05	2,22
Embrión 18,5 dE	3912,2	2,14	2,09
E14T	1132,7	2,07	2,23
TST	398,4	2,03	1,97
TST-D	304,9	1,93	2,12
Placenta REX1 - 1 -/- 18,5 dE	859,6	1,96	2,04
Placenta REX1 - 2 +/- 18,5 dE	1635,4	1,98	2,14
Placenta REX1- 4 -/- 18,5 dE	1341,0	2,02	2,03
Placenta REX1 - 5 +/- 18,5 dE	1409,0	2,08	1,97
Placenta REX1 - 6 +/- 18,5 dE	1964,2	1,99	2,17
Embrión REX1 - 1 -/- 18,5 dE	2953,5	1,95	1,89
Embrión REX1 - 2 +/- 18,5 dE	3506,7	1,99	2,14
Embrión REX1- 4 -/- 18,5 dE	1901,9	2,14	2,17
Embrión REX1 - 5 +/- 18,5 dE	4861,6	2,17	1,92
Embrión REX1 - 6 +/- 18,5 dE	705,3	1,36	0,46

Tabla 6. Propiedades gDNA (A) y RNA (B). 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.

Para considerar que las muestras de gDNA son de buena calidad el ratio 260/280 debe encontrarse entre 1,8-2, si este valor es inferior a 1,6 puede indicar contaminación por compuestos aromáticos y proteínas, si este valor se encuentra por encima de 2,1 podría evidenciar la presencia de RNA. El ratio 260/230 debe encontrarse entre 1,5-2,2, por debajo de 1,5 indicaría presencia de contaminantes. Todas las muestras de gDNA tenían propiedades adecuadas para su utilización.

Para considerar que las muestras de RNA tienen la calidad adecuada el ratio 260/280 debe aproximarse a 2, si este fuera bajo, como en el caso del DNA, indicaría la presencia de proteínas o compuestos aromáticos. En cuanto a lo que se refiere al ratio 260/230 los valores esperados son algo más altos que para el DNA, entre 2 y 2,2, si este ratio es significativamente más bajo puede indicar contaminación. Todas las muestras de RNA tenían propiedades adecuadas para su utilización exceptuando la muestra de RNA procedente del embrión 6 de la camada cedida por el Dr. Joomyeong Kim [19]. Esta evidenciaba la presencia de contaminantes, al ser una muestra única y no reproducible continuamos con su análisis por qPCR teniendo en cuenta que los resultados podrían no ser totalmente representativos.

5.2 ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR PCR

El estudio de la expresión del locus *Cd9* suscita interés tras conocer que el factor de transcripción REX1 tenía asociación con él; Esta asociación puede modular los niveles de expresión de *Cd9* (*Cd9-001* y *Cd9-002*) además de la expresión de *Gm26728* (*Gm26728-001* y *Gm26728-002*) un gen próximo al pico de ChIPseq (*Imagen 5*).

En un TFG anterior [16] ya se analizó la presencia de los 4 transcritos en células ES por RT-PCR no-cuantitativa. En este análisis, se amplificó gran cantidad de *Cd9-001* (120pb), y una banda de leve intensidad para el transcrito *Gm26728-001* (107pb).

Para comparar este resultado con la expresión en placenta, el tejido alternativo con expresión de REX1, se analizó por RT-PCR la presencia de los dos transcritos de *Cd9* y los dos del locus cercano *Gm26728*. Al tratarse de *primers* diseñados expresamente para qPCR el tamaño de los productos es relativamente pequeño (aproximadamente 100pb).

En este trabajo se analizó la expresión de los 4 transcritos en cDNA de placenta de 11,5 dE y de 18,5 dE comparándola con el control normalizador de expresión *GapdH*. Tras la correspondiente PCR y electroforesis solo se observó producto de amplificación en los carriles 1 (11,5 dE) y 6 (18,5 dE) correspondiente al locus *GapdH* (175pb) y en los carriles 2 (11,5 dE) y 7 (18,5 dE) el correspondiente a *Cd9-001* (120pb). Para los otros transcritos (*Cd9-002*, *Gm26728-001* y *Gm26728-002*) no dieron como resultado una amplificación positiva, indicando que no se expresan en este tejido o lo hacen a niveles muy bajos. Su resultado negativo también podría deberse a que los *primers* no funcionaron correctamente para su amplificación. Se debería comprobar su efectividad sobre muestras de tejido o líneas celulares donde su expresión fuera detectable.

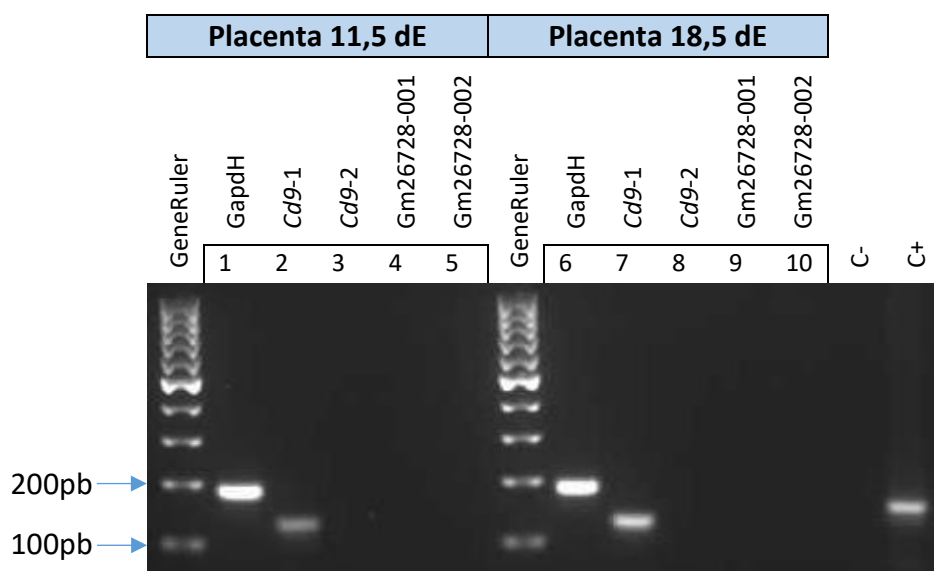


Imagen 11. Resultados de la amplificación por RT-PCR de los 4 transcritos (dos de *Cd9* y dos de *Gm26728*) en placenta de 11,5 dE y 18,5 dE. El producto de la amplificación fue visualizado en un gel de agarosa con GelRed. Como control positivo se amplificó el locus *Cd9* sobre gDNA de placenta de 14,5 dE, ya se conocía de su efectividad. Como control negativo se utilizaron todos los reactivos correspondientes, pero no se añadió muestra.

Cd9 se expresa en menor proporción que *GapdH* en placenta. Se observó una mayor intensidad de la banda (mayor expresión) en placenta de 18,5 dE en comparación con la de 11,5 dE teniendo en cuenta que se ha utilizado la misma cantidad y concentración de muestra (*Imagen x*).

A diferencia de los resultados obtenidos en E14T [16], el transcrito Gm26728-001 no mostró amplificación. Debido a ese motivo y a que en el caso de E14T este transcrito se amplificó de forma ínfima a comparación con el transcrito 1 de *Cd9*, se decidió evaluar únicamente el transcrito 1 de *Cd9* por qPCR para todas las muestras de cDNA.

5.3 ESTUDIO DE EXPRESIÓN POR qPCR

Se purificó mRNA de varios tejidos y líneas celulares de ratón, y se analizó de forma cuantitativa la expresión del transcrito *Cd9-001* y de *Rex1* mediante la técnica de qPCR. Para ello fue necesario normalizar su expresión con la de un gen que se expresa de forma constitutiva *GapdH*. Los datos obtenidos por el programa ViiA7 Software v1.2 se organizaron en la plataforma Excel.

5.3.1 Expresión de *Rex1* y *Cd9* en tejidos y células wt

Se analizó la expresión de *Rex1* y *Cd9* en los diferentes tejidos y células representantes de estadios de desarrollo embrionario y extraembrionario. Se estudiaron las siguientes líneas celulares y tejidos: placenta y embriones (11,5dE y 18,5 dE), ES (E14T), y TS crecidas con o sin *Fibroblast Growth Factor 4* FGF4. Denominamos células TST a aquellas crecidas con FGF4 y que por tanto no se encuentran diferenciadas, las células TSD crecen en ausencia de FGF4 y se encuentran más diferenciadas.

Resultados (*Imagen 12*) indican que en células TS, placentas y embriones, *Rex1* se expresa en mucha menor proporción que en las células ES. El tejido con más expresión (después de ES) es la placenta de 11,5 dE cuya expresión sería aproximadamente un 95% inferior.

Las células ES derivan de la Masa Celular Interna / epiblasto, a partir del cual se forman los tejidos propios del embrión. En las células ES la expresión de *Rex1* es muy elevada,

es por ello por lo que su expresión es considerada como un marcador de pluripotencia [7].

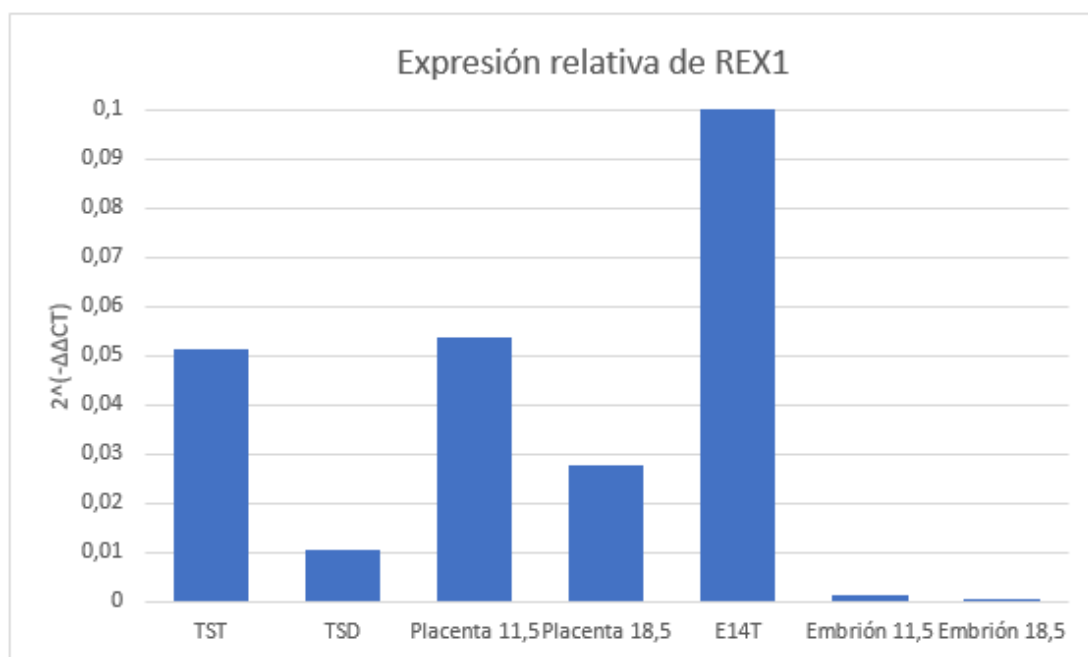


Imagen 12. Resultados de qPCR para el locus *Rex1* en diferentes tejidos embrionarios, placentas y líneas celulares de ratón. Resultados de ensayos en triplicado fueron normalizados utilizando *Gadph* como gen de referencia. Datos procesados empleando el método $\Delta\Delta C_t$ y representados como la fracción de expresión respecto a la expresión en E14t (Valor de 1).

Cabe decir que cualquier mínima diferencia observada en placentas podría resultar de interés pues *Rex1* únicamente se expresa en las células TGC, especialmente alrededor de las arterias espirales [M. Climent, J. Schoorlemmer et.al datos aún pendientes de publicación].

Las células TS (TS y TSD) a partir de las cuales se forma la placenta tienen una expresión de *Rex1* parecida a las de placenta, entre un 1 y un 5% de la expresión del control E14T (Imagen 12). En ensayos anteriores el porcentaje de expresión de las células TS rondaba el 10% de la expresión de E14T [18]. Observamos el doble de expresión de *Rex1* en placentas de 11,5 dE comparado con la expresión en placenta de 18,5 dE.

Los valores obtenidos para tejido embrionario se encuentran por encima del umbral de detección (igual o por encima de los valores obtenidos en un control negativo sin

cdNA). Por lo tanto, se puede considerar que no se ha detectado expresión de *Rex1* (*Imagen12*). Estos resultados concuerdan con datos publicados por Rogers et al. [21].

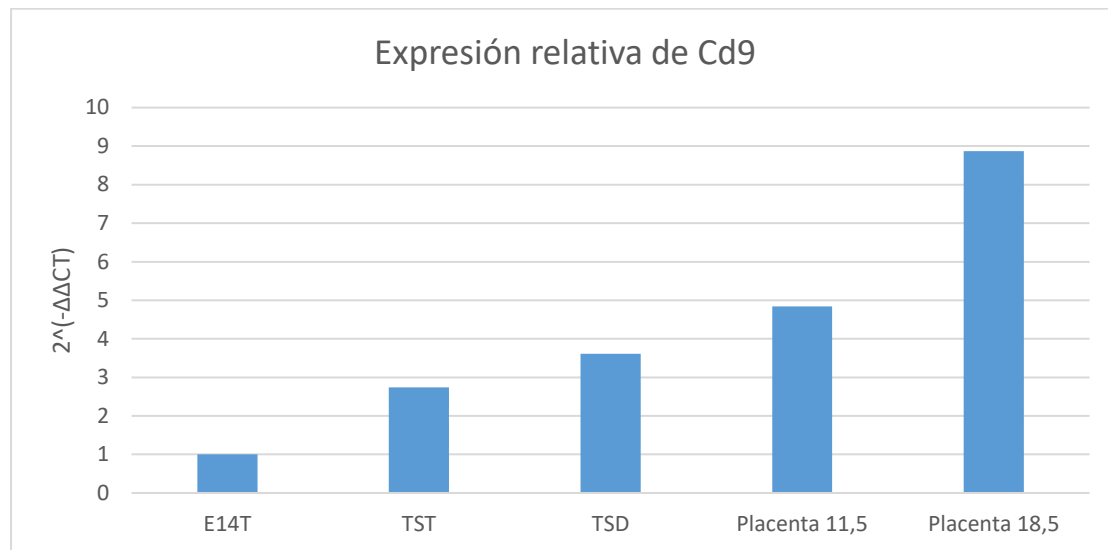


Imagen 13. Resultados de qPCR locus *Cd9* en diferentes placentas y células madre trofoblásticas y el control E14T cuantificado por qPCR. Resultados de ensayos en triplicado fueron normalizados utilizando *Gadph* como gen de referencia. Datos procesados empleando el método $\Delta\Delta Ct$ y representados como la fracción de expresión respecto a la expresión en E14t (Valor de 1).

Si *Rex1* se expresa a niveles más elevados en las células E14T, observamos lo inverso para *Cd9*: entre las muestras analiza presenta la expresión más baja (*Imagen 13*). En TST observamos un nivel de expresión de *Cd9* 1,8 veces superior al de E14T y en TSD 2,6 veces (*Imagen 13*). Observamos por lo tanto una expresión de *Cd9* ligeramente más alta, según procede la diferenciación de las TST. La placenta se forma por células procedentes del trofoectodermo, por tanto, se considera un estadio posterior a las TST y TSD.

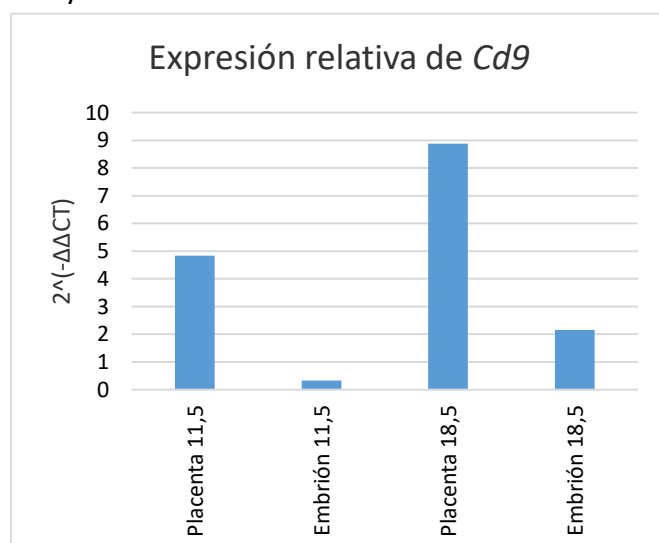


Imagen 14. Resultados de qPCR a partir de muestras de cDNA de placentas (18dE) o embriones (18.5 dE). Resultados de ensayos en triplicado fueron normalizados utilizando *Gadph* como gen de referencia. Datos procesados empleando el método $\Delta\Delta Ct$ y representados como la fracción de expresión respecto a la expresión en E14t (Valor de 1).

La muestra de placenta de 11,5 dE muestra menor expresión que la de 18,5 de, aproximadamente la mitad de la misma. Esto ya se intuyó en el ensayo de expresión por PCR (*Imagen 11*) en el que la banda de amplificación de placenta de 18,5 dE era más intensa que la de 11,5 dE, aproximadamente del doble.

Si comparamos la expresión de *Cd9* entre placentas y embriones vemos que en estos últimos es mucho menor (*Imagen 14*). Los niveles de expresión de *Cd9* tienden a aumentar cuantos más días de gestación hayan transcurrido tanto para placentas como para embriones (*Imagen 14*).

La diferencia en la expresión de *Cd9* entre las placentas de 11,5 y 18,5 dE, el doble de 11,5 que la de 18,5, es justo al revés de lo que ocurre con la expresión de *Rex1*, que baja según procede el desarrollo (*Imagen 12 y 13*). Este hecho es compatible con la idea de que REX1 tendría un efecto represivo sobre la expresión de *Cd9*.

5.3.2 Expresión de *Rex1* y *Cd9* sobre placentas y embriones con distintos genotipos

El análisis también se realizó sobre placentas y embriones de 18,5 dE con distintos genotipos: heterocigotos para la deficiencia en *Rex1*, homocigotos para la deficiencia en *Rex1* y wt (silvestre). Estas muestras proceden de la misma camada [19], y se analizó solo las correspondientes a hembras, ya que no se gestaron machos representativos de todos los genotipos. Al analizar solo a las hembras eliminamos la posible variabilidad debida al sexo. Con este estudio se comparó los niveles de *Cd9* entre placentas wt, homocigotas y heterocigotas para la deficiencia en *Rex1*.

El nivel de expresión de *Rex1* en el cDNA de la placenta 18,5 dE *Rex1* +/+ (RNA aportado por J.Kim [19], es más alta que en la placenta de 18,5 *Rex1* +/+ propiedad del grupo del Dr. Jon Schoorlemmer y es más parecida a la placenta de 11,5 dE (*Imagen 13 y 15 A*). Esto podría indicar que la expresión de *Rex1* varía tanto en función de la muestra a analizar como a lo largo de la gestación.

Tal y como esperábamos, en las placentas *Rex1* -/- no se ha detectado expresión de *Rex1* (*Imagen 15 A*). Además, la expresión en placentas heterocigotas para *Rex1* (*Rex1* +/-) corresponde a aproximadamente a la mitad que para la placenta wt. Igual que el

experimento anterior (*Imagen 12*), en embriones no se ha detectado expresión de *Rex1*.

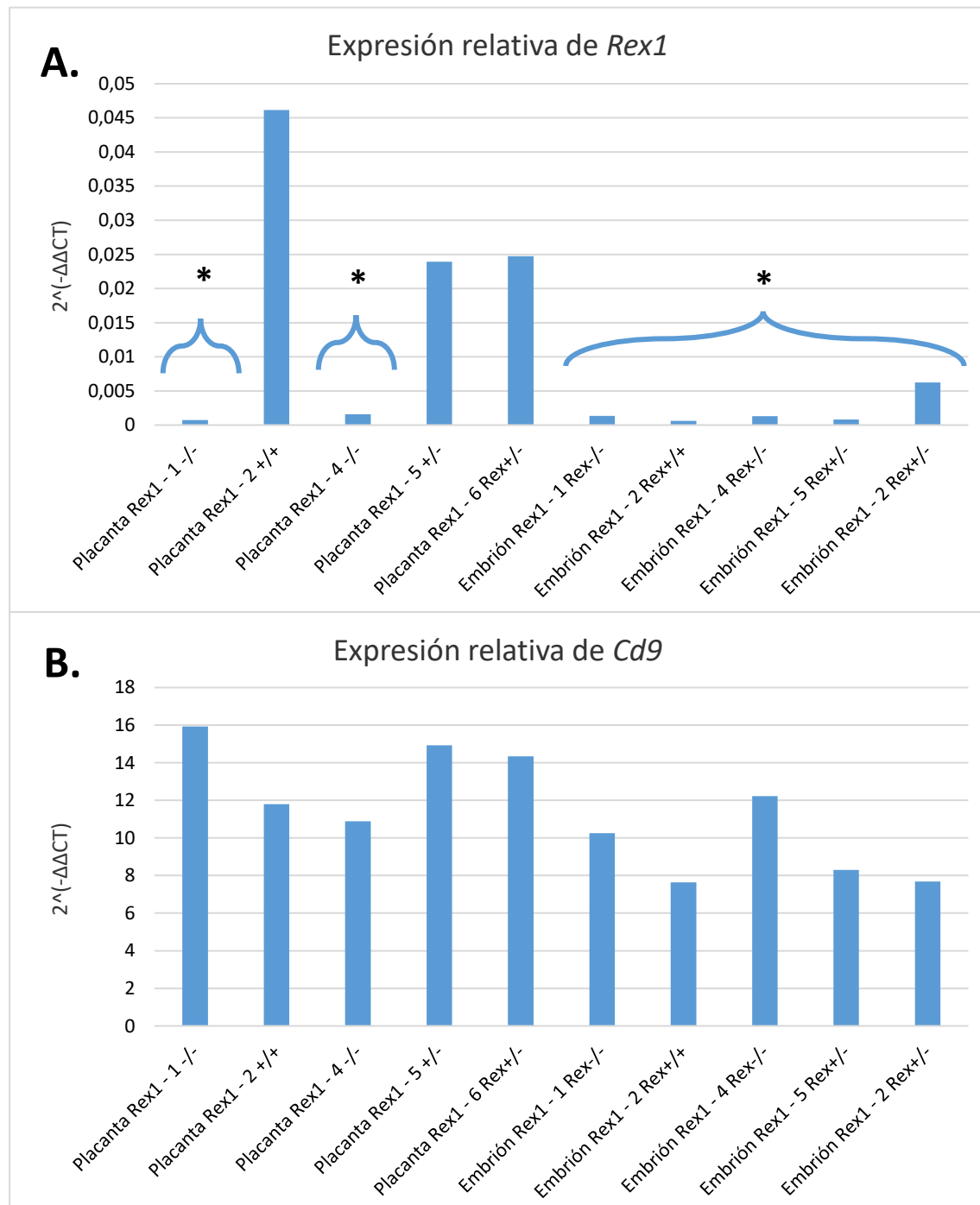


Imagen 15. Resultados de qPCR a partir de muestras de cDNA de placentas (18dE) o embriones (18.5 dE) de los genotipos indicados. Resultados de ensayos en triplicado fueron normalizados utilizando *Gadph* como gen de referencia. Datos procesados empleando el método $\Delta\Delta C_t$ y representados como la fracción de expresión respecto a la expresión en E14t (Valor de 1). Los datos marcados * refieren a valores de Ct por encima del umbral que se considera válido y que por tanto consideramos que presentan valor 0.

En lo que respecta a la expresión de *Cd9*, la deficiencia en *Rex1*, tanto en homocigosis como en heterocigosis, parece conllevar una mayor expresión de *Cd9* en placentas y embriones respecto a los wt (*Imagen 15 B y 16*) aunque este aumento es ligero.

Estos resultados parecen afirmar que REX1 tiene un papel modulador sobre la expresión de *Cd9*, de modo que su presencia actuaría como represor de la expresión de *Cd9*, dado que en su ausencia la expresión de este locus aumenta.

De las 4 muestras con deficiencias en *Rex1* (*Imagen 15*), la única muestra que no cumple con estas afirmaciones es la de placenta *Rex1* - /-. Pese a no expresar *Rex1* (*Imagen 15 A*), la expresión de *Cd9* es inferior

incluso a la placenta *Rex1* +/+ (*Imagen 15 B placenta Rex1-2 +/+*). La relevancia de este dato es desconocida en este momento. Un análisis de camadas y muestras adicionales demostraría si la muestra es representativa o no de las placentas deficientes en *Rex1* en homocigosis.

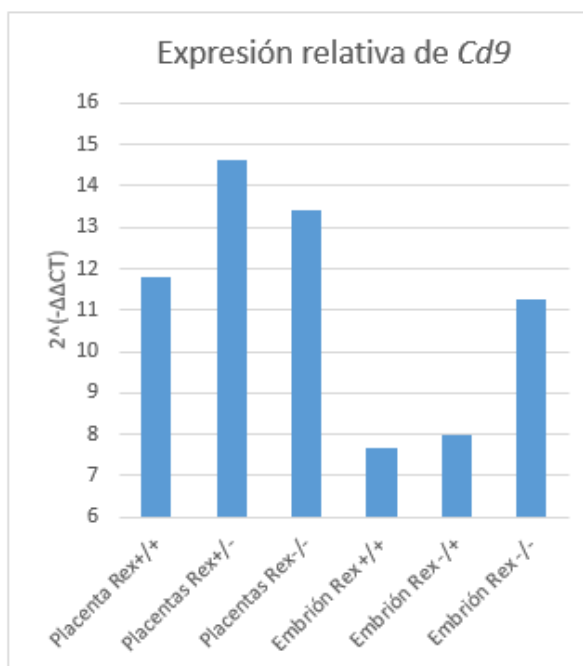


Imagen 16. Resultados de qPCR para *Cd9* (*Imagen 15 B*) a partir de muestras de cDNA de placentas (18dE) o embriones (18.5 dE) de los genotipos indicados. Datos representan los valores medios de 2 homocigotos, 2 heterocigotos o silvestre (1) para la deficiencia en *Rex1* en placentas y embriones. Resultados de ensayos en triplicado fueron normalizados utilizando *Gadph* como gen de referencia. Datos procesados empleando el método $\Delta\Delta Ct$ y representados como la fracción de expresión respecto a la expresión en E14t (Valor de 1). Los datos marcados * refieren a valores de Ct por encima del umbral que se considera válido y que por tanto consideramos que presentan valor 0.

5.4 ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACIÓN

Para comparar los niveles de metilación alrededor del sitio de asociación de REX1 (*Imagen 17*), se pretende analizar CpGs alrededor de este pico (*Imagen 4*). Aparte del amplicón descrito y analizado en trabajos anteriores *Cd9M* [16], se pretende analizar una región más 5' (*Cd9U*) y una región con alta densidad de CpG situado a 4kb del pico (*Cd9I*). Además, se decidió analizar un locus sin unión de REX1 [D Guallar, J Schoorlemmer et al., datos sin publicar] para comprobar si el porcentaje de metilación está influido por la asociación de REX1 al locus. Se decidió utilizar el locus *Elf5* con dicho fin.

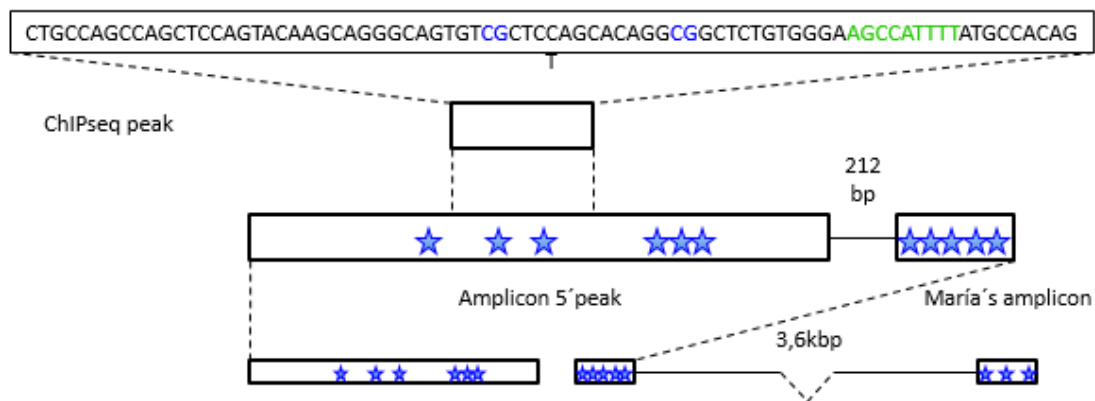


Imagen 17. Secuencia del pico identificado en ChIPseq [D Guallar, J Schoorlemmer et al., datos sin publicar], que corresponde al sitio de unión de REX1. Los CpGs dentro del pico están marcados en azul, la secuencia consenso en verde. Se muestra la relación entre el pico y los amplicones *Cd9U*, *Cd9M* y *Cd9I* analizados en este trabajo. La distancia entre pico y el amplicón *Cd9M* es de 212 bp, entre los amplicones *Cd9U* y *Cd9M* es de 42 bp. Cada estrella azul indica un CpG analizado.

5.4.1 OPTIMIZACIÓN DE LOS PRIMERS

Para la posterior pirosecuenciación, es necesario obtener una cantidad suficiente de producto de PCR, partiendo de gDNA convertido con bisulfito. Un primer paso en el análisis de metilación entonces es optimizar las condiciones de PCR: determinar las óptimas temperaturas de amplificación, y la funcionalidad de los *primers* diseñados (*Tabla 7*).

Se debe evitar la aparición de bandas inespecíficas que dificultaría su posterior pirosecuenciación.

Ensayos de metilación					
Amplicón	Secuencia primers (5'→3')		pb	Condiciones PCR	
<i>Cd9M</i>	Fw	TAAAATGGAGGTAGTGGTTTTGTTTT	144	Tm	60°C
	Rv	CCACTCCTCCTACTCAATATAACC		Ciclos	40
	Rv -biotina	BIO-CCACTCCTCCTACTCAATATAACC		Mg ²⁺	No
<i>Cd9U</i>	Fw	GGGAGAAATTAAGTTTTAGGTA	A: 337	Tm	56°C
	Rv	AAAAAAAAAATACACTACTCCTA		Ciclos	40
	Fw -biotina	BIO- GGGAGAAATTAAGTTTTAGGTA		Mg ²⁺	No
<i>Cd9I</i>	Fw -2	TTTTTTAGGTAGTTTAGAGAGAG	B: 415 C: 264	Tm	57°C
	Fw -1	TTTGATTATTTGGGAAATGTAGA		Ciclos	40
	Rv	CCCCCRAATATAAAAAAAAAA		Mg ²⁺	Sí
	Rv -biotina	BIO- CCCCCRAATATAAAAAAAAAA			
<i>Elf5</i>	Fw	TTTGTTGTTTGAGATTGAGAGAG	D:330	Tm	56°C
	Rv	CAATACTTTACTAACCTTCCAC		Ciclos	40
	Fw -biotina	BIO-TTTGTTGTTTGAGATTGAGAGAG		Mg ²⁺	No

Tabla 7. Primers utilizados en el ensayo de metilación. En la primera columna tenemos el locus a amplificar, en la segunda el diseño de los primers forward (fw), reverse(rv) y del primer con biotina, en la tercera tamaño del producto de amplificación en pb. En la cuarta las condiciones óptimas de amplificación en cuanto a Tm, ciclos de amplificación y adición extra de Mg²⁺.

La optimización del amplificación de *Cd9M* se llevó acabo en trabajos anteriores [16], el esquema de los primers utilizados para la amplificación: *Imagen 18*.

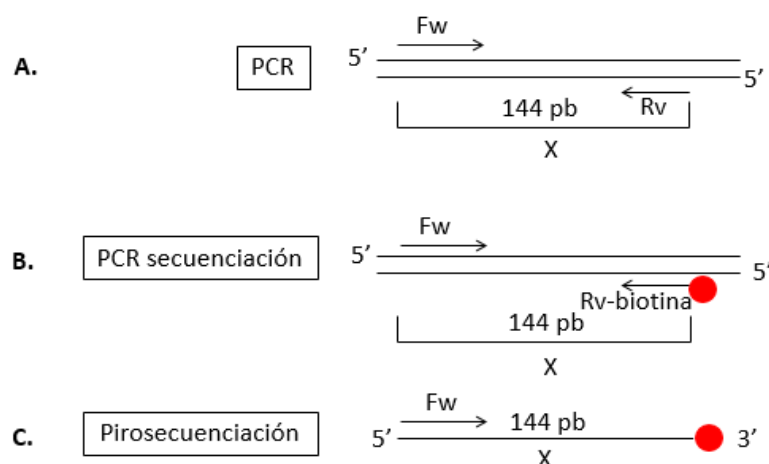
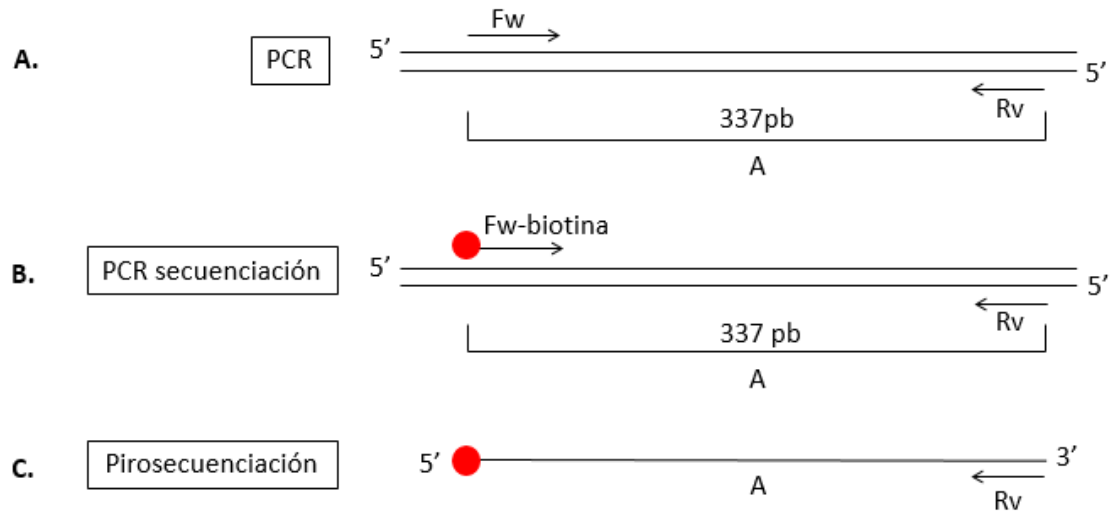


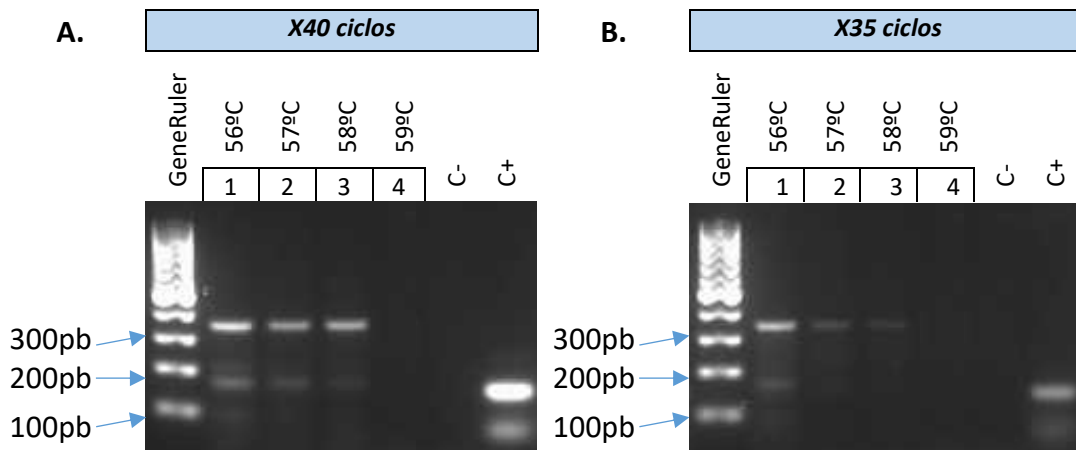
Imagen 18. Representación del Amplicón *Cd9M* y los primers utilizados (A.) Representación gráfica de los primers utilizados para la optimización de la amplificación, el producto generado X es de 144pb. (B.) Esquema primers utilizados para la amplificación del producto X para pirosecuenciar. El primer Fw contiene una cola de biotina (representada por esfera roja). (C.) Esquema primer Rv utilizado para la pirosecuenciación sobre la monohebra del producto X, la cola de biotina se encuentra en el extremo 3'.

5.4.1.1 LOCUS *CD9U*

Para la amplificación del locus *CD9U* se utilizaron unos *primers* que producen un producto de amplificación A de 337pb (*Imagen 19*). La amplificación para generar el producto para la pirosecuenciación se llevó a cabo utilizando el primer Fw biotinilado.



*Imagen 19. Representación del Amplicón A en el locus *Cd9U* y los primers utilizados para su amplificación y pirosecuenciación.* (A.) Representación gráfica de los primers utilizados para la optimización de la amplificación, el producto A generado es de 337pb. (B.) Esquema primers utilizados para la amplificación del producto A para pirosecuenciar. El primer Fw contiene una cola de biotina (representada por esfera roja). (C.) Esquema primer Rv utilizado para la pirosecuenciación sobre la monohebra del producto A, la cola de biotina se encuentra en el extremo 5'.

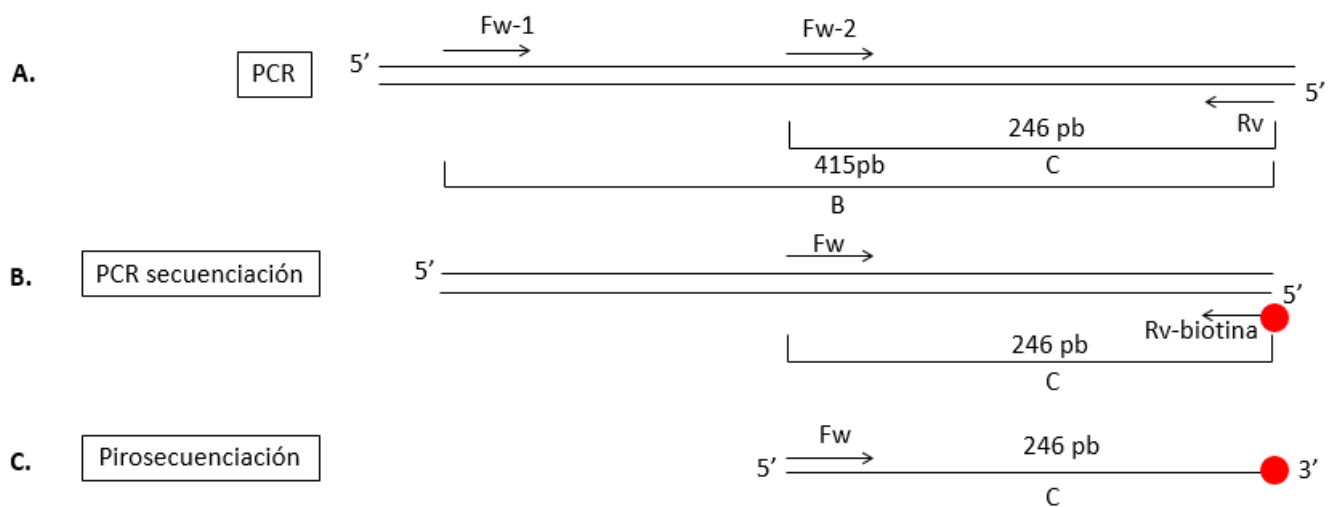


*Imagen 20. Electroforesis de productos de amplificación del amplicón A (*Cd9U*).* A las temperaturas indicadas, visualizados con GelRED. PCR sobre gDNA convertido de placenta de 14,5 días. Como control positivo se amplificó el amplicon *Cd9M* [16]. C- refiere a una reacción sin template. (A.) 40 ciclos de amplificación (B.) 35 ciclos de amplificación.

Se decidió probar la pareja de *primers* a diferentes temperaturas de Tm: 56, 57, 58 y 59°C (alrededor de la Tm calculada de 56°C), aplicando 40 ciclos de amplificación o 35 (*Imagen 20*). Se encontró producto de amplificación para las temperaturas de Tm 56, 57 y 58°C pero no para 59°C, independientemente del número de ciclos. La intensidad del producto A era mayor en el caso de la PCR de 40 ciclos y Tm de 56°C. Se mantuvieron estas como las condiciones óptimas de amplificación.

5.4.1.2 AMPLICÓN *Cd9l*

Para la amplificación del locus *Cd9l* se diseñaron los *primers* Fw-2 y Rv (*Imagen 21*) pero el producto C de 246pb obtenido no amplificaba de forma muy eficiente (*Imagen 22 A*). Por ello se decidió realizar *nested* PCR por lo que se diseñó un segundo primer Fw, Fw-1, más externo al Fw2, el producto B generado de 415 pb fue utilizado como *template* en una segunda PCR utilizando los *primers* Fw-2 y Rv (*Imagen 21 y 22 B*).



*Imagen 21. Representación del Amplicón B y C en el locus *Cd9l* y los *primers* utilizados para su amplificación y pirosecuenciación.* (A.) Esquema *primers* utilizados para la optimización de la amplificación, el amplicón B generado es de 415pb con los *primers* Fw-nested y Rv, el amplicón B fue utilizado como *template* en una segunda PCR para obtener el producto C se utilizaron los *primers* Fw y Rv sin biotina. (B.) Esquema *primers* utilizados para la amplificación del producto C sobre el producto B para pirosecuenciar. El primer Rv contiene una cola de biotina (representada por esfera roja). (C.) Esquema primer Rv utilizado para la pirosecuenciación sobre la monohebra del producto C, la cola de biotina se encuentra en el extremo 5'.

Se testó esta pareja de *primers* a 55°C y a 57°C de Tm (Tm calculada de 55°C) con y sin magnesio extra (*Imagen 22 A*). Sin aporte extra de magnesio no se consigue un producto de amplificación detectable. por electroforesis a ninguna de las dos Tm, Añadiendo extra magnesio, se consiguió amplificación, resultando una banda algo más intensa a 57°C (*Imagen 22A, carril 4*).

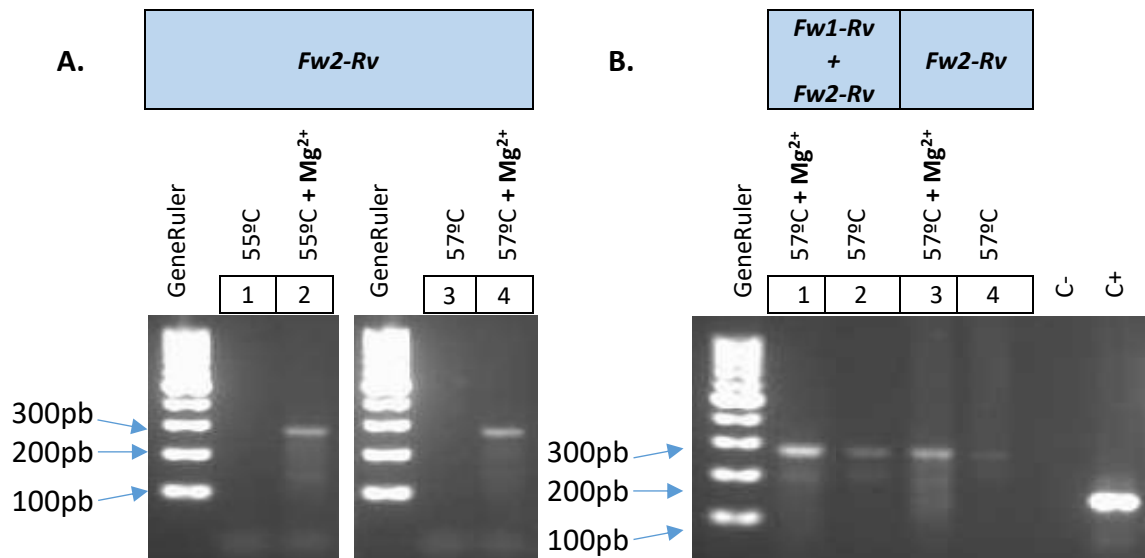


Imagen 22. Electroforesis del producto de amplificación C (*Cd9l*) tras 40 ciclos de amplificación. Como control positivo se amplificó el locus *Cd9* sobre gDNA de placenta de 14,5 dE [16]. Como control negativo no se añadió *imput* (A.) PCR sobre gDNA convertido de placenta de 14,5 dE. Uso de *Primers* sin biotina Fw-2 y Rv. En los carriles 1,2 productos de PCR utilizando Tm de 55°C, en el 3 y 4 Tm de 57°C. En los carriles 2 y 4 productos de PCR a los cuales se les añadió Mg²⁺ extra. (B.) PCR a 57°C de Tm sobre gDNA convertido de placenta de 14,5 dE (carriles 3 y 4) y sobre producto B (*imagen X*) (carriles 1,2). Uso de *Primers* sin biotina Fw-2 y Rv. En los carriles 1,2 producto C resultado de amplificación nested, primero con Fw-1 y Rv seguido de Fw2 y Rv. En los carriles 3 y 4 producto C de amplificación no nested. A las reacciones de los carriles 1 y 3 se les añadió Mg²⁺ extra.

Se decidió realizar *nested* PCR por lo que se diseñó un segundo primer Fw, Fw-1, más externo al Fw-2 (*Imagen 21*). Una vez realizado un PCR con los primers Fw-1 y Rv (*amplicon B*), se utilizó el producto B de 415 pb como template en una segunda PCR utilizando los primers Fw-2 y Rv (*Imagen 21 y 22*).

Se comparó la eficacia de los productos C (*Imagen 22 B*) obtenidos en amplificación directa (carriles 3 y 4) con una amplificación utilizando el producto B (*Imagen 21*) como template (*Imagen 22 B*). El producto B no es detectable por electroforesis.

Se concluyó que las condiciones óptimas para la amplificación del amplicón *Cd9l* son realizar una primera PCR de 40 ciclos a 57°C de T_m para amplicón B, seguida de otra PCR de 40 ciclos con los *primers* Fw-2 y Rv a 57°C con adición extra de Mg^{2+} .

La amplificación para generar el producto utilizado en la pirosecuenciación se llevó a cabo utilizando el primer Rv biotinilado.

5.4.1.3 LOCUS *ELF5*

En el caso del locus *Elf5* se utilizaron unos *primers* (Tabla 7) para la amplificación del producto D de 337pb (Imagen 23).

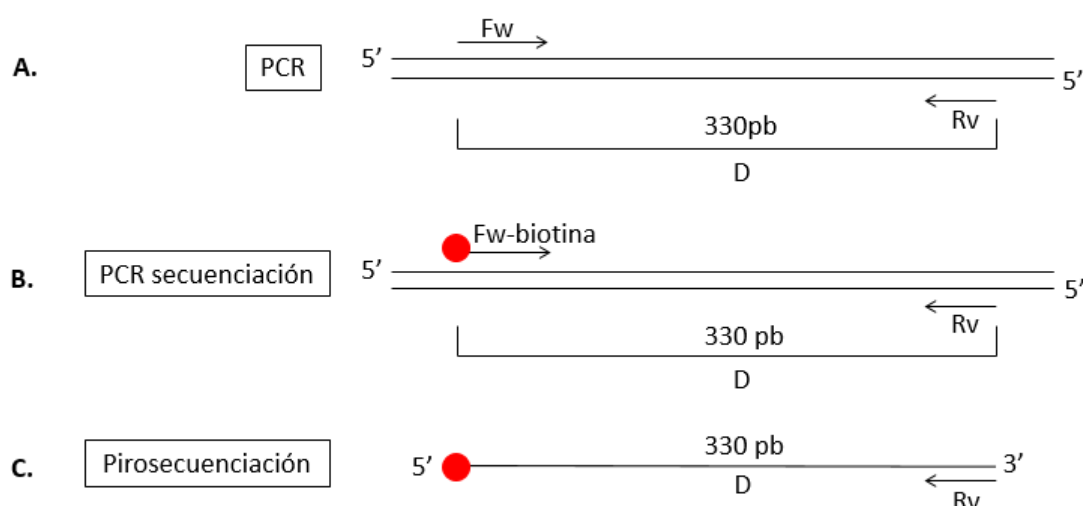


Imagen 23. Representación del Amplicón D en el locus *Elf5* y los *primers* utilizados para su amplificación y pirosecuenciación. (A.) Esquema *primers* utilizados para la optimización de la amplificación, el amplicón D generado es de 330pb. (B.) Esquema *primers* utilizados para la amplificación del producto D para pirosecuenciar. El primer Fw contiene una cola de biotina (representada por esfera roja). (C.) Esquema primer Rv utilizado para la pirosecuenciación sobre la monohebra del amplicón D, la cola de biotina se encuentra en el extremo 5'.

La T_m calculada para la pareja de *primers* se encontraba alrededor de 59-60°C, por ello hicimos una prueba a 59°C y otra a 56°C, una T_m algo inferior que favorece la amplificación. Además, comprobamos el efecto de la adición extra de Mg^{2+} a ambas T_m . Los ciclos de amplificación utilizados en un primer momento fueron 40. Los productos se separaron en gel de agarosa, que se muestra en la (Imagen 24). La adición de Mg^{2+} extra resultó en carriles llenos de bandas inespecíficas tanto para la temperatura de 59 como la de 56°C. En cuanto a las amplificaciones de productos a

los que no se les añadió Mg^{2+} extra, a $56^{\circ}C$ la banda de amplificación fue más intensa que para $59^{\circ}C$. Se concluyó que las condiciones óptimas de amplificación del locus *Elf5* con estos *primers* eran T_m a $56^{\circ}C$, 40 ciclos de amplificación y sin adición extra de Mg^{2+} .

Una vez comprobado la eficacia de amplificación del amplicon D, la amplificación para generar producto destinado a la pirosecuenciación se llevó a cabo utilizando el primer Fw biotinilado.

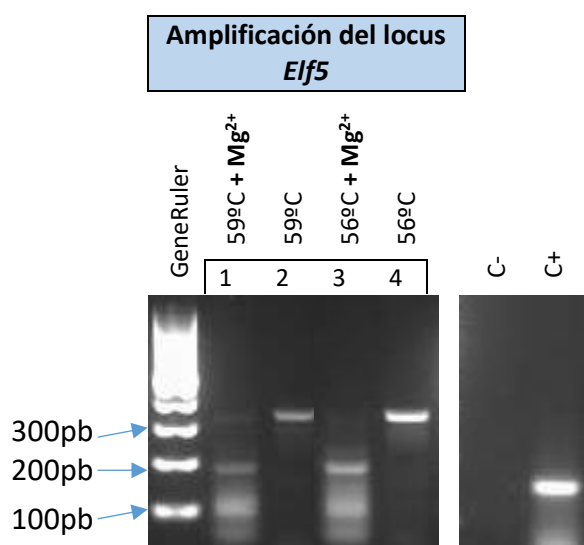


Imagen 24. Electroforesis del amplicón D (*Elf5*). PCR sobre gDNA convertido de placenta de 14,5 dE. Uso de *Primers* sin biotina Fw y Rv. En los carriles 1 y 2 se testó la amplificación a $59^{\circ}C$ de T_m , en el primero con adición extra de Mg^{2+} y en el segundo sin ella. En los carriles 3 y 4 se testó a $56^{\circ}C$ con y sin adición extra Mg^{2+} . Como control positivo se amplificó el locus *Cd9* sobre gDNA de placenta de 14,5 dE [16]. Como control negativo no se añadió imput.

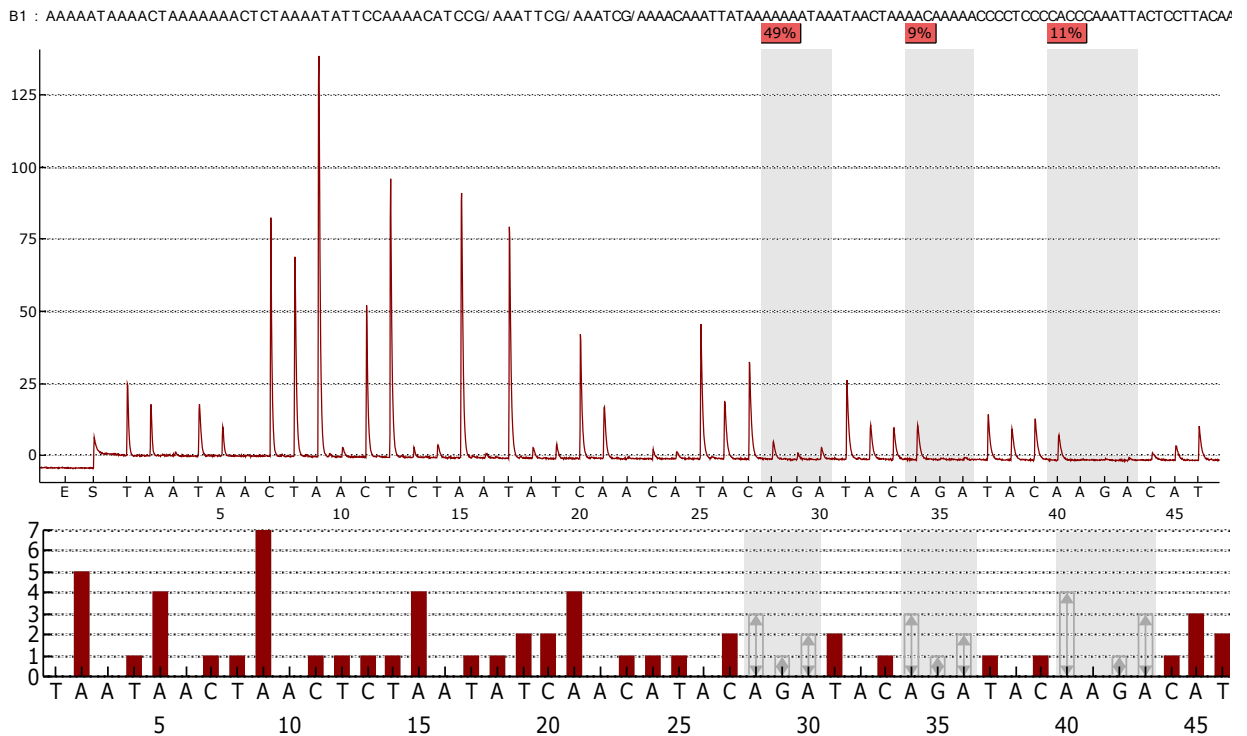
5.4.2 VALIDACIÓN PIROSECUENCIACIÓN

Una vez se han puesto a punto las condiciones de amplificación para cada pareja de primers se obtuvo producto biotinilado de todas las muestras de gDNA convertido con bisulfito (*Tabla 1*): 3 líneas celulares ES wt, 1 línea celular ES Rex $-/-$, 2 muestras de placenta (14,5 y 18,5 dE), 1 de embrión (18,5 dE) y células TS. Y se envió a pirosecuenciar entregando también el primer correspondiente para cada locus (*Tabla 7*).

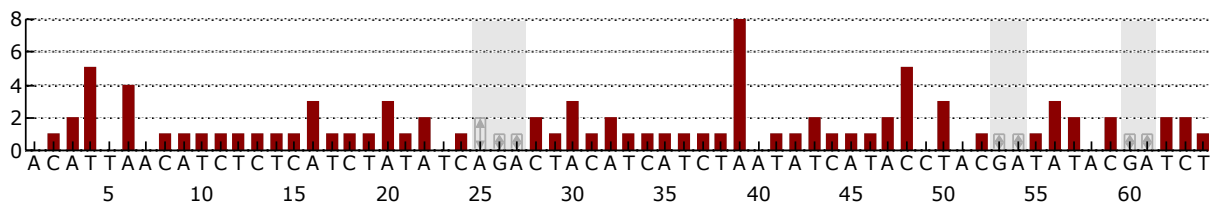
Durante el proceso de pirosecuenciación, la DNA polimerasa alarga la cadena monohebra desde el primer de secuenciación con el dNTP correspondiente. El ATP liberado es convertida en luz de forma proporcional, cuya intensidad es reflejada en picos en un pirograma. La presentación de dNTPs en un orden establecido permite medir ambigüedades en la secuencia (C/T o G/A). El programa Pyro Q-CpG 1.0.9 cuantifica el porcentaje de metilación de los dinucleótidos CpG dividiendo la

incorporación del nucleótido citosina frente a la incorporación de citosina y timina (%C = C/C+T). A mayor intensidad de la señal para un nucleótido incorporado, mejor es la calidad del DNA. Por tanto no solo podremos comparar la secuencia a analizar con la secuencia problema sino también la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos. Tras observar los resultados obtenidos en la pirosecuenciación del amplicón A del locus *Cd9U* (imagen 17 y 20) y del amplicón D del locus *Elf5* (imagen 23) sobre todas las muestras, se comprobó que los resultados obtenidos tras la pirosecuenciación no eran fiables, y por tanto no podían ser tomados en consideración. La secuencia amplificada y pirosecuenciada, representada en el pirograma, no corresponde con la secuencia objeto del análisis, representada en el histograma (Imagen 25 A. y B).

A.



B.



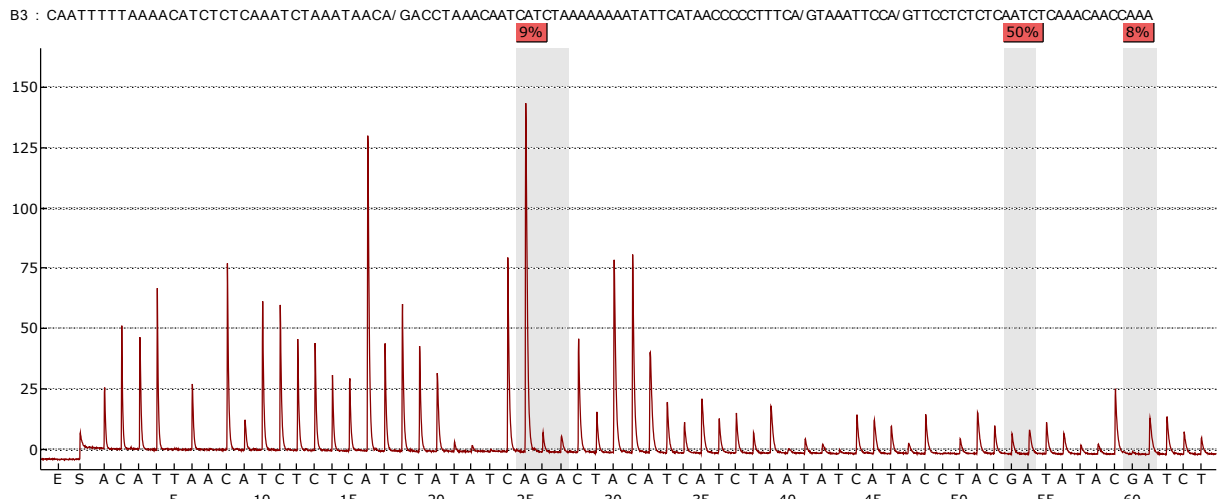
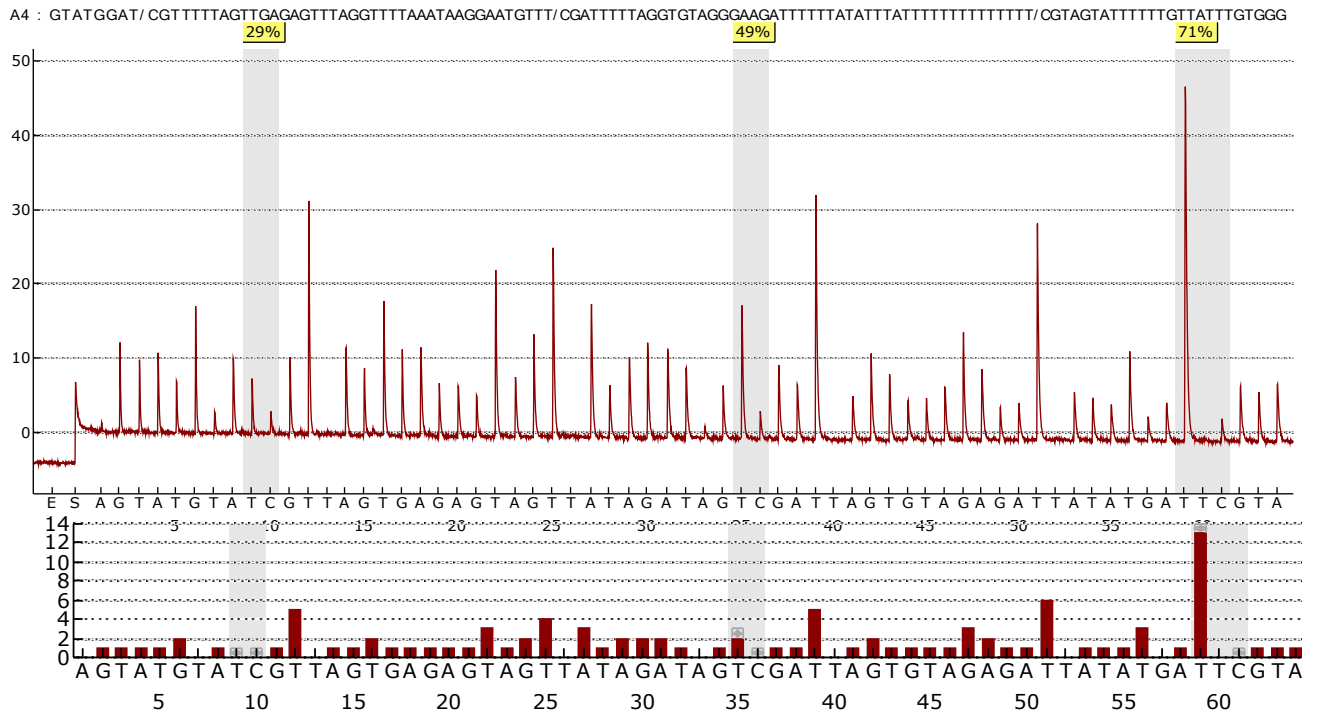


Imagen 25. Ejemplo de resultados obtenidos por el programa Pyro Q-CpG 1.0.9, programas de la secuencia amplificada en la parte superior de cada imagen e histograma de la secuencia esperada en la parte inferior. El color rojo que encuadra el porcentaje de metilación de los dinucleótidos CpG indica la infiabilidad del mismo. **A.** Resultados para el amplicón A del locus *Cd9U*. **B.** Resultados para el amplicón D del locus *Elf5*.

Esto puede deberse a que en el proceso de amplificación se ha generado un producto de amplificación secundario que ha interferido con el de los amplicones A y D respectivamente. Si recordamos en la amplificación del locus *Cd9U* (amplicón D) ya se observaba una tenue banda de amplificación inespecífica de 180pb que esperábamos que no interfiriera durante la pirosecuenciación (*Imagen 20*). Por tanto pese a los esfuerzos durante el proceso de optimización de los *primers* llegamos a la conclusión de que no pueden ser utilizados para tal fin y deberíamos trabajar en un nuevo diseño.

En el caso de la pirosecuenciación del amplicón *Cd9I* (*Imagen 17 y 21*), los resultados son considerablemente fiables, la secuencia amplificada se corresponde casi en su totalidad a la secuencia objeto de estudio (*Imagen 26 A*). Posiblemente mejorarían estos resultados entregando más cantidad de producto biotinilado para así mejorar la intensidad de la señal. Por último, tal y como también ocurrió en el estudio anterior [16] los resultados obtenidos al pirosecuenciar el amplicón X correspondiente al locus *Cd9* son del todo fiables y con intensidades óptimas (*Imagen 26 B*).

A.



B.

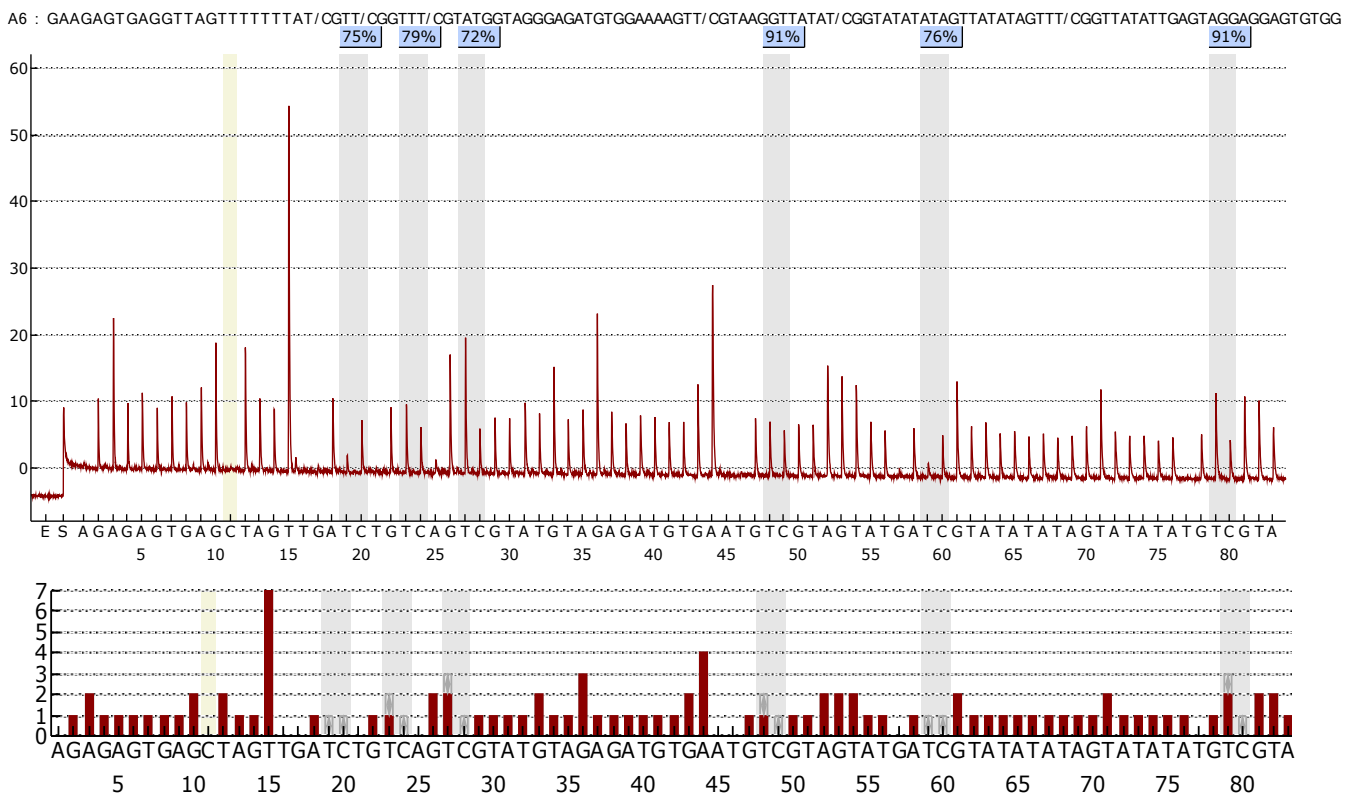


Imagen 26. Ejemplo de resultados obtenidos por el programa Pyro Q-CpG 1.0.9, pirogramas de la secuencia amplificada en la parte superior de cada imagen e histograma de la secuencia esperada en la parte inferior. El color amarillo (aceptable) y verde (óptimo) que

encuadra el porcentaje de metilación de los dinucleótidos CpG indica la fiabilidad del mismo. **A.** Resultados para el amplicón C /*Cd9l* (*Imagen 17 y 22*) **B.** Resultados para el amplicón X del amplicón *Cd9M* (*Imagen 17y 18*).

Tras analizar y valorar la fiabilidad de los resultados proporcionados por este programa concluimos que la pirosecuenciación proporciona un ensayo robusto para medir la metilación en las regiones contenidos en los amplicones *Cd9M* y *Cd9l*. Por tanto, solo evaluaremos estos resultados. En especial el análisis de la metilación en *Elf5* hubiera sido de interés ya que se trataba de un locus control con el que poder determinar si las diferencias entre líneas silvestres o deficientes en *Rex1* son específico de locus.

5.4.3 PORCENTAJE DE METILACIÓN

5.4.3.1 AMPLICIÓN *Cd9M*

En el amplicón X de *Cd9M* (*Imagen 17 y 18*) encontramos 6 dinucleótidos CpG susceptibles a la metilación. Cabe decir, que nos hubiera gustado comparar estas células ES deficientes en *Rex1* con un cultivo en el cual se hubiera rescatado la expresión de REX1. En ausencia de líneas con rescate de REX1, se decidió comparar la metilación en el locus *Cd9* entre la línea *ESRex1 -/-* y un conjunto de líneas y preparaciones de células ES wt. En particular se trata de dos preparaciones de la línea ES E14T, y la línea ES MAR. Pequeñas diferencias y divergencias entre cultivos de células ES wt saldrán de este modo a luz, y permitirán evaluar si el patrón de metilación en la línea *ESRex1 -/-* es diferente al conjunto de líneas ES. Primeramente, Se realizó ensayos de metilación por triplicado, los resultados se presentan en la *Imagen 27*.

El cuarto y sexto dinucleótido CpG son los que mayor porcentaje de metilación presentan en todos los tipos celulares. Exceptuando las células ES wt que denominamos MAR en el primer CpG, todas las células ES han presentado un porcentaje de metilación superior en todos los dinucleótidos al de las células deficientes en REX1 (*Imagen 27*). La diferencia se hace más evidente al comparar la media de todas estas células ES +/+ (43,2%) con ES -/- (33,4%) (*Imagen 28*), el porcentaje de metilación es un 23% inferior en las células deficientes en REX1, por

tanto, podemos confirmar la influencia de ese factor sobre el patrón de metilación del locus *Cd9*. La presencia de REX1 parece proteger la metilación del locus *Cd9* y por tanto ayuda a conservar rasgos propios de la línea celular.

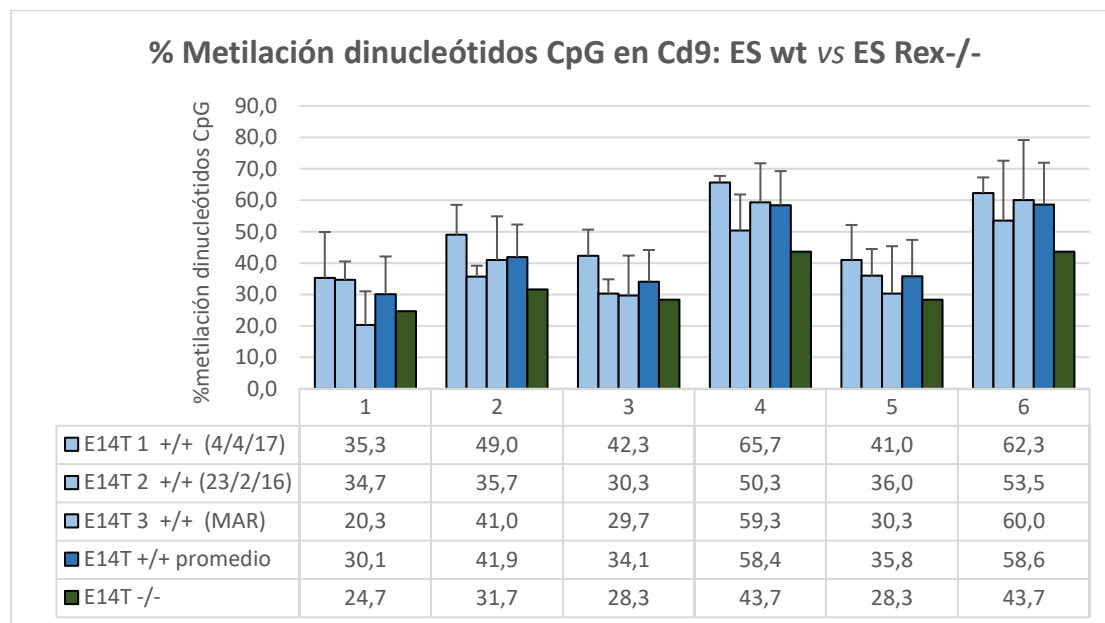


Imagen 27. Metilación de los seis dinucleótidos del amplicón X (imagen 17 y19) del locus *Cd9*. Comparación entre tres muestras de células ES wt (dos preparaciones de E14T y ES MAR), y las ES deficientes en *Rex1*. Los valores representados como porcentajes corresponden al promedio de por lo menos tres ensayos independientes. El error corresponde a la desviación estándar. Los números en el eje horizontal refieren a los seis dinucleótidos dentro del amplicón. En color azul claro los valores de las células ES Wt (dos preparaciones de E14T y ES MAR), en azul oscuro el promedio de las 6 CpGs dentro del amplicón para esa isla de las tres muestras Wt y en verde células ES REX1 -/-.

Se analizó el patrón de metilación de todos los tipos y tejidos celulares como mínimo por triplicado para obtener mayor robustez en los resultados. Para los triplicados de un determinado tipo celular se utilizó la misma muestra de gDNA (con igual fecha de extracción) pero se realizó la conversión con bisulfito en diferentes fechas. Los diferentes tipos celulares tienen diferente fecha de extracción y también para la conversión. Utilizando preparaciones de gDNA extraídas bajo las mismas condiciones y en la misma fecha proporcionaría mayor validez al experimento. Otra forma de minimizar diferencias es analizar triplicados de muestras convertidas el mismo día. El análisis de la línea ES MAR de reciente derivación, no aporta indicios de que con una mayor prolongación del cultivo, como ocurrió en E14T, conlleva pérdida de metilación.

Este fenómeno si ha sido descrito en otros casos a causa de la acción de las enzimas demetiladoras TET y la pobre actuación de las enzimas DNMT [22].

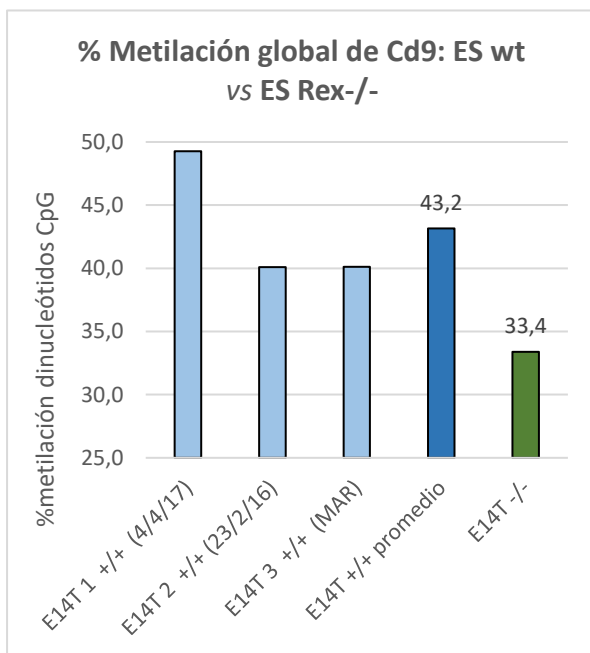


Imagen 28. Porcentaje de metilación global del amplicón X (imagen 17 y 18 del locus *Cd9* para las tres muestras de células ES wt y las ES deficientes en REX1. Los valores representados corresponden al promedio de por lo menos tres mediciones. En color azul claro los valores de las células ES Wt, en azul oscuro el promedio para esa isla de las tres muestras Wt y en verde células ES REX1 -/-.

Un porcentaje de metilación tan próximo al 50% como el que presenta el locus *Cd9* podría deberse a que es un gen regulado por estar el mecanismo de impronta. De ser así, encontraríamos metilación diferencial entre el locus materno y paterno. Mediante los estudios realizados en el presente trabajo no podemos determinar que así sea, pero sería algo relevante a analizar ya que el efecto protector de REX1 sobre la metilación de genes relacionados con *imprinting* ya se ha observado en casos como el de *Nespas* y *Peg3* [8].

Para ello se debería realizar una amplificación del fragmento, clonación y secuenciación de clones

individuales para evaluar la metilación de los mismos. Si se encontrará metilación en un 50% de los casos se trataría de un gen regulado por *imprinting*.

También se analizó los niveles de metilación en células TS, y placentas y embriones de ratón en el amplicón X de *Cd9M* (imagen 17 y 18). Comparado con niveles de metilación de 56,6% (TS), 64,9% (placenta) y 76,7%, son las células ES *KORex1* vemos que también es este último el que presentan un porcentaje de metilación inferior (Imagen 29). Eso se observó tanto mirando la globalidad (Imagen 29 A) o los 6 dinucleótidos CpG por separado (Imagen 29 B).

Si analizamos otros tipos celulares y tejidos wt con el de células ES KoREX1 vemos que también es este último el que presenta un porcentaje de metilación inferior, tanto si miramos la globalidad (Imagen X. A) o los 6 dinucleótidos CpG por separado (Imagen X. B) en el amplicón X del locus *Cd9* (Imagen X).

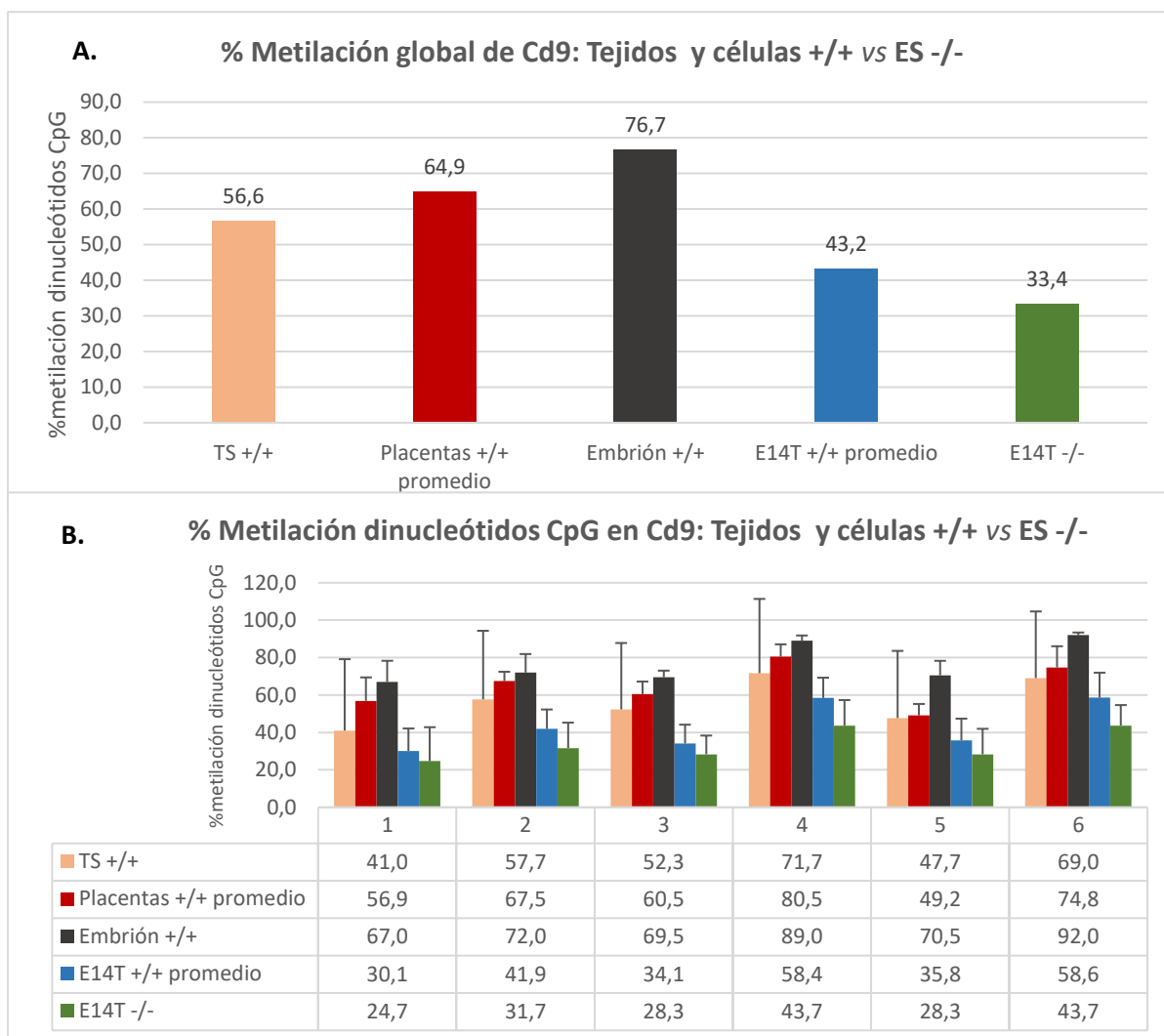


Imagen 29. Porcentaje de metilación del amplicón X (imagen 17 y 18) del locus *Cd9* para diferentes tejidos y células y células ES deficientes en REX1. **A.** Valores de metilación globales. **B.** Valores de los 6 dinucleótidos CpG del amplicón. Los valores representados corresponden al promedio de por lo menos tres mediciones. El error corresponde a la desviación estándar. En verde se encuentran representadas las células ES REX1 -/-, en el resto de colores otros tejidos wt.

Hemos utilizado el promedio de placentas debido a que no se encuentran grandes diferencias en cuanto a porcentaje de metilación global entre la que correspondía a una gestación de 14,5 dE (66%) y la de 18,5 (62%). El tejido con mayor porcentaje de

metilación en el amplicón de *Cd9* resultó ser el de embrión seguido por la placenta y las células TS.

5.4.3.2 AMPLICIÓN *Cd9I*

También resulta interesante ver que ocurre en otras regiones cercanas locus *Cd9* y compararlas con las del amplicón X. Por eso estudiamos los niveles de metilación del amplicón C correspondiente a *Cd9I* (Imagen 17 y 22).

Cabe decir que, en el caso del estudio de metilación del amplicón *Cd9I*, los resultados obtenidos se basan en un único experimento. Por tanto, estos, pueden no ser totalmente representativos y cabría esperar la repetición del mismo hasta un mínimo de en tres ocasiones para mayor fiabilidad.

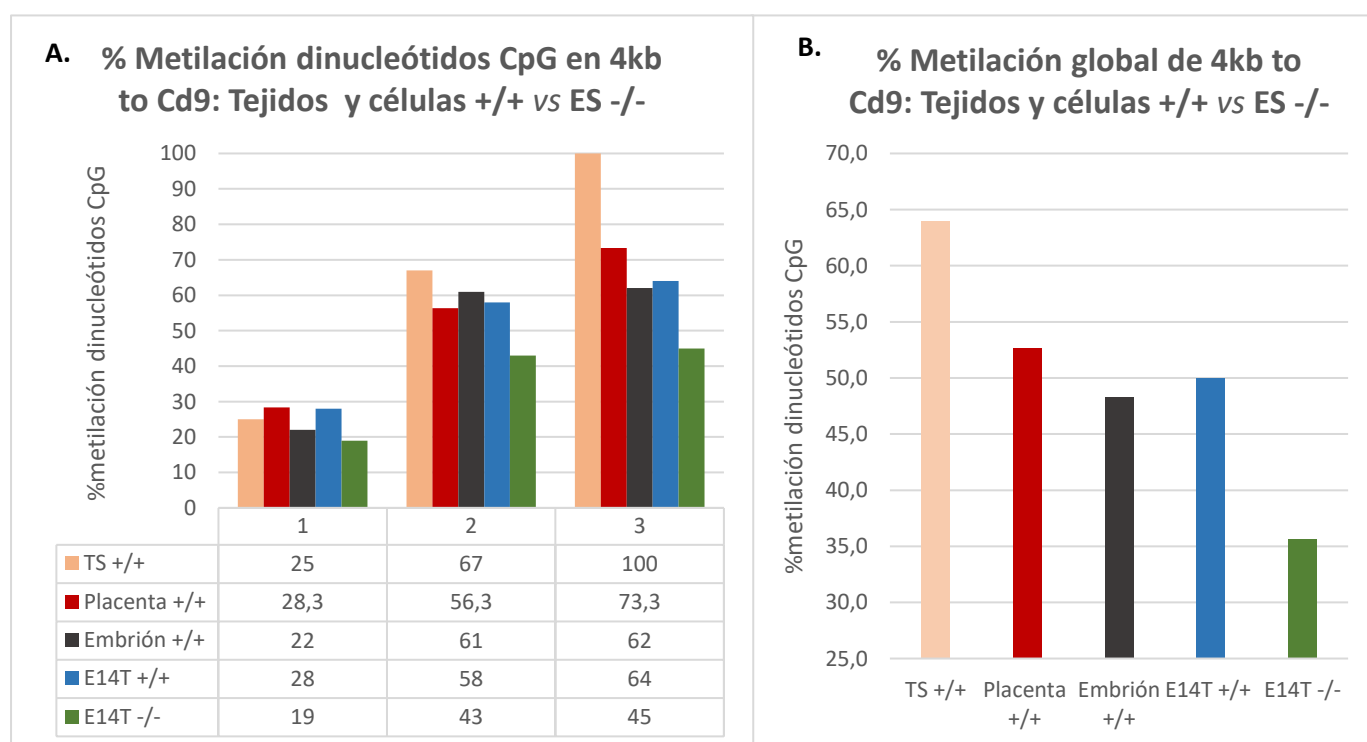


Imagen 30. Porcentaje de metilación del amplicón C (imagen 22) de *Cd9I* o también llamado 4kb to *Cd9* para diferentes tejidos y células wt y células ES deficientes en REX1. A. Valores de los 6 dinucleótidos CpG del amplicón. B. Valores de metilación globales. En verde se encuentran representadas las células ES REX1 -/-, en el resto de colores otros tejidos wt.

Al igual que sucedía con el *Cd9M*, en *Cd9I* el porcentaje de metilación en las células ES *KORex1* es siempre inferior en como mínimo el 27% al de los tejidos y tipos celulares wt (Imagen 30). Este porcentaje es inferior en todos los dinucleótidos CpG. El tercer dinucleótido del amplicón C es el que mayor porcentaje de metilación tiene y en el

que más se aprecia la diferencia entre los tejidos wt y las células ES REX1 -/- (*Imagen 30*). Observamos niveles más altos de-metilación en las células TS, seguidos en orden descendente por placenta, ES wt y embrión.

Si comparamos el patrón de metilación observado en ambos loci, observamos diferencias en función del tejido analizado en cuestión. La metilación dentro del amplicón *Cd9M* en placenta (64,9%) y embrión (76,7%) fue superior respecto a la del amplicon *Cd9I* (52,7% en placenta y 48,3 en embrión) (*Imagen 31*). El resto de células y tejidos presentan un porcentaje de metilación similar en los dos amplicones, las menores diferencias entre ambos locus se han observado en las células ES deficientes en *Rex1*. Esto podría deberse a que REX1 tendría un papel diferente en ambas regiones protegiendo en mayor medida la metilación en *Cd9M* que solapa con su sitio de unión (*Imagen 17*). Sería interesante comparar la metilación de tejidos wt con tejido *REX1* -/-, pero solo disponíamos de células ES deficientes. En un futuro se solicitará a el Dr. J.KIM [19] el gDNA correspondiente a las placentas y embriones *REX1* -/-.

Comparando la diferencia de niveles de metilación entre células *KORex1* y *ESwt*, la ausencia de REX1 causa una mayor pérdida de la metilación en una posición alejada de su sitio de unión (*Cd9I*), respecto a *Cd9M*. La diferencia entre ambos loci en las células deficientes es mínima, del 2,3%, mientras que entre células ES wt es de 6,8%.

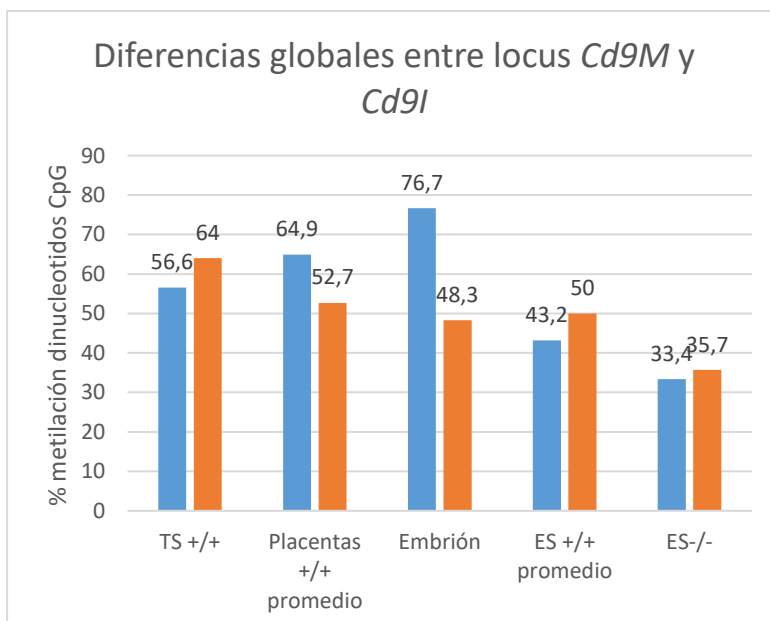


Imagen 31. Porcentaje de metilación del amplicón X del locus *Cd9M* (*imagen 17 y 18*) y del amplicón C del locus 4kb to *Cd9* (*imagen 12 y 22*) para diferentes tejidos y células y células ES deficientes en REX1. En azul representada la metilación del locus *Cd9* y en naranja la metilación del locus a 4kb de *Cd9*.

5.5 Influencia de la metilación en los niveles de expresión

La metilación de islas CpG está asociada comunmente a represión de la expresión génica. Como consecuencia, esperamos encontrar una correlación negativa entre el grado de metilación del locus genómico y los niveles de expresión del transcrito 1 de *Cd9*. Esta correlación no la encontramos en nuestros resultados; los porcentajes de metilación en placenta para el locus *Cd9* son de los más elevados y al contrario de lo esperado presenta altos niveles de expresión de RNA. La expresión de *Cd9* es más elevada en placenta y concuerda con los elevados niveles de expresión obtenidos en este tejido. En el extremo opuesto, pero también contrario a lo esperado, tenemos el caso de las células ES con niveles de metilación y de expresión de *Cd9* más bajos que en placenta. Es posible que existan otros mecanismos encargados de la regulación de la transcripción que predominen al de la metilación para este gen o bien que la región que justamente analizamos no sea la determinante para ello.

6. CONCLUSIONES

- De los 4 transcritos alrededor del sitio de unión de REX1 (cerca del locus *Cd9/Gm26728*), fuimos capaces de detectar únicamente el transcrito 1 de *Cd9* en placenta (*Cd9-001*).
- *Cd9-001* se expresa a niveles muy altos en placenta, y observamos un aumento de expresión creciente durante la diferenciación del trofoctodermo hacia placenta.
- Los niveles de *Cd9-001* en la placenta varían según la presencia de *Rex1*: más elevado en placentas y embriones *Rex1* $-/-$, *Rex1* $-/+$ que en sus homólogos silvestres (*Rex1* $+/+$).
- Se puso a punto un ensayo de amplificación/pirosecuenciación que permite determinar los niveles de metilación en una isla CpG a 4 kb del sitio de unión de REX1 (*Cd9I*).
- Para dos amplicones dentro del locus *Cd9* (*Cd9M* y *Cd9I*), las células ES deficientes para *Rex1* $-/-$ presentan un porcentaje de metilación inferior al resto de tejidos wt analizados. Esta observación es compatible con un papel de REX1 en mantener la metilación alrededor de su sitio de unión.
- Los datos de expresión de *Cd9-001* en placentas y embriones deficientes en *Rex1* sugieren que REX1 es un modulador de la expresión de *Cd9* en placenta, de modo que actuaría como represor de la expresión de *Cd9*.

6. CONCLUSIONS

- Out of four transcripts in the *Cd9/Gm26728* locus surrounding a putative REX1 binding site, only RNA corresponding to *Cd9-001* could be detected in mouse placenta.
- *Cd9-001* is expressed in TS cells and differentiated TS cells, and at even higher levels in placenta. We found that the expression level increases during gestation.
- *Cd9-001* levels in placenta and embryos are dependent on the *Rex1* genotype: levels are higher in *Rex1* +/+ samples compared to corresponding *Rex1* -/-, and *Rex1* -/+ samples from the same litter.
- Expression data for *Cd9-001* in *Rex1*-deficient placentas and embryos are compatible with a modulating role for REX1 on the expression levels of *Cd9*: the expression of this locus increases in its absence.
- An assay was developed to measure methylation levels in a CpG island close to the *Cd9* locus.
- For different amplicons in the *Cd9* locus, methylation levels are lower in the *Rex1*-deficient ES cells compared to the wt cells. The presence of REX1 seems necessary to maintain the methylation in the *Cd9* locus.
- Expression data for *Cd9-001* in *Rex1*-deficient placentas and embryos are compatible with a modulating role for REX1 on the expression levels of *Cd9*: the expression of this locus increases in its absence.
- There is no negative correlation between the percentage of methylation and the expression levels of *Cd9* transcript 1.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Wu, G., Lei, L. and Schöler, H. (2017). Totipotency in the mouse. *Journal of Molecular Medicine*, 95(7), pp.687-694.
- [2] M. Hemberger, W. Dean, and W. Reik, "Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 526–537, 2009.
- [3] Prudhomme, J. and Morey, C. (2015). Epigenesis and plasticity of mouse trophoblast stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(4), pp.757-774.
- [4] J. Schoorlemmer, R. Pérez-Palacios, M. Climent, D. Guallar, and P. Muniesa, "Regulation of Mouse Retroelement MuERV-L/MERVL Expression by REX1 and Epigenetic Control of Stem Cell Potency.," *Front. Oncol.*, vol. 4, no. February, p. 14, 2014.
- [5] Fowden, A., Sibley, C., Reik, W. and Constancia, M. (2006). Imprinted Genes, Placental Development and Fetal Growth. *Hormone Research in Paediatrics*, 65(3), pp.50-58.
- [6] K. B. Scotland, S. Chen, R. Sylvester, and L. J. Gudas, "Analysis of Rex1 (Zfp42) function in embryonic stem cell differentiation," *Dev. Dyn.*, vol. 238, no. 8, pp. 1863–1877, 2008.
- [7] J. Do Kim, C. Faulk, and J. Kim, "Retroposition and evolution of the DNA-binding motifs of YY1, YY2 and REX1," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 10, pp. 3442–3452, 2007.
- [8] J. Do Kim, H. Kim, M. B. Ekram, S. Yu, C. Faulk, and J. Kim, "Rex1/Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 7, pp. 1353–1362, 2011.
- [9] D. Guallar, R. Pérez-Palacios, M. Climent, I. Martínez-Abadía, A. Larraga, M. Fernández-Juan, C. Vallejo, P. Muniesa, and J. Schoorlemmer, "Expression of endogenous retroviruses is negatively regulated by the pluripotency marker Rex1/Zfp42," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 18, pp. 8993–9007, 2012.
- [10] Masui, S., Ohtsuka, S., Yagi, R., Takahashi, K., Ko, M.S. and Niwa, H. (2008) Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. *BMC Dev. Biol.*, 8, 45
- [11] "Ensembl." [Online]. Available: http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000030342;r=6:125460266-125494791. [Accessed: 25-Mar-2016].
- [12] LI, Yuanyuan; TOLLEFSBOL, Trygve O. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Epigenetics Protocols*, 2011, p. 11-21.
- [13] H. Akutsu, T. Miura, M. Machida, J. ichi Birumachi, A. Hamada, M. Yamada, S. Sullivan, K. Miyado, and A. Umezawa, "Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9," *Differentiation*, vol. 78, no. 2–3, pp. 137–142, 2009.

- [14] T. N. Oka M, Tagoku K, Russell TL, Nakano Y, Hamazaki T, Meyer EM, Yokota T, "CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 1274–1281, 2002.
- [15] W. M. Liu, Y. J. Cao, Y. J. Yang, J. Li, Z. Hu, and E. K. Duan, "Tetraspanin CD9 regulates invasion during mouse embryo implantation," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 36, no. 1, pp. 121–130, 2006.
- [16] María Martínez Santolaria " Regulación Epigenética del locus *Cd9* por REX1"TFG en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, 2015-2016
- [17] S. Masui, S. Ohtsuka, R. Yagi, K. Takahashi, M. S. H. Ko, and H. Niwa, "Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells.," *BMC Dev. Biol.*, vol. 8, p. 45, 2008.
- [18] Pérez-Palacios, R., Macías-Redondo, S., Climent, M., Contreras-Moreira, B., Muniesa, P. and Schoorlemmer, J. (2016). In Vivo Chromatin Targets of the Transcription Factor Yin Yang 2 in Trophoblast Stem Cells. *PLOS ONE*, 11(5), p.e0154268.
- [19] Kim, J., Kim, H., Ekram, M., Yu, S., Faulk, C. and Kim, J. (2011). Rex1/Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting. *Human Molecular Genetics*, 20(7), pp.1353-1362.
- [20] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method.," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [21] Rogers, M., Hosler, B. and Gudas, L. (1991) Specific expression of a retinoic acid regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development*, 113, 815–824.
- [22] C. E. Nestor, R. Ottaviano, D. Reinhardt, H. A. Cruickshanks, H. K. Mjoseng, R. C. McPherson, A. Lentini, J. P. Thomson, D. S. Dunican, S. Pennings, S. M. Anderton, M. Benson, and R. R. Meehan, "Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems," *Genome Biol.*, vol. 16, no. 1, p. 11, 2015.